

Aus der Klinik für Rheumatologie
der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf
Direktor: Univ.-Prof. Dr. med. Jörg Distler

Bestimmung des Makrophagenphänotyps nach Stimulation
humaner Monozyten mit Serum von Patienten mit systemisch
rheumatischen Erkrankungen

Dissertation

Zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin der Medizinischen Fakultät
der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

vorgelegt von

Fabia Ophoff

2023

Als Inauguraldissertation gedruckt mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

gez.:

Dekan: Prof. Dr. med. Nikolaj Klöcker

Erstgutachter: Prof. Dr. med. Georg Pongratz

Zweitgutachter: Prof. Dr. med. Ulrich Germing

Für meine Familie

I. Zusammenfassung deutsch

Patienten mit systemisch rheumatischen Erkrankungen wie rheumatoider Arthritis (RA) oder systemischem Lupus erythematodes (SLE) weisen ein erhöhtes Risiko bezüglich kardiovaskulärer Morbidität und Mortalität auf. Dies zeigt sich bereits im Auftreten subklinischer Formen von Atherosklerose. Wesentlicher Einflussfaktor für die Initiation und Progression atherosklerotischer Plaques ist die Differenzierung von Makrophagen zu verschiedenen Phänotypen. Der proinflammatorische Phänotyp M1 ist mit der Progression und Ruptur von atherosklerotischen Läsionen assoziiert, der antiinflammatorische Phänotyp M2 ist in stabilen Plaques vorherrschend. Die Makrophagendifferenzierung hängt von den Mediatoren in der Umgebung wie Serumfaktoren ab. Bei Patienten mit RA oder SLE liegen durch die systemische Inflammation im Vergleich zu Gesunden weitreichende Veränderungen im Serum vor, daher untersucht die Arbeit den Einfluss des Serums auf die Ausbildung von Makrophagenphänotypen. Nach dieser Hypothese wird bei Stimulation mit dem Serum der systemisch rheumatisch Erkrankten eine Polarisierung zum atherogenen Phänotyp M1 begünstigt.

Zur Untersuchung der Hypothese wurden humane Monozyten aus dem peripheren Blut gesunder Probanden gewonnen und mit dem Serum von Patienten mit RA und SLE stimuliert. Als Vergleichsgruppe diente das Serum gesunder Probanden und Patienten mit Osteoarthrose (OA). Als Maßstab für die Phänotypen M1 und M2 stimulierten wir humane Monozyten zudem gezielt mit Zytokinen. Die Identifizierung des Phänotyps erfolgte nach sieben Tagen Stimulation über Messung der Zytokinkonzentrationen im Zellkulturüberstand mittels ELISA und über eine Oberflächenphänotypisierung mittels FACS.

Nach Stimulation mit dem Serum Gesunder zeigte sich eine deutliche Ausprägung der M2-typischen Marker CD206, CD163, IL-10 und TGF- β , während auch die für M1 sprechenden Marker CD86, IL-6 und TNF- α vorlagen. Diese Kombination tritt beim Subtyp M2b auf, der als atheroprotektiv gilt. Bei OA zeigte sich hingegen wenig Expression der M2-typischen Marker, daher ordnen wir die Polarisierung eher einem undifferenzierten M1 ähnlichen Phänotyp zu. Unter der Stimulation mit RA- und SLE-Serum wiesen die Makrophagen eine Mischung von M1- und M2-typischen Markern auf. Dies spricht am ehesten für einen eigenen Subtyp, der zwischen den Phänotypen M1 und M2 liegt. Dieser ist bei RA u.a. durch eine niedrige Expression von CD206 und CD86 sowie einer hohen Expression von CD163 gekennzeichnet. Dies entspricht einer möglichen Konstellation des Subtyps M2c. Bei SLE ist u.a. eine niedrige Expression von CD206 und CD14 sowie eine hohe Expression von CD163 auffällig. Insgesamt zeigen sich bei Stimulation mit allen Patientenserum Phänotypen, die sich von denen nach Stimulation mit gesunden Seren unterscheiden. Je Gruppe zeichnete sich eine eigene Makrophagensignatur zwischen der eindeutigen M1 und M2 Klassifikation ab. Die erfolgreiche Differenzierung und Ausbildung unterschiedlicher Makrophagensignaturen unter Stimulation mit Serum sprechen für einen direkten Einfluss von Faktoren aus dem Serum auf die Makrophagenpolarisation. Ein Einfluss der systemischen Veränderungen auf die Entwicklung von Atherosklerose über die Makrophagenpolarisation ist daher möglich.

II. Zusammenfassung englisch

Patients with systemic rheumatic diseases such as rheumatoid arthritis (RA) or systemic lupus erythematosus (SLE) have an increased risk of cardiovascular morbidity and mortality, which is already reflected in the occurrence of subclinical forms of atherosclerosis. Major influencing factors for the initiation and progression of atherosclerotic plaques is the differentiation of macrophages into different phenotypes. The proinflammatory phenotype M1 is associated with progression and rupture of atherosclerotic lesions, and the antiinflammatory phenotype M2 is predominant in stable plaques. Macrophage differentiation depends on mediators in the environment such as serum factors. In patients with RA or SLE, extensive changes in serum are present due to systemic inflammation compared with healthy individuals. Therefore, we investigate the influence of serum on the formation of macrophage phenotypes. According to our hypothesis, stimulation with the serum of patients with systemic rheumatic disease favors polarization toward the M1 atherogenic phenotype.

To investigate our hypothesis, we obtain human monocytes from the peripheral blood of healthy volunteers and stimulate them with serum from patients with RA and SLE. Serum from healthy volunteers and patients with osteoarthritis (OA) serve as a comparison group. As a measure of M1 and M2 phenotypes, we also stimulate human monocytes specifically with cytokines. Phenotype identification is performed after seven days of stimulation by measuring cytokine concentrations in cell culture supernatant by ELISA and by surface phenotyping by FACS.

After stimulation with the serum of healthy individuals, there was a clear expression of the M2-typical markers CD206, CD163, IL-10 and TGF- β , while the markers CD86, IL-6 and TNF- α , which are indicative of M1, were also present. This combination occurs in subtype M2b, which is considered atheroprotective. In contrast, OA showed little expression of the M2-type markers, so we rather assign the polarization to an undifferentiated phenotype toward M1. Under stimulation with RA and SLE serum, macrophages showed a mixed constellation of M1- and M2-type markers. This speaks most likely for a separate subtype located between M1 and M2. This is characterized in RA by, among other things, low expression of CD206 and CD86 and high expression of CD163. This is a possible constellation of subtype M2c. In SLE, low expression of CD206 and CD14 and high expression of CD163, among others, are conspicuous. Overall, all macrophages stimulated with serum from RA, SLE or OA show phenotypes that differ from those treated with healthy serum. For each group, a distinct macrophage signature emerged between the distinct M1 and M2 classifications. The successful differentiation and formation of distinct macrophage signatures under stimulation with serum argue for a direct influence of factors from serum on macrophage polarization. An influence of systemic changes on the development of atherosclerosis via macrophage polarization is therefore possible.

III. Abkürzungsverzeichnis

ADCC	<i>antibody-dependent cellular cytotoxicity</i>
APC	<i>antigen presenting cells</i>
BSA	bovines Serumalbumin
BMI	<i>body mass index</i>
°C	Grad Celsius
CD	<i>cluster of differentiation</i>
CO ₂	Kohlendioxid
CRP	C-reaktives Protein
dL	Deziliter
E.coli	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
ELISA	<i>enzyme-linked immunosorbent assay</i>
FACS	<i>flourescence activated cell sorting</i>
FBS	fetales bovines Serum
FcR	Fc-Rezeptor
FSC	<i>forward scatter characteristics</i>
g	Gramm
HCl	Salzsäure
HRP	<i>horseradish peroxidase</i>
IFN-γ	Interferon gamma
IL	Interleukin
LPS	Lipopolysaccharid
M-CSF	<i>monocyte colony stimulating factor</i>
mg	Miligramm
mL	Milliliter
MHC	Haupthistokompatibilitätskomplex
MFI	<i>mean flourescence intensitiy</i>
NaOH	Natriumhydroxid
NK	<i>natural killer</i>
nL	Nanoliter
nm	Nanometer
KI	Konfidenzintervall

OA	Osteoarthrose
OR	<i>odds ratio</i>
PI	Propidium Iodid
PBMC	<i>peripher blood mononuclear cells</i>
PBS	<i>phosphate buffered saline</i>
PRR	<i>pattern recognition receptor</i>
RA	Rheumatoide Arthritis
SLE	Systemischer Lupus erythematodes
SSC	<i>side scatter characteristics</i>
TMB	Tetramethylbenzidin
TNF- α	Tumor Nekrose Faktor alpha
TGF- β	<i>transforming growth factor beta</i>
TWEAK	<i>TNF-like weak inducer of apoptosis</i>
V	Volt
μ L	Mikroliter

IV. Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung.....	1
1.1	Einführung.....	1
1.2	Systemisch rheumatische Erkrankungen und Osteoarthrose.....	1
1.2.1	Rheumatoide Arthritis	1
1.2.2	Systemischer Lupus erythematoses.....	2
1.2.3	Osteoarthrose	3
1.3	Monozyten/Makrophagen.....	4
1.3.1	Klassifikation der Phänotypen und Marker	5
1.3.2	Makrophagen in Atherosklerose	6
1.4	Biomarker.....	7
1.4.1	Oberflächenrezeptoren	7
1.4.2	Zytokine	9
1.5	Zielsetzung der Arbeit	11
2	Material und Methoden.....	12
2.1	Studiendesign	12
2.2	Studienkollektiv	12
2.3	Versuchsaufbau	13
2.4	Isolation humaner Monozyten	14
2.4.1	Ausgangsmaterial und Versuchsaufbau	14
2.4.2	Praktisches Vorgehen.....	15
2.5	Stimulation humaner Monozyten.....	16
2.5.1	Ausgangsmaterial	16
2.5.2	Praktisches Vorgehen.....	17
2.6	Bestimmung Oberflächenmarker.....	18
2.6.1	Durchflusszytometrie	18

2.6.2	Übersicht Antikörper	19
2.6.3	Färbung Zellen.....	20
2.6.4	Messung FACS.....	21
2.7	Auswertung der Rohdaten und <i>Gating</i> Strategie.....	22
2.8	Zytokinmessung im Überstand mittels ELISA	23
2.8.1	Zytokinassay IL-6.....	23
2.8.2	Zytokinassay IL-10.....	23
2.8.3	Zytokinassay TNF- α	24
2.8.4	Zytokinassay TGF- β	24
2.9	Statistische Analyse	25
3	Ergebnisse.....	26
3.1	Klinische Daten Patientengruppen	26
3.2	Makrophagenanteil.....	27
3.2.1	Unterschied Zytokin- und Serumstimulation	27
3.2.2	Unterschiede je Stimulation bei 20 % Serum.....	28
3.2.3	Unterschiede je Stimulation bei 40 % Serum.....	30
3.3	Expression Oberflächenmarker.....	31
3.3.1	Oberflächenmarker bei Zytokinstimulation.....	31
3.3.2	Oberflächenmarker bei Serumstimulation.....	36
3.4	Zytokinmessung in Zellkulturüberständen	42
3.4.1	Zytokinstimulation	42
3.4.2	Serumstimulation	46
3.5	Übersicht Oberflächenmarker und Zytokine je Patientengruppe	52
3.6	Multinomial logistische Regression	54
3.7	Random Forest	56
4	Diskussion	58
4.1	Anteil differenzierter Makrophagen.....	58
4.2	Zytokinstimulation für M1 und M2	59

4.2.1	Expression Oberflächenmarker	59
4.2.2	Zytokinmessung im Zellkulturüberstand	59
4.2.3	Bewertung der Zytokinstimulation.....	60
4.3	Stimulation mit humanem Serum und FBS	61
4.3.1	Expression Oberflächenmarker	61
4.3.2	Zytokinmessung im Zellkulturüberstand	63
4.4	Übersicht Marker je Stimulation	65
4.5	Multinomial logistische Regression	67
4.6	Random Forest	68
4.7	Zusammenhang Atherosklerose	70
4.8	Bewertung und Limitationen der Methode.....	72
4.9	Schlussfolgerung.....	73
5	Literaturverzeichnis.....	75
6	Anhang	84
6.1	Abbildungsverzeichnis.....	84
6.2	Tabellenverzeichnis.....	85
	Danksagung	86

1. Einleitung

1.1 Einführung

Inflammatorisch rheumatische Erkrankungen wie die rheumatoide Arthritis (RA) oder der systemischer Lupus erythematoses (SLE) gehen mit einer erhöhten Inzidenz von Atherosklerose einher und weisen in Folge eine höhere kardiovaskuläre Morbidität und Mortalität auf [1]. Die kardiovaskulären Erkrankungen spielen insbesondere in der Langzeitmortalität von Patienten mit RA und SLE eine entscheidende Rolle [2]. Traditionelle Risikofaktoren wie arterielle Hypertonie, Diabetes mellitus oder Hyperlipidämie allein können das erhöhte Risiko nicht umfassend erklären [3]. Einflüsse wie die systemische Inflammation in SLE oder RA tragen ebenfalls dazu bei. Das kardiovaskuläre Risiko ist abhängig von der Aktivität und Dauer der Erkrankung sowie einer Therapie mit Glukokortikoiden [4]. Eine besondere Bedeutung in der Entstehung und Progression von atherosklerotischen Plaques kommt der Differenzierung von Makrophagen zu verschiedenen Phänotypen zu. So lassen sich je nach Region der Plaques unterschiedliche Phänotypen nachweisen, die mit der Stabilität oder Progression der Läsion assoziiert sind [5].

1.2 Systemisch rheumatische Erkrankungen und Osteoarthrose

1.2.1 Rheumatoide Arthritis

Die RA ist eine chronisch-entzündliche Erkrankung unbekannter Ätiologie, die durch eine symmetrische Entzündung in den Gelenken gekennzeichnet ist. Als systemische Erkrankung kann sie neben der Gelenkdestruktion zu extraartikulären Manifestationen wie Fatigue, Pleuritis, Perikarditis, peripherer Neuropathie oder hämatologischen Störungen führen [6]. Insgesamt sind 0,5 – 1,0% der erwachsenen Bevölkerung weltweit von RA betroffen [7]. Frauen sind häufiger von der Erkrankung betroffen als Männer (2-3:1) und der Altersgipfel liegt bei 45-55 Jahren [8]. Patienten mit RA sind in Abhängigkeit der Krankheitsaktivität und Therapie durch eine höhere Mortalitätsrate gekennzeichnet [9], [10]. Das erhöhte Risiko für kardiovaskuläre

Erkrankungen trägt in weitreichendem Maße zu ihrer Mortalität bei [11]. Dieses lässt sich auch unabhängig von traditionellen Risikofaktoren (Alter, Geschlecht, Rauchen, sozialer Status, Diabetes mellitus, Hypercholesterinämie, systolischer Blutdruck, BMI) feststellen [3].

Die Pathogenese der Erkrankung ist Gegenstand aktueller Forschung. Es werden genetische Einflüsse, Umweltfaktoren sowie das angeborene und adaptive Immunsystem diskutiert [12]. Die Erkrankung geht neben der Bildung von Autoantikörpern mit komplexen Veränderungen von Entzündungsmediatoren einher [13], [14]. Dies betrifft sowohl das lokale Milieu im Gelenk als auch systemisch das periphere Blut. Die Spiegel proinflammatorischer Zytokine im Serum von Patienten mit RA sind erhöht, z.B. von IL-6 [15] und TNF- α [16]. Makrophagen spielen durch die massive Infiltration in die Synovialflüssigkeit und durch die Produktion von proinflammatorischen Zytokinen bzw. Chemokinen eine Schlüsselrolle in der Pathogenese der RA [17]. Des Weiteren tragen sie durch verschiedene Mechanismen zur Knorpel- und Knochendestruktion im Gelenk bei [18]. Makrophagen zählen zu den häufigsten Zellen in der Synovialis von Patienten mit RA und korrelieren mit der lokalen Krankheitsaktivität [11]. Dies verdeutlicht das große und bisher wenig genutzte Potenzial der Einflussnahme auf Makrophagen in der Behandlung von RA [19].

1.2.2 Systemischer Lupus erythematoses

Auch der SLE zählt zu den chronisch rheumatischen Erkrankungen und kann verschiedene Organsysteme betreffen [6]. Die Prävalenz der Erkrankung variiert weltweit und liegt in Deutschland insgesamt bei 36,7 pro 100.000 Einwohnern [20]. Frauen sind deutlich häufiger betroffen als Männer (7-9:1), der Altersgipfel liegt bei 15-40 Jahren [8]. Patienten mit SLE weisen eine höhere Sterblichkeit auf, besonders deutlich ist die Risikoerhöhung bei Patienten mit weiblichem Geschlecht und jungem Alter [21]. Die vorzeitige Entstehung von Atherosklerose gilt als eine der Hauptursachen langfristiger Mortalität. Bei Frauen mit SLE ist das Risiko für einen Myokardinfarkt im Vergleich zur gesunden Kontrollgruppe 50-fach erhöht [22]. Obwohl die Mortalität bei SLE insgesamt zurückgeht, ist das kardiovaskuläre Mortalitätsrisiko etwa gleich geblieben [22].

Die Manifestationen beim SLE sind vielfältig und reichen von Arthritis, Anämie, Thrombozytopenie, Serositis, Nephritis bis zur Psychose [23]. Die Ätiologie der Erkrankung ist noch nicht vollständig geklärt. Eine multifaktorielle Interaktion von genetischen Faktoren und Umweltfaktoren ist anzunehmen. [24]. Eine kritische Rolle in der Pathogenese spielen das angeborene und das adaptive Immunsystem inklusive ihrer Netzwerke. Durch die Immunantwort auf Selbstantigene wird die Produktion von Autoantikörpern induziert, während es durch Immunkomplexe zur Aktivierung des Komplementsystems und zur Akkumulation von Neutrophilen, Monozyten und Lymphozyten kommt [25]. Als ein möglicher Auslöser für die Produktion von Autoantikörpern gilt die gestörte Phagozytose von apoptotischen Zellen durch fehlerhaft aktivierte Makrophagen [26]. Die erhöhten Raten an Apoptose, Nekrose sowie Autophagie und der defekte Abbau dieser Zellen führen zur vermehrten Präsentation intrazellulärer Antigene sowie zur Inflammation [27]. Gegen diese irregulär anfallenden intrazellulären Antigene fehlt die Toleranz des Immunsystems. Dies erhöht das Risiko für die Produktion von Autoantikörpern [28], [29]. Darüber hinaus finden sich relevante Einflüsse auf die Pathogenese in der Produktion von Zytokinen und anderen inflammatorischen Mediatoren [30]. Im Serum von Patienten mit SLE konnte mehr IL-6 als bei Gesunden und mehr IL-6 bei aktiver Erkrankung im Vergleich zur inaktiven Erkrankung festgestellt werden [31]. Des Weiteren finden sich im Serum der Patienten mit SLE erhöhte Spiegel von IL-10 [32].

1.2.3 Osteoarthrose

Bei der Osteoarthrose handelt es sich um die weltweit häufigste Gelenkerkrankung mit einer altersassoziierten Erhöhung der Inzidenz sowie Prävalenz [33]. Die degenerative Gelenkerkrankung zeichnet sich durch pathologische Veränderungen sämtlicher Strukturen des Gelenks aus [34]. Charakteristischerweise zeigen sich eine Degeneration des Gelenkknorpels, eine begrenzte intraartikuläre Inflammation und Veränderungen periartikulär, sowie im subchondralen Knochen [35]. An der multifaktoriellen Ätiologie sind das Alter, Übergewicht, Gelenkverletzungen sowie genetische Faktoren der Patienten beteiligt [36]. Zudem ist OA ebenfalls mit einem erhöhtem Risiko für kardiovaskuläre Erkrankungen assoziiert [37]. Als mögliche Erklärungen für diesen Zusammenhang dienen gemeinsame Risikofaktoren der beiden Gruppen wie Übergewicht und Alter, ähnliche molekulare Mechanismen wie

eine lokale chronische Inflammation und Faktoren wie Immobilität und Medikamenteneinnahme, die wiederum ein erhöhtes Risiko für kardiovaskuläre Erkrankungen bedingen [38].

1.3 Monozyten/Makrophagen

Monozyten sind mononukleäre Zellen, die aus dem Knochenmark ins periphere Blut einwandern und für ein bis drei Tage zirkulieren [6]. Sie verlassen die Blutbahn und können im Gewebe zu Makrophagen differenzieren [39]. Makrophagen sind Teil des angeborenen Immunsystems und spielen eine wichtige Rolle in der Abwehr von Krankheitserregern durch Initiation sowie Regulation der Abwehrreaktion, durch Phagozytose von Mikroorganismen und durch die Präsentation von Antigenen [40]. Sie sind an der Entfernung von Zelldetritus, der Wundheilung und der Zerstörung von Tumorzellen beteiligt [40], [41]. Aufgrund ihrer funktionellen Vielfalt spielen sie bei inflammatorischen Erkrankungen eine zentrale Rolle und sind wichtiger Ansatzpunkt weiterer Diagnostik- und Therapiemöglichkeiten [42], [43]. Sie können ihren Phänotyp fortwährend den Umgebungsfaktoren anpassen, indem sie sensibel auf im lokalen Milieu vorhandene Mediatoren wie Chemokine oder Zytokine reagieren [44], [45]. Monozyten und Makrophagen sind durch die Expression typischer Rezeptoren auf ihrer Oberfläche, wie das Glykoprotein CD14, gekennzeichnet [46], [47].

Makrophagen können von verschiedenen Zytokinen, Bestandteilen von Bakterien (bspw. Lipopolysaccharide) oder anderen Entzündungsmediatoren aktiviert werden. Die Entwicklung von Monozyten bzw. Makrophagen ist entscheidend durch den Wachstumsfaktor M-CSF beeinflusst, der das Überleben und die Proliferation sowie die Differenzierung und Aktivierung der Zellen fördert. [48]. [49]. Die Plastizität der Makrophagen in Bezug auf Morphologie und Funktion ist vielfältig und noch nicht bis in alle Einzelheiten geklärt. Ein etabliertes System zur Einordnung der Makrophagen zu einem Phänotyp ist die M1/M2-Klassifikation [50]. Hierbei handelt es sich um ein *in vitro* definiertes Modell, bei dem die Phänotypen M1 und M2 als Umriss eines breiten und flexiblen Spektrums von Erscheinungsformen gelten [51].

1.3.1 Klassifikation der Phänotypen und Marker

Makrophagen des Phänotyps M1 zeigen proinflammatorische Eigenschaften, sie unterstützen die Immunantwort der T-Helferzellen vom Typ 1 und können Tumorzellen zerstören [52]. Sie vermitteln eine Resistenz gegen intrazelluläre Pathogene, aber rufen auch Reaktionen hervor, die das Gewebe schädigen [53]. M1-Makrophagen können *in vitro* mit den Zytokinen IFN- γ , TNF- α oder mit dem Bakterienbestandteil LPS polarisiert werden [54]. Charakteristisch ist die vermehrte Sekretion proinflammatorischer Zytokine wie IL-6 und TNF- α [55]. Auf ihrer Oberfläche zeichnen sie sich durch eine hohe Expression der Oberflächenmarker CD16 und CD86 aus [54].

Makrophagen des Phänotyps M2 gelten als anti-inflammatorisch und zeigen immunregulatorische Funktionen. Sie fördern sowohl die Wundheilung als auch Tumorprogression, begünstigen die Immunantwort der T-Helferzellen vom Typ 2 und helfen bei der Beseitigung von Parasiten [53]. Sie werden durch Stimulation mit IL-4, IL-13, IL-10 oder Glucocorticoiden polarisiert [55]. Makrophagen vom Phänotyp M2 exprimieren typischerweise die Oberflächenmarker CD206 sowie CD163 [56] und sezernieren vermehrt die antiinflammatorischen Zytokine IL-10 sowie TGF- β [57].

Makrophagen des Phänotyps M2 können bei genauerer Analyse in die weiteren Subtypen M2a, M2b und M2c unterteilt werden [54]. Der Subtyp M2a wird durch IL-4 sowie IL-13 stimuliert, der Subtyp M2b durch Exposition von Immunkomplexen, LPS, TLR-Agonisten sowie IL-1 Rezeptoragonisten und der Subtyp M2c durch IL-10, TGF- β sowie Glucocorticoide (s. Abbildung 1) [58]. Charakteristisch für M2a-Makrophagen ist eine hohe Expression der Oberflächenmarker CD163 und CD206 und eine hohe Produktion der Zytokine IL-10 und TGF- β . Funktionell sind sie an Gewebsumbauprozessen beteiligt [5]. Der Subtyp M2b zeigt hingegen typischerweise die Expression von CD86 und die Produktion der Zytokine IL-1, IL-6, IL-10 und TNF- α . Sie gelten als immunregulatorisch und wirken suppressiv auf Inflammation [54]. Bei M2c-Makrophagen findet man hohe Spiegel des Oberflächenrezeptors CD163 und die Makrophagen produzieren größere Mengen an IL-10 und TGF- β [57]. Sie scheinen eine wichtige Rolle in der Phagozytose apoptotischer Zellen zu spielen [59].

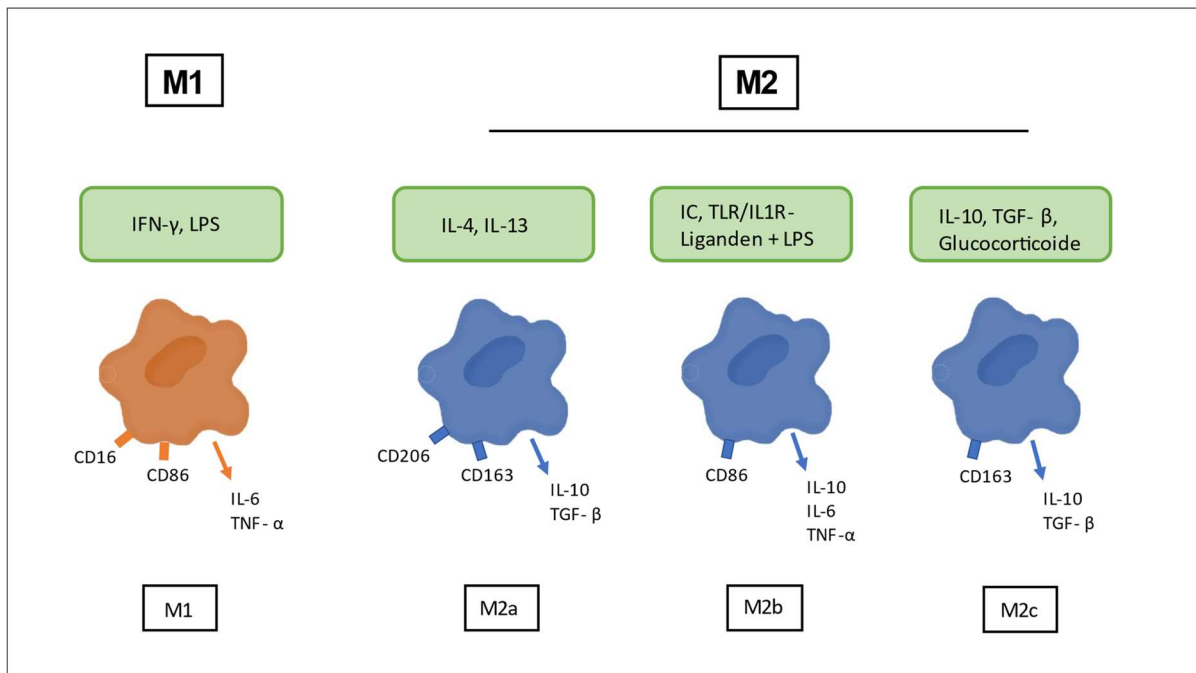


Abb. 1: Übersicht M1 und M2 a, b, c

Übersicht der Makrophagenphänotypen M1 und M2 mit Angabe der Subtypen für M2 (a, b, c). Die Stimulationen für die Polarisation der Makrophagenphänotypen sind im grünen Kasten abgebildet. Darüber hinaus findet sich die Angabe typischer Oberflächenrezeptoren auf den Zellen sowie die charakteristische Zytokinsekretion. Abkürzungen: IC Immunkomplexe, TLR Toll-like Rezeptor, IL1R IL-1 Rezeptor, LPS Lipopolysaccharid, IFN- γ Interferon gamma, TNF- α Tumor Nekrose Faktor alpha, TGF- β Transforming growth factor beta. Eigene Abbildung mit Auswahl der verwendeten Marker adaptiert nach Hao *et al.* 2014 und Mantovani *et al.* 2004.

1.3.2 Makrophagen in Atherosklerose

Bei Atherosklerose handelt es sich um eine komplexe Erkrankung der arteriellen Gefäße mit Endotheldysfunktion und Einlagerung von Lipiden in die Gefäßwand. Ein wichtiger Einflussfaktor bei der Entwicklung von Atherosklerose ist die systemische Inflammation [60]. Makrophagen spielen von der Initiation und Expansion atherosklerotischer Plaques bis zur Nekrose, Ruptur bzw. Resolution und Regression in sämtlichen Phasen der Atherogenese eine elementare Rolle [61]. Bei der Entstehung von Atherosklerose wandern zirkulierende Monozyten aus dem Blutstrom in das Subendothel der Gefäße ein, wo sie zu Makrophagen transformieren. Diese nehmen oxidiertes LDL auf und werden zu Schaumzellen [62]. Nach Aufnahme oxidierter Lipide und zellulärem Debris in der frühen Phase der Läsion werden viele Makrophagen apoptotisch und von den umgebenden Makrophagen phagozytiert [63]. Den spezialisierten Vorgang zur Beseitigung apoptotischer Zellen durch Phagozytose nennt man Efferozytose [64]. Die Apoptose von Makrophagen wirkt sich zunächst protektiv auf die atherosklerotischen

Läsionen aus, da bei der folgenden Efferozytose proinflammatorische Signale unterdrückt werden [63]. Stattdessen werden die antiinflammatorischen Zytokine IL-10 und TGF- β gebildet [65]. Im Verlauf kommt es jedoch zu einer defekten Efferozytose und folglich zur sekundären Nekrose von Makrophagen. Dies führt zur Freisetzung proinflammatorischer Zytokine, zur Bildung eines nekrotischen Kerns und letztlich zur Progression der Plaques [63].

In atherosklerotischen Läsionen zeigt sich ein Kontinuum an pro- und antiinflammatorischen Makrophagen zwischen den Polarisierungen M1 und M2 [66]. M2-Makrophagen finden sich eher in den stabilen, peripheren Arealen der Plaques [66]. Sie zeichnen sich durch eine verminderte Bildung von Schaumzellen und durch eine hohe Phagozytosefähigkeit aus [67]. M1-Makrophagen finden sich hingegen zahlreich in den instabilen und Ruptur gefährdeten Arealen der atherosklerotischen Läsionen [68]. M1-Makrophagen produzieren inflammatorische Zytokine, die den oxidativen Stress und die Apoptoserate erhöhen [62]. In experimenteller Atherosklerose bei Mäusen zeigen sich Hinweise, dass die Progression der Erkrankung mit der Polarisation des Phänotyps M1 assoziiert ist [69].

1.4 Biomarker

1.4.1 Oberflächenrezeptoren

Auf der Oberfläche von Makrophagen und anderen Zellen des Immunsystems finden sich zahlreiche Oberflächenrezeptoren, die in der Membran verankert sind. Neben der Erfüllung ihrer physiologischen Funktionen kann ihre Ausprägung als Charakteristikum für die Identifikation von bestimmten Zellpopulation genutzt werden.

Das Glykoprotein CD14 wird überwiegend auf Monozyten, Makrophagen und Neutrophilen Granulozyten exprimiert [70]. Der Opsoninrezeptor dient als *pattern recognition receptor* (PRR) für Lipopolysaccharid (LPS) und generiert so eine proinflammatorische Antwort auf das bakterielle Endotoxin [71], [72]. Als Efferozytoserezeptor ist er außerdem an der Erkennung und Phagozytose apoptotischer Zellen durch Makrophagen ohne Auslösen einer inflammatorischen Reaktion beteiligt [46], [73].

CD16 gehört zur Gruppe der Fc-Rezeptoren (Fc- γ RIIIa), die an der konstanten Region von Antikörpern (Fc-Domäne) binden. Sie werden auf den Effektorzellen des Immunsystems exprimiert [74]. Der Fc- γ Rezeptor IIIa findet sich häufig auf NK-Zellen und wird auch von Monozyten und Makrophagen exprimiert [75]. Eine wichtige Funktion ist die Initiation der antikörperabhängigen Zell-vermittelten Zytotoxizität (ADCC) durch Immunzellen [76].

Das Oberflächenprotein CD86 wird von Antigenpräsentierenden Zellen (APCs) wie Makrophagen, dendritischen Zellen oder aktivierten B-Zellen exprimiert [77], [78]. Als kostimulatorisches Molekül bindet CD86 mit niedriger Affinität an CD28 auf T-Zellen [79]. Neben der Antigenpräsentation durch die Haupthistokompatibilitätskomplexe (MHC) ist die Kostimulation von B7 über CD28 Voraussetzung für die T-Zell-Aktivierung [78]. Mit der T-Zellstimulation spielt CD86 eine wichtige Rolle in der Balance zwischen Toleranz und Immunität von Antigenen [80]. CD86 kann neben CD28 auch an das T-Zell-inhibierende Molekül CTLA-4 binden und darüber Toleranz induzieren [81].

CD163 ist ein Glykoprotein, das zur Gruppe der Cystein-reichen Scavenger-Rezeptoren gehört und ausschließlich auf Monozyten und Makrophagen exprimiert wird [82]. CD163 spielt eine wichtige Rolle in der Endozytose von Hämoglobin-Haptoglobinkomplexen aus dem Serum [82]. Der Oberflächenmarker ist ein multifunktionaler Rezeptor, der außerdem Zell-Zell-Interaktionen zwischen Makrophagen und Erythroblasten vermittelt und dem eine Rolle als Rezeptor für Bakterien zugeschrieben wird [83]. Außerdem handelt es sich um einen Rezeptor für TWEAK aus der TNF-Superfamilie und er erfüllt immunmodulatorische Funktionen [84].

Der Mannoserezeptor CD206 ist ein Carbohydrat-bindender Rezeptor, der auf bestimmten Populationen von Makrophagen, dendritischen Zellen und Endothelzellen exprimiert wird [85]. Er nimmt eine wichtige Rolle in der Endozytose, Phagozytose und Antigenpräsentation der Effektorzellen ein [86]. Der Rezeptor gehört zur Gruppe der Typ C Lektine und dient als PRR für die Erkennung verschiedener Mikroorganismen wie Bakterien, Pilze, Viren und Parasiten [87], [88]. Er interagiert mit Glykoproteinen und Glykolipiden auf der Oberfläche der Pathogene [89]. Dies führt zur ihrer Endozytose durch Makrophagen [88].

1.4.2 Zytokine

Zytokine sind lösliche Proteine, die von vielen verschiedenen Zellen produziert werden [6]. Zu den charakteristischen Eigenschaften von Zytokinen (wie Interleukinen, Interferonen und Wachstumsfaktoren) zählen ihre funktionelle Vielfalt sowie ihre überschneidenden Aktivitäten in der Regulation von Proliferation und Differenzierung von Immunzellen [90]. Sie spielen sowohl in der angeborenen als auch der adaptiven Immunität eine elementare Rolle und sind u.a. entscheidend an der Pathogenese von infektiösen, inflammatorischen und immunologischen Erkrankungen beteiligt [6].

IL-6 ist ein Zytokin, das ein breites Spektrum an biologischen Funktionen erfüllt. Es wird sowohl in akuter als auch in chronischer Inflammation gebildet [91]. IL-6 gilt als wichtiger Stimulator der akuten Phase Proteine und fördert die mononukleäre Zellakkumulation [92]. Neutrophile, Monozyten und Makrophagen reagieren auf IL-6 und können dieses auch produzieren, was zur positiven Rückkopplung der Inflammation und zum Wechsel von akuter zu chronischer Inflammation führen kann [93]. IL-6 besitzt neben seinen proinflammatorischen Eigenschaften und der Aktivierung des Immunsystems auch Einfluss auf die Regulation metabolischer, regenerativer und neuronaler Prozesse [90].

TNF- α ist ein zentrales Zytokin bei systemisch viralen Erkrankungen und spielt eine wichtige Rolle in der Pathogenese chronisch inflammatorischer Erkrankungen [94]. Das proinflammatorische Zytokin wird hauptsächlich von Monozyten/Makrophagen produziert, kann aber auch von vielen weiteren Immunzellen wie T- und B-Zellen oder Neutrophilen gebildet werden [95]. Als pleiotropes Zytokin ist es in multiplen biologischen Prozessen sowie an der Signalinduktion für Apoptose, Zellaktivierung, -überleben und -proliferation beteiligt [96]. TNF- α spielt außerdem eine zentrale Rolle in der Immunität gegen bestimmte Infektionen sowie bei der Pathogenese von Autoimmunerkrankungen wie RA [97]. In diesen Erkrankungen hat sich daher die Therapie mit Antikörpern gegen TNF- α als effektiv erwiesen. Die erhöhten Inzidenzen für Infektionen unter TNF- α Blockade unterstreichen wiederum die physiologische Rolle von TNF- α bei infektiösen Erkrankungen [95].

Bei IL-10 handelt es sich um ein pleiotropes Zytokin, das von vielen Immunzellen wie Monozyten, Makrophagen, dendritischen Zellen, T-Zellen, B-Zellen und NK-Zellen produziert werden kann [98]. Als anti-inflammatorisches Zytokin spielt es durch Limitation der Produktion proinflammatorischer Zytokine eine wesentliche Rolle in der Regulation der Immunantwort auf Infektionen [99]. Insbesondere während der Resolutionsphase zeigt es seine Wirkung zur Verminderung einer exzessiven, unkontrollierten Immunantwort, um letztendlich den Gewebeschaden zu minimieren [100]. Es limitiert also die proinflammatorische Immunantwort, durch die es sonst zu einer Gewebsschädigung kommen kann [101]. Durch diese Limitation kann es jedoch auch zur fehlenden Eradikation von Pathogene und damit zur Chronifizierung von Infektionen führen [102]. IL-10 spielt über seinen regulatorischen Einfluss auf Immunzellen und Reduktion der Sekretion von proinflammatorischen Zytokinen ebenfalls eine wichtige Rolle in der Entwicklung von Autoimmunpathologien [102].

Das Zytokin TGF- β ist entscheidend in Prozesse der Immunität, Inflammation, Krebs und Fibrose eingebunden, in denen es scheinbar paradoxe Funktionen übernehmen kann [103]. Es besitzt pleiotrope Effekte auf die adaptive Immunität, insbesondere in der Regulation von T-Zellen. Bei TGF- β wird zunächst ein inaktiver Komplex gebildet, der für die Vermittlung seiner Effekte aktiviert werden muss [104]. Das Zytokin kann gegensätzliche biologische Aktivität in der Regulation von Zellfunktion, Proliferation, Differenzierung und Migration vermitteln. Nahezu jede Zelle kann auf TGF- β reagieren sowie TGF- β produzieren. Darüber hinaus ist TGF- β selbst durch verschiedene Mechanismen reguliert, seine duale Funktion ist abhängig von dem Umgebungsmilieu (Zytokinen), vom Differenzierungsstatus der Zellen sowie vom Level der TGF- β Konzentration [105]. In der initialen Phase wirkt es lokal proinflammatorisch mit der Rekrutierung und Aktivierung von Monozyten, später fördert es die Resolution der Inflammation und im Zusammenspiel mit differenzierten Makrophagen dominieren immunsuppressive Effekte (Suppression der proinflammatorischen Zytokinproduktion) [106]. Das Zytokin scheint Makrophagen eher in Richtung M2 zu polarisieren, fördert die Phagozytosefähigkeit und reduziert die inflammatorische Reaktion [107]. Es induziert zudem eine periphere Immuntoleranz, indem es die Proliferation und Differenzierung von autoreaktiven T-Zellen inhibiert. Somit schützt das anti-inflammatorische Zytokin auch vor autoreaktiven T-Zellen, die Autoimmunität verursachen können [101].

1.5 Zielsetzung der Arbeit

Bei systemisch rheumatischen Erkrankungen wie RA und SLE ist das kardiovaskuläre Risiko im Vergleich zur Allgemeinbevölkerung erhöht und klinische wie subklinische Formen von Atherosklerose treten häufiger auf [108]. Ein möglicher Einflussfaktor ist die Prägung der Monozyten/Makrophagen durch Serummediatoren zu einem Phänotyp, der die Bildung von Atherosklerose fördert. Daher untersucht die vorliegende Arbeit die Fähigkeit der Patientenserum, Makrophagen zu differenzieren, sowie zu verschiedenen Phänotypen zu polarisieren. Als Vergleich dienen gesunde Probanden und Patienten mit der nicht rheumatischen Erkrankung Osteoarthritis.

Nach der Hypothese dieser Arbeit lässt sich mit Serum von Patienten mit SLE und RA im Vergleich zu Gesunden und OA vermehrt eine Polarisation zum Atherosklerose fördernden Phänotyp M1 beobachten.

2 Material und Methoden

2.1 Studiendesign

Es handelte sich bei dem vorliegenden Projekt um die grundlagen-experimentelle Erhebung von Daten im Sinne einer Querschnittsstudie. Ziel war die Stimulation von humanen Monozyten mit Serum von Patienten bzw. Probanden zu Makrophagen sowie deren genaue Analyse. Das Material für die Isolation humaner Monozyten stammte aus dem venösen Blut gesunder Probanden. Die Seren waren neben den gesunden Probanden von Patienten mit systemisch rheumatischer Erkrankung (SLE, RA) oder OA. Die Verwendung der Patientenserum für die Studie wurde unter der Studiennummer 2018-171-KFogU von der Ethikkommission des Universitätsklinikums Düsseldorf genehmigt. Die Blutentnahme erfolgte im Rahmen einer Routinelaboruntersuchung. Über die Verwendung des Materials für Forschungszwecke waren die Patienten aufgeklärt und haben ihr schriftliches Einverständnis gegeben. Für die Verwendung des Blutes der gesunden Probanden lag ein positiv beschiedenes Ethikvotum mit der Studiennummer 2018-296-KFogU vor. Die Probanden wurden über die Studie und die Verwendung des Blutes für Forschungszwecke aufgeklärt und haben ihr schriftliches Einverständnis gegeben.

2.2 Studienkollektiv

Als Einschlusskriterien für die Probandengruppe galten Volljährigkeit (> 18 Jahre), Einwilligungsfähigkeit und klinische Infektionsfreiheit. Ausschlusskriterien waren ein fehlendes Einverständnis, Minderjährigkeit und das Vorliegen einer chronischen Infektionserkrankung (insbesondere HIV oder chronische Hepatitis), ausgeprägter Anämie oder einer systemisch rheumatischen Erkrankung, letzteres für die Gruppe der OA-Patienten und der gesunden Probanden. Für die Stimulation der Monozyten wurden 20 Seren von Patienten mit RA, fünf Seren von Patienten mit SLE, elf Seren von Patienten mit OA und 20 Seren von gesunden Probanden verwendet. Das Geschlechterverhältnis weiblich zu männlich betrug in der Gruppe mit RA 15:5 mit einem durchschnittlichen Alter von 57,2 Jahren (SD +/-19,44), in der Gruppe mit SLE 5:0 mit einem durchschnittlichen Alter von 36,4 Jahren (SD +/-6,68), in der

Gruppe mit OA 5:6 mit einem durchschnittlichen Alter von 68,3 Jahren (SD +/-8,32) und in der Gruppe der Gesunden 16:4 mit einem durchschnittlichen Alter von 23,8 Jahren (SD +/-0,41).

2.3 Versuchsaufbau

Die humanen Monozyten wurden von gesunden Spendern aus venösem EDTA-Blut durch magnetische Zellseparation gewonnen. Die Stimulation mit den Seren der Patienten, Probanden sowie mit FBS erfolgte für sieben Tage in den Konzentrationen 20 % und 40 %. Für die beiden Phänotypen M1 und M2 wurden die Monozyten fünf Tage mit dem Wachstumsfaktor M-CSF in Kulturmedium mit 10 % FBS zu Makrophagen differenziert. Anschließend wurden die Zellen zwei weitere Tage mit den Zytokinen IL-4 und IL-13 bzw. LPS und IFN- γ polarisiert (s. Abb. 2).

Die Stimulation der Monozyten mit Zytokinen zu M1 und M2 diente als Maßstab für die Zuordnung der unter Serum ausgebildeten Makrophagen zu einem Phänotyp. Die Identifikation der Phänotypen wurde anhand der Oberflächenmarker CD14, CD16, CD86, CD206 und CD163 mittels Durchflusszytometrie vorgenommen. Die Expression der Oberflächenmarker wurde nach sieben Tagen Stimulation gemessen. Zur genaueren Einordnung der Phänotypen wurden mittels ELISA die Konzentrationen der Entzündungsmediatoren IL-10, IL-6, TNF- α und TGF- β in den Zellkulturüberständen nach sieben Tagen Stimulation analysiert.

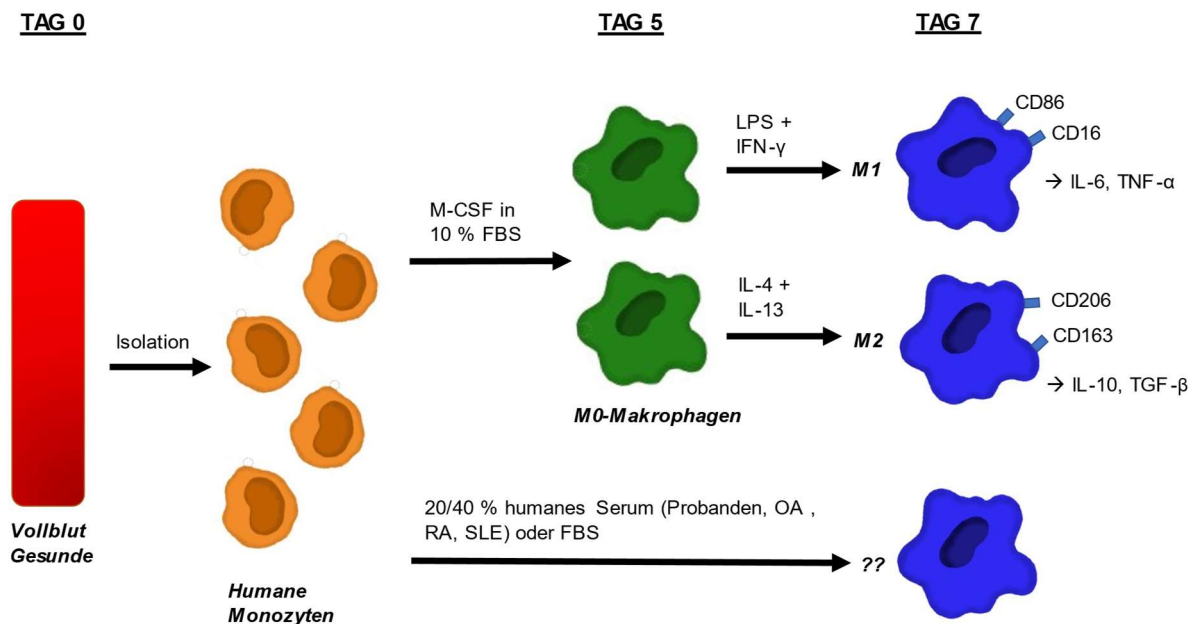


Abb. 2: Versuchsaufbau Makrophagendifferenzierung

Isolation humaner Monozyten aus 30 mL Vollblut gesunder Probanden. Stimulation der Monozyten mit 20 % sowie 40 % humanen Serum der Probanden und Patienten mit Osteoarthritis (OA), rheumatoider Arthritis (RA) sowie systemischem Lupus erythematoses (SLE) oder fetalem bovines Serum (FBS) im Kulturmedium für sieben Tage und Differenzierung zu Makrophagen unbestimmten Phänotyps. Zeitgleich Stimulation von Monozyten mit 10 ng/mL *monocyte colony stimulating factor* (M-CSF) in Kulturmedium mit 10 % FBS für fünf Tage zu nicht polarisierten Makrophagen (M0). Anschließend Stimulation für zwei weitere Tage mit Lipopolysaccharid (LPS) und Interferon gamma (IFN-γ) für die Ausbildung des Phänotyps M1 und mit den Zytokinen Interleukin 4 (IL-4) und Interleukin 13 (IL-13) für den Phänotyp M2. Charakterisierung des Phänotyps M1 anhand der Oberflächenmarker CD86 und CD16 sowie anhand der Zytokinproduktion von Interleukin 6 (IL-6) und Tumornekrosefaktor alpha (TNF-α). Charakterisierung des Phänotyps M2 anhand der Oberflächenmarker CD206 und CD163 sowie anhand der Zytokinproduktion von Interleukin 10 (IL-10) und *transforming growth factor beta* (TGF-β).

2.4 Isolation humaner Monozyten

2.4.1 Ausgangsmaterial und Versuchsaufbau

Die humanen Monozyten wurden aus dem venösen Blut gesunder Probanden gewonnen. Die Blutentnahme erfolgte zu je 30 mL EDTA-Vollblut (Vacutainer K2E (EDTA), 367525, 10 mL, BD Biosciences, Franklin-Lakes, USA) und 10 mL Serum (Vacutainer, SST II Advanced Serum 5 mL, BD Biosciences, Franklin-Lakes, USA). Die Proben zur Gewinnung der Monozyten wurden unverzüglich verarbeitet. Als Puffer wurde eine Lösung mit den Inhaltsstoffen BSA, EDTA, PBS, *Na-Azide* verwendet (AutoMACS Running Buffer, 130-091-221, Miltenyi Biotec, Bergisch

Gladbach, Deutschland). Zur Analyse im MACS Quant Analyzer verwendeten wir den Puffer ohne BSA (MACSQuant Running Buffer, 130-092-741, Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Deutschland). Die Gewinnung der PBMCs erfolgte über Zentrifugation mit einem Trenngel (Lymphoprep, A80102010, Alere Technologies, Oslo, Norwegen). Anschließend wurden noch enthaltene Plättchen und Erythrozyten durch Waschrinne und Lyse (Red Blood Cell Lysis Solution 10x, 130-094-183, Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Deutschland) eliminiert. Zur Isolation der Monozyten wurde eine negative Selektion benutzt, bei der sämtliche nicht monozytäre Zellen mit Antikörpern markiert werden (Pan monocyte isolation kit human, 130-096-537, Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Deutschland). An den Antikörpern ist Biotin gekoppelt, an das Streptavidin bindet. Streptavidin trägt einen magnetischen Anteil, über den die markierten Zellen im Filter haften. Die unmarkierten Monozyten werden im Durchfluss aufgefangen.

2.4.2 Praktisches Vorgehen

Alle Arbeitsschritte zur Isolation der Monozyten aus EDTA-Vollblut wurden unter sterilen Bedingungen durchgeführt. Das EDTA-Blut wurde im Verhältnis 1:1 mit Pufferlösung verdünnt und in ein Röhrchen mit Trenngel überführt. Nach Zentrifugation (Rotina 420 R, Hettich, Tuttlingen, Deutschland) für 20 Minuten ohne Bremse bei 800 g und Raumtemperatur wurde der entstandene Ring aus mononukleären Zellen des peripheren Blutes (PBMCs) abgenommen. In einem Waschrinne wurden die Zellen und Pufferlösung mit 300 g für zehn Minuten bei 8 °C zentrifugiert und mit *red blood cell lysis* nach Herstellerprotokoll behandelt, um verbliebene Erythrozyten zu eliminieren. Die Zellen wurden erneut gewaschen und in der Verdünnung 1:20 in der Durchflusszytometrie (MACS Quant Analyzer 10, Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Deutschland) gezählt. Anschließend wurde die Probe bei 300 g für zehn Minuten zentrifugiert.

Zur Isolation der Monozyten wurden die PBMCs mit 40 µL Pufferlösung pro 10^7 Zellen resuspendiert sowie mit je 10 µL pro 10^7 Zellen FcR-Block und Biotin-Antikörpercocktail gefärbt. Die Probe wurde anschließend für fünf Minuten in Dunkelheit bei 4 °C inkubiert. Die Zellen wurden erneut mit 30 µL Pufferlösung pro 10^7 Zellen verdünnt und mit 20 µL *Anti Biotin Micro Beads* pro 10^7 Zellen gefärbt. Während der Inkubationszeit von zehn Minuten bei 4 °C in Dunkelheit wurde der Filter der MACS Quant Zellseparation (Quadro Macs Multi Stand, Miltenyi Biotec,

Bergisch Gladbach, Deutschland) mit 3 mL Pufferlösung äquilibriert. Der Durchfluss wurde verworfen. Zur magnetischen Separation wurde die markierte Zelllösung auf die Filtersäule gegeben und dreimal mit je 3 mL Pufferlösung gespült. Die Anzahl der gewonnenen Zellen wurde mittels Durchflusszytometrie gezählt.

2.5 Stimulation humaner Monozyten

2.5.1 Ausgangsmaterial

Für die Stimulation zu Makrophagen wurden die Monozyten der gesunden Probanden unmittelbar nach Isolation verwendet. Die Seren der gesunden Probanden wurden nach Gerinnung bei 300 g für zehn Minuten zentrifugiert, aliquotiert und eingefroren (Megafuge 16R, Heraeus Instruents, Hanau, Deutschland). Als Kulturmedium diente RPMI 1640 (GlutaMAX Supplement, 61870-036, Gibco/Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA) mit 100 U/mL Penicillin, 100 µg/mL Streptomycin (Penicillin/Streptomycin, 15240-122, Gibco/Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA), 1 % nicht essentielle Aminosäuren (MEM Non-essential amino acid solution 11140-035, Gibco/Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA), 1 % Natriumpyruvat (Sodium Pyruvate, 11360-039, 100x, 100mM, Gibco/Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA) und 0,1 % humanem Insulin (Insulin human, I9278-5ML, Sigma-Aldrich, St. Louis, USA). Je nach Versuchsansatz wurde zum Kulturmedium FBS (Fetal Bovine Serum, heat inactivated, 10500-064, Gibco/Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA) oder humanes Serum der Probanden oder Patienten hinzugegeben. Für die M1/M2-Polarisation wurde zunächst mit dem Wachstumsfaktor M-CSF (Human M-CSF, 216-MC-005, R&D-Systems, Minneapolis, USA) differenziert und je nach Stimulation die human rekombinanten Zytokine IL-4 (1403-010, Cell-Genix, Freiburg, Deutschland), IL-13 (1039HNAC5, Life Technologies/Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA), IFN-γ (PHC4031, Life Technologies/Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA) sowie LPS (Lipopolysaccharide from *Escherichia coli*, L2630, Sigma-Aldrich, St. Louis, USA). Der Wachstumsfaktor M-CSF, die Zytokine und LPS wurden nach Herstellerangaben rekonstituiert. Die *Aliquots* der Faktoren wurden bei -20 °C bzw. IFN-γ bei -80 °C gelagert und unmittelbar vor der Stimulation auf Eis aufgetaut. Die

humanen Seren und das FBS wurden im Wasserbad aufgetaut und dem Medium zugegeben.

2.5.2 Praktisches Vorgehen

Die Bereitstellung sämtlicher Reagenzien und die Durchführung der Stimulation erfolgte unter sterilen Bedingungen. Die Zellen wurden mit einer Konzentration von 4×10^5 pro mL in eine Platte mit 96 Vertiefungen (*wells*) mit rundem Boden ausgesät. In jedes *well* wurden zunächst 125 μ L Zellsuspension in einer Konzentration von 8×10^5 pro mL gegeben. Die *wells* wurden anschließend mit 125 μ L des jeweiligen Stimulationsansatzes aufgefüllt und im Brutschrank (Heraeus Instrument, Function Line, Hanau, Deutschland) bei 37 °C und 5 % CO₂ für insgesamt sieben Tage inkubiert.

Für die Differenzierung der Phänotypen M1 und M2 wurden die Monozyten mit dem Wachstumsfaktor M-CSF in der Konzentration 100 ng/mL in Medium mit 10 % FBS stimuliert. In den Patientengruppen bzw. der Probandengruppe wurde das serumfreie Kulturmedium mit 20 % und 40 % Serum versetzt.

Die Zugabe der Zytokine in den mit M-CSF stimulierten *wells* erfolgte nach fünf Tagen. Die Konzentration der Zytokine IL-4 und IL-13 für den Phänotyp M2 betrug je 1 ng/mL. Für die Differenzierung zum Phänotypen M1 wurde IFN- γ in der Konzentration 1 ng/mL und LPS in 1 μ g/mL verwendet (s. Abbildung 3). Die Stimulation mit den Zytokinen erfolgte für weitere zwei Tage. Die Zellen der Serumproben wurden für sieben Tage stimuliert. Jede Stimulation wurde vierfach angelegt, je zwei *wells* für die Antikörper- und die Isotypfärbung. Die Kombination von Wachstumsfaktor und Zytokinen, der zeitliche Abstand zwischen M-CSF und Zytokinen, sowie die Gesamtdauer der Stimulation wurden in Vorversuchen ermittelt und für den Versuchsaufbau optimiert. Des Weiteren wurden die benötigten Konzentrationen des M-CSF, der Zytokine sowie des Serums vorab getestet.

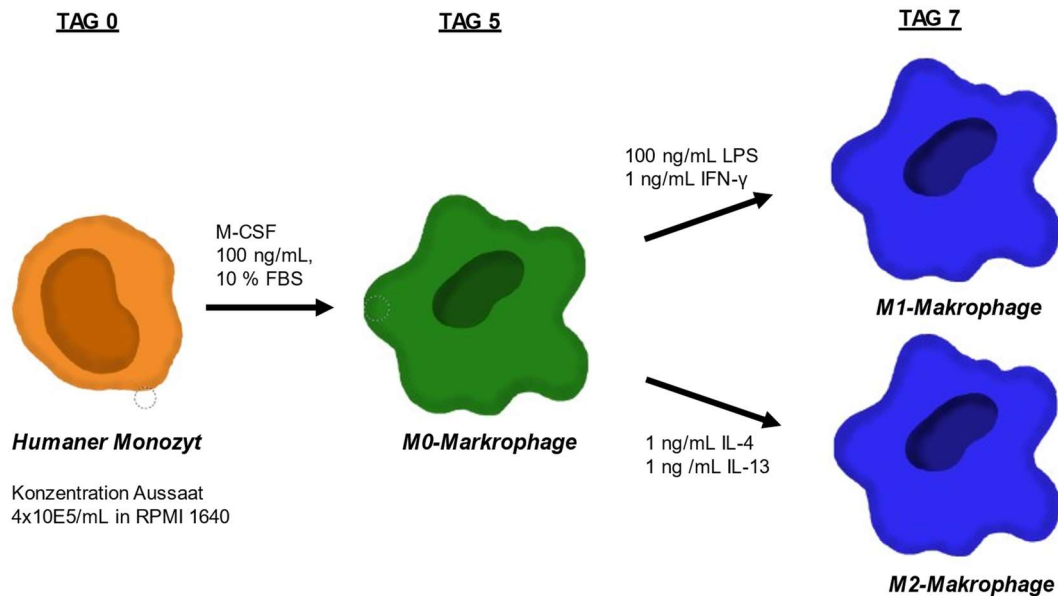


Abb. 3: Versuchsaufbau Zytokinstimulation M1/M2

Aussaat der isolierten humanen Monozyten aus peripherem Blut in der Konzentration 4×10^5 /mL in RPMI 1640 mit 10 % fetalem bovinem Serum (FBS) und 100 ng/mL *monocyte colony stimulating factor* (M-CSF) zur Differenzierung von unpolarisierten Makrophagen (M0). Nach fünf Tagen Stimulation mit 100 ng/mL Lipopolysaccharid (LPS) und 1 ng/mL Interferon gamma (IFN- γ) zu M1-Makrophagen und mit je 1 ng/mL Interleukin 4 (IL-4) und Interleukin 13 (IL-13) zu M2-Makrophagen. Inkubation für insgesamt sieben Tage im Brutschrank bei 37 °C und 5 % Kohlendioxid (CO₂).

2.6 Bestimmung Oberflächenmarker

2.6.1 Durchflusszytometrie

Die Bestimmung der Expression von Oberflächenmarkern erfolgte über die Durchflusszytometrie (FACS). Bei der Durchflusszytometrie handelt es sich um ein Verfahren zur Bestimmung der Anzahl und zur weiteren Analyse von Zellen. Die Zellen werden einzeln von einem Laserstrahl erfasst und gezählt. Je nach Größe und Granularität der Zelle verändert sich die Streuung des Lichtes. Der *forward scatter* (FSC) gibt Auskunft über die Größe der untersuchten Zelle. Der *sideward scatter* (SSC) spiegelt ihre Granularität wider. Auf Grund dieser Daten lassen sich die Zellen zählen und in Populationen unterteilen.

Darüber hinaus kann die Zelle mit an Antikörper gebundenen Fluoreszenzfarbstoffen gefärbt und auf weitere Eigenschaften untersucht werden. Dafür werden monochromatische Laser verwendet. Jedes Fluorochrom wird nur in einem bestimmten Wellenlängenbereich angeregt, dem Absorptionsspektrum. Das

Emissionsspektrum wird durch das abgegebene Licht gebildet, das durch die Energieübertragung langwelliger als das ursprünglich eingestrahlt Licht ist. Das Messergebnis ist abhängig von der Konzentration des gebundenen Antikörpers. Da sich die Emissionsspektren der einzelnen Fluorochrome unterscheiden, lassen sich mehrere Farbstoffe in einer Messung verwenden. Beim MACS Quant Analyzer 10 lassen sich bis zu acht verschiedene Fluorochrome verwenden (s. Tabelle 1). In der Kompensation werden die Messwerte herausgerechnet, die durch Überschneidung in den Emissionsspektren hervorgerufen werden.

Tabelle 1: Übersicht Kanäle FACS

Miltenyi Biotec	Channel	Laser [nm]	Expiration [nm]	Emiration [nm]
VioBlue	V1	Violet 405	400	452
Vio Green	V2	Violet 405	388	520
FITC	B1	Blue 488	495	519
PE	B2	Blue 488	565	578
PerCP	B3	Blue 488	490	675
PE-Vio770	B4	Blue 488	565	775
APC	R1	Red 635	650	660
APC-Vio770	R2	Red 635	652	775

Wellenlängen der Expiration und Emiration in Bezug auf die verschiedenen Fluorochrome und Kanäle mit den zugehörigen Lasern am MACS Quant Analyzer 10 (Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Deutschland) in Nanometern [nm].

2.6.2 Übersicht Antikörper

Für die Detektion der Expression von Oberflächenmarkern wurden fünf verschiedene Antikörper verwendet und auf den entsprechenden Kanälen gemessen. Die hier verwendeten Antikörper sind mit ihrem entsprechendem Isotyp und Konjugat in Tabelle 2 aufgelistet.

Tabelle 2: Übersicht Antikörper und Isotypen

Antikörper human	Isotyp Kontrolle	Konjugat
CD206 human (130-100-034)	Mouse IgG1 (130-094-878)	VioBlue
CD86 human (130-094-878)	Mouse IgG1 (130-092-213)	FITC
CD163 human (130-097-628)	Mouse IgG1 (130-092-212)	PE
CD14 human (130-091-243)	Mouse IgG2a (130-091-836)	APC
CD16 REA (130-106-707)	REA Control S (130-113-435)	APC-Vio770

Humane Antikörper zur Bestimmung der Makrophagenphänotypen mit ihren Isotypkontrollen und dem assoziiertem Fluorochrom unter Angabe der Bestellnummer (Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Deutschland).

2.6.3 Färbung Zellen

Die Platte mit den stimulierten Zellen wurde nach sieben Tagen bei 300 g und 8 °C für zehn Minuten zentrifugiert (Rotina 420 R, Hettich, Tuttlingen, Deutschland). Der Überstand wurde abgesaugt bzw. für weitere Analysen abgenommen und bei -20 °C eingefroren. Die Zugabe von 25 µL Accutase (StemPro, A11105-01, Life Technologies/Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA) pro *well* bewirkte nach 15 Minuten Inkubation ein Ablösen der Makrophagen von der Wand der Platte unter mikroskopischer Kontrolle. Anschließend wurde die Platte zentrifugiert, der Überstand abgesaugt und das Zellpellet in 20 µL Pufferlösung resuspendiert. Es wurden 2 µL Fc-Rezeptorblock (FcR-Blocking Reagent human, 130-059-901, Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach Deutschland) pro *well* zugegeben und für zehn Minuten bei 4 °C ohne Licht inkubiert. Die Zellen wurden zunächst mit 2 µL CD206-Antikörpern gefärbt. Nach der Inkubation für zehn Minuten wurden die anderen Antikörper hinzugegeben. Die Konzentration der CD14-, CD16-, CD86-Antikörper betrug ebenfalls 2 µl pro *well*, dies Konzentration des CD163-Antikörpers betrug 1,5 µl pro *well*. Die Inkubation von CD206 vor den anderen Antikörpern wurde in Vorversuchen etabliert. Im Vergleich zur Einzelfärbung mit CD206 ergab in der gleichzeitigen Färbung mit den fünf Antikörpern die Vorinkubation mit CD206 exaktere Werte. Ebenso wurden die Herstellerangaben in Bezug auf die Konzentrationen der Antikörper für das hier verwendete Versuchsprotokoll optimiert. Die niedrigere Konzentration von CD163 im Vergleich zu den anderen Antikörpern zeigte in der gemeinsamen Färbung im Vergleich zur Einzelfärbung exaktere Ergebnisse. Die Isotypen wurden in den gleichen Konzentrationen wie die

entsprechenden Antikörper verwendet. Die Antikörper und die Isotypen wurden für zehn Minuten bei 4 °C ohne Licht inkubiert. Als letztes wurden die Zellen mit 150 µL Pufferlösung gewaschen und für zehn Minuten bei 300 g und 8 °C zentrifugiert. Der Überstand wurde abgesaugt und die Zellen in 200 µL Pufferlösung für die Messung gelöst.

2.6.4 Messung FACS

Für die Messung der gebundenen Antikörper wurde eine Kompensation verwendet, die überlappende Spektren der verwendeten Laser herausrechnet. Der *Trigger* war auf 16,30 V eingestellt, der *forward scatter* (FSC) auf 270 V und der *sideward scatter* (SSC) auf 325 V. Unmittelbar vor der Messung des jeweiligen *well*s wurde Propidium Iodid (PI, 130-093-233, Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach Deutschland) automatisiert (Titer 1:100) in das *well* pipettiert. Dies diente zur Markierung der toten Zellen. Die Einstellungen der monochromatischen Laser nach Kompensation sind in Tabelle 3 dargestellt. Das Gerät wurde nach Herstellerangaben regelmäßig kalibriert.

Tabelle 3: Einstellungen Laser je Kanal

B1	B2	B3	B4	V1	R1	R2
372 V	398 V	395 V	381 V	357 V	350 V	342 V

Angabe der Einstellungen der monochromatischen Laser am MACS Quant Analyzer 10 für die Kanäle B1-R2 in Volt [V] nach Kompensation der Kanäle zu den verwendeten Antikörpern.

2.7 Auswertung der Rohdaten und *Gating* Strategie

Zur Auswertung der Rohdaten wurde das Programm FlowLogic (Version 7.3, Inivai Technologies, Mentone Victoria, Australien) verwendet. Zunächst wurde die Makrophagenpopulation anhand der Zuordnung durch FSC und PI (Färbung für tote Zellen) mit einem ellipsenförmigen *Gate* ausgewählt. Bei den Messwerten außerhalb der Populationsauswahl zeigte sich keine Expression der verschiedenen Oberflächenmarker für Makrophagen (tote Zellen, Zelltrümmer). Das *Gate* der Makrophagen wurde für alle Versuche übernommen und je nach Stimulation für die Populationsverteilung optimiert. Ein Beispiel für die Populationsauswahl ist in Abbildung 4 dargestellt. Der Anteil der Makrophagen im *Gate* an allen Zählungen wurde in Prozent gespeichert. Zu den Stimulationen wurden pro Versuch die *Mean Flourescence Intensity* (MFI) der verschiedenen Marker für die Zellen der Populationsauswahl erfasst.

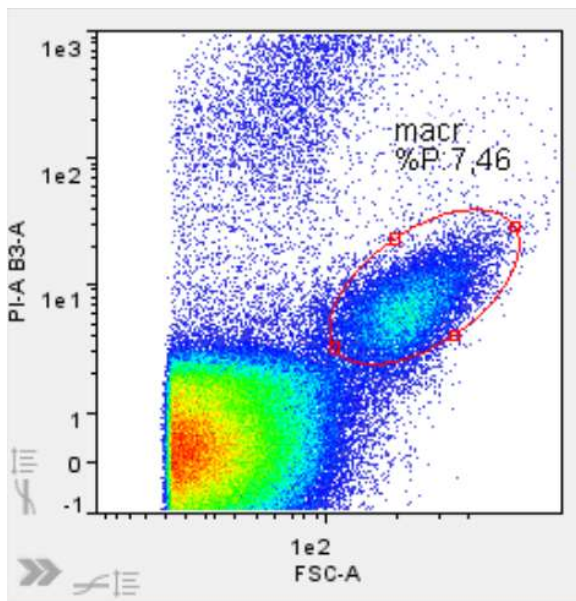


Abb. 4: Gatingstrategie nach FSC und PI

Beispiel einer Populationsauswahl für Makrophagen nach FSC auf der x-Achse und PI auf der y-Achse. Angabe des prozentualen Anteils an allen gezählten *Events*. Abbildung aus Flow Logic (Version 7.3, Inivai Technologies, Mentone Victoria, Australien). FSC *forward scatter*, PI Propidiumiodid.

2.8 Zytokinmessung im Überstand mittels ELISA

In den Kulturüberständen wurden die Zytokinspiegel von IL-6 (555220, BD Biosciences, Franklin-Lakes, USA), IL-10 (88-7106-88, Affymetrix/Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA), TFN- α (DY210-10, R&D Systems, Minneapolis, USA) und TGF- β (DY240-05, BioTechne, Minneapolis, USA) nach sieben Tagen Stimulation mittels *enzyme-linked immunosorbent assay* (ELISA) bestimmt. Die Arbeitsschritte wurden nach Herstellerangaben durchgeführt bzw. die Konzentrationen wurden an die verwendeten Proben angepasst.

2.8.1 Zytokinassay IL-6

Im ersten Schritt wurde eine Platte mit 96 Vertiefungen mit 100 μ L Puffer aus 1:300 *Capture Antibody* in einem Carbonat-Bicarbonat Puffer (C3041, Sigma-Aldrich, St. Louis, USA) über Nacht bei 4 °C beschichtet. Am nächsten Tag wurde die Platte dreimal mit Waschpuffer aus 0,05 % Tween-20 (P91416, Sigma-Aldrich, St. Louis, USA) in PBS (*phosphate buffered saline* pH 7,4 10x, 70011-051, Gibco/Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA) gewaschen und mit 100 μ L der vorgegebenen Blocklösung pro *well* für eine Stunde bei Raumtemperatur inkubiert. Die optimale Konzentration der aufgetauten Zellüberstände wurde vor Beginn der Versuche in einer Verdünnungsreihe getestet. Sie betrug bei den M1-stimulierten Zellen 1:20 und bei den anderen Stimulationen 1:10. Die geblockte Platte wurde dreimal gewaschen und 50 μ L Standard bzw. 50 μ L verdünnter Zellüberstand wurde in die *wells* pipettiert. Nach zwei Stunden Inkubation bei Raumtemperatur wurde die Platte zweimal gewaschen und mit 50 μ L Detektionsantikörper für eine weitere Stunde inkubiert. Anschließend wurde die Platte siebenmal gewaschen. Als Entwicklerlösung wurden 50 μ L TMB (Tetramethylbenzidin, T4444-4X100ML, Sigma-Aldrich, St. Louis, USA) pro *well* hinzugegeben. Nach 30 Minuten in Dunkelheit wurde die Farbreaktion mit 25 μ L Schwefelsäure beendet. Die Messung der Absorption erfolgte im ELISA-Reader (*iMark Microplate Absorbance Reader*, Bio-Rad Laboratories, Hercules, USA) bei 450 nm.

2.8.2 Zytokinassay IL-10

In einem Vorbereitungsschritt wurde eine Platte mit 96 Vertiefungen mit der im *Kit* vorgegebenen Lösung (*capture* Antikörper) bei 4 °C über Nacht beschichtet. Am Messtag wurde die Platte dreimal gewaschen (Waschpuffer 0,05 % Tween-20 in

PBS) und mit 100 μL Blocklösung des *Kits* pro *well* für eine Stunde bei Raumtemperatur inkubiert. Nach dreimaligem Waschen wurde 50 μL Standard bzw. 50 μL Probe in die *wells* pipettiert und für zwei Stunden inkubiert. Anschließend wurde die Platte fünfmal gewaschen und mit 50 μL Detektionsantikörpern für eine Stunde bei Raumtemperatur inkubiert. Danach wurde die Platte fünfmal gewaschen und mit 50 μL Avidin-HRP pro *well* 40min inkubiert. Der letzte Waschschrift wurde siebenmal wiederholt und 50 μL TMB hinzugegeben. Nach 15 Minuten wurden 50 μL Schwefelsäure in die *wells* pipettiert und die Platte bei einer Wellenlänge von 450 nm gemessen.

2.8.3 Zytokinassay TNF- α

Zur Bestimmung von TNF- α wurde eine Platte mit 96 Vertiefungen mit 10 μL der vorgegebenen Lösung (*capture* Antikörper) pro *well* bei Raumtemperatur über Nacht beschichtet. Am Versuchstag wurde die Platte dreimal gewaschen und mit 250 μL Blocklösung des *Kits* versehen. Nach einer Stunde wurde der Block dreimal gewaschen und 50 μL Standard oder Proben pro *well* pipettiert. Die Platte wurde für zwei Stunden inkubiert, dreimal gewaschen und 50 μL Detektionsantikörper pro *well* hinzugegeben. Dieser wurde nach zwei Stunden bei Raumtemperatur dreimal ausgewaschen. 50 μL Streptavidin-HRP wurden für 20 Minuten in Dunkelheit inkubiert und ebenfalls dreimal ausgewaschen. Von der Entwicklerlösung des *Kits* wurden 50 μL pro *well* pipettiert und 20 Minuten in Dunkelheit inkubiert. Zum Beenden der Farbreaktion wurden 25 μL der vorgegebenen Lösung hinzugegeben. Die Platte wurde bei 450 nm gemessen.

2.8.4 Zytokinassay TGF- β

Für die TGF- β Bestimmung wurde eine Platte mit 96 Vertiefungen mit 100 μL *Capture* Antikörper in Puffer (1:120) pro *well* über Nacht bei Raumtemperatur inkubiert. Die Platte wurde vor der weiteren Verarbeitung dreimal gewaschen und mit 240 μL Blocklösung (5 % Tween-20 in PBS) für eine Stunde inkubiert. Die Proben wurden abhängig von ihrem durch die Stimulation enthaltenem Serumanteil mit Salzsäure (1N, HCl) vorbereitet. Auf 50 μL der M1/M2-Überstände mit 10 % Serum (FBS) wurden 10 μL HCl gegeben, auf je 20 μL der serumstimulierten Proben wurden bei den mit 20 % versehenen Proben 4 μL HCl und 5 μL auf die 40 %ige Serumkonzentrationen gegeben. Die Proben wurden gut gemischt und

zehn Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Zu den Proben wurde nach der Inkubationszeit die gleiche Menge Natriumhydroxid (NaOH) wie zuvor HCl pipettiert. Die vorbereiteten Proben wurden unverzüglich zu je 50 µL auf die dreimal gewaschene Platte pipettiert, ebenso die Standards. Nach zwei Stunden Inkubation bei Raumtemperatur wurde die Platte dreimal gewaschen und mit 50 µL Detektionsantikörpern für zwei Stunden bei Raumtemperatur inkubiert. Im Anschluss an den dreimaligen Waschschrift wurden 50 µL Streptavidin-HRP für weitere 30 Minuten in jedes *well* gegeben. Die Platte wurde erneut dreimal gewaschen und mit 50 µL Entwicklerlösung des *Kits* für 20 Minuten bei Raumtemperatur in Dunkelheit inkubiert. Die Reaktion wurde mit 25 µL der vorgegebenen Lösung beendet und die Platte bei einer Wellenlänge von 450 nm gemessen.

2.9 Statistische Analyse

Vor der statistischen Analyse wurden die Werte der Isotypkontrollen von dem jeweiligen Antikörper in Excel (Version 16.0.13801.20240, Microsoft, Redmond, USA) abgezogen, um den Anteil der unspezifischen Bindung aus den Daten zu eliminieren. Die Differenz der Werte wurde zur weiteren Analyse verwendet.

Die Daten wurden mit SPSS Statistics Version 24.0.0.2 (IBM, Armonk, USA) analysiert. Dabei wurden nichtparametrische Tests zum Vergleich zwischen zwei (Mann-Whitney-U-Test) oder mehr Gruppen (Kruskal-Wallis-Test) verwendet. Des Weiteren wurde eine multinominale logistische Regression berechnet. Das Signifikanzniveau für die Analysen wurde auf $p < 0.05$ festgelegt. Das 95 % Konfidenzintervall wurde ebenfalls bestimmt. Die Durchführung der Random Forest Klassifikation erfolgte durch einen Statistiker mit dem Programm R (Version 4.0.3.) mit Angabe des 95 % Konfidenzintervalls. Die Ergebnisse der Analyse wurden für diese Arbeit zur Verfügung gestellt.

Die graphische Darstellung der Daten erfolgte mit Hilfe von Graph Pad Prism Version 6.01 (GraphPad Software, San Diego, USA) in *Boxplots* (Median, erstes Quartil, drittes Quartil, Antennen von Minimum bis Maximum) mit Einzelwertdarstellung in Punkten. Signifikante Unterschiede zwischen den Gruppen wurden mit horizontalen Strichen unter Angabe des p-Wertes gekennzeichnet.

3 Ergebnisse

3.1 Klinische Daten Patientengruppen

Tabelle 4 gibt eine Übersicht über die Durchschnittskonzentrationen der klinischen Parameter für die Patientengruppen OA, RA und SLE. Dabei zeigte der Entzündungsparameter C-reaktives Protein (CRP) bei der Gruppe RA mit 1,59 mg/dL (SD +/-2,166) den höchsten durchschnittlichen Wert und bei SLE mit 0,26 mg/dL (SD +/-0,209) den niedrigsten Wert. Die Werte der Patienten mit RA waren signifikant höher als bei SLE und OA (p je $< 0,001$; Kruskal-Wallis-Test). Bei den Leukozyten zeigt SLE mit $6,20 \times 1000/\mu\text{L}$ (SD +/- 3,700) den niedrigsten durchschnittlichen Wert, RA mit $7,36 \times 1000/\mu\text{L}$ (SD +/- 1,890) und OA mit $7,44 \times 1000/\mu\text{L}$ (SD +/- 1,622) wiesen ähnliche Werte auf, die Werte von SLE unterschieden sich hierbei zu RA ($p = 0,015$; Kruskal-Wallis-Test) und zu OA ($p = 0,002$). Beim Hämoglobin hatten die OA-Patienten mit 13,53 g/dL (SD +/-1,395) insgesamt den höchsten Wert, gefolgt von SLE mit 12,98 g/dL (SD +/-1,238) und RA mit 12,62 g/dL (SD +/-1,634). Die Hämoglobinwerte zwischen den Patienten mit RA und OA unterschieden sich nach Kruskal-Wallis-Test ($p = 0,015$).

Tabelle 4: Durchschnitt klinische Daten je Patientengruppe

Stimulation	CRP (+/-SD) [mg/dL]	Leukozyten (+/- SD) [x1000/ μL]	Hämoglobin (+/- SD) [g/dL]
OA	0,30 (+/- 0,246)	7,44 (+/- 1,622)	13,53 (+/- 1,395)
RA	1,59 (+/- 2,166)	7,36 (+/- 1,890)	12,62 (+/- 1,634)
SLE	0,26 (+/- 0,209)	6,20 (+/- 3,700)	12,98 (+/- 1,238)

Durchschnittskonzentrationen der Parameter C-reaktives Protein (CRP) in mg/dL, Leukozyten in $\times 1000/\mu\text{L}$ und Hämoglobin in g/dL für die Patientengruppen Osteoarthritis (OA), rheumatoide Arthritis (RA) und systemischem Lupus erythematodes (SLE) mit Standardabweichung (SD).

3.2 Makrophagenanteil

Der Makrophagenanteil gibt an, wie viel Prozent aller gezählten *Events* (lebende und tote Zellen, *Platelets*, Zelltrümmer o.ä.) im ausgewählten *Gate* lagen und daher definitionsgemäß Makrophagen waren. Der Makrophagenanteil war gemäß dem Shapiro-Wilk-Test nicht normalverteilt ($p < 0,001$). Für die Analysen wurden daher nichtparametrische Testverfahren angewandt.

3.2.1 Unterschied Zytokin- und Serumstimulation

Zwischen der Stimulation mit Zytokinen und der Stimulation mit 20 % und 40 % humanem Serum zeigte sich ein Unterschied im Makrophagenanteil ($p < 0,001$; Kruskal-Wallis-Test). Im paarweisen Vergleich (post-hoc Test Dunn-Bonferroni) bestand nach sieben Tagen unter Zytokinstimulation ein höherer Anteil differenzierter Makrophagenanteil als unter Stimulation mit 20 % humanem Serum ($p < 0,001$) oder mit 40 % Serum ($p < 0,001$). Im Vergleich zwischen 20 % und 40 % Serumstimulation bildete sich bei 40 % ein größerer Anteil Makrophagen aus ($p = 0,005$; s. Abbildung 5). Zwischen den Stimulationen für M1 und M2 zeigte sich im Anteil der differenzierten Makrophagen kein Unterschied ($p = 0,956$; Mann-Whitney-U-Test; Daten nicht dargestellt).

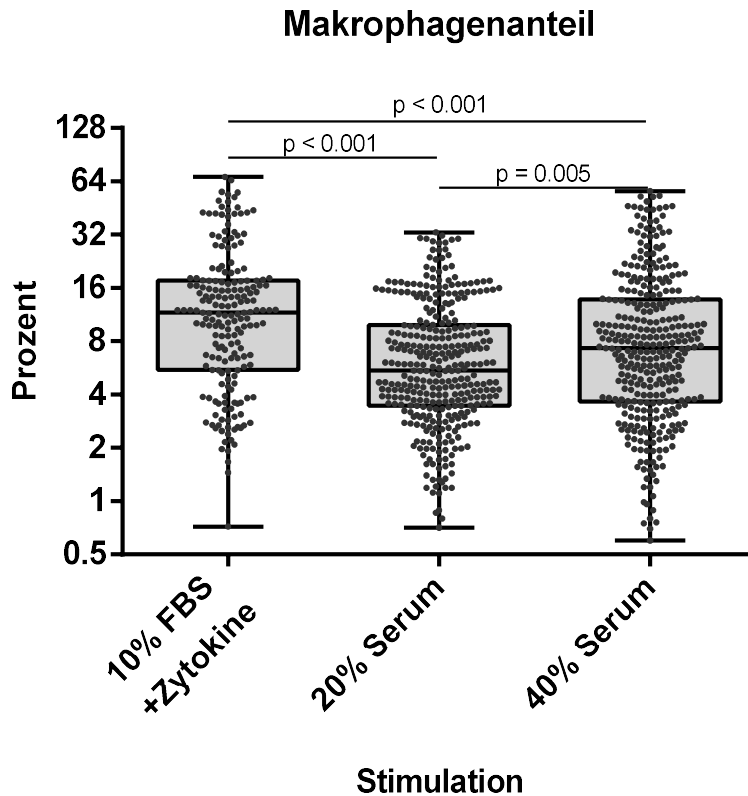


Abb. 5: Makrophagenanteil nach Zytokin- und Serumstimulation

Stimulation mit *monocyte colony stimulating factor* (M-CSF) und Zytokinen bzw. Lipopolysaccharid in 10 % fetal bovines Serum (FBS) sowie mit 20 % und 40 % Serum (56 humane Seren der Probanden/Patienten und 19 Proben FBS) in Kulturmedium auf gesunde humane Monozyten. Angabe des Anteils der lebenden Makrophagen bezüglich aller gezählten *Events* nach sieben Tagen Stimulation in der Durchflusszytometrie (FACS). Darstellung in *Box-Whisker-Plots* mit Median, oberem und unterem Quartil, *Whisker* von Minimum bis Maximum und Einzelwertdarstellung in Punkten. Makrophagenanteil in Prozent auf y-Achse (logarithmische Skalierung) und Darstellung der Stimulation auf der x-Achse. Signifikante Unterschiede zwischen den Gruppen sind als horizontale Striche unter Angabe des p -Wertes gekennzeichnet (Kruskal-Wallis-Test, post-hoc Dunn-Bonferroni).

3.2.2 Unterschiede je Stimulation bei 20 % Serum

Der Unterschied zwischen den verschiedenen Gruppen im Makrophagenanteil bei Stimulation mit 20 % Serum wurde mittels Kruskal-Wallis-Test berechnet und in Abbildung 6 dargestellt. Es stellte sich ein Unterschied in der Verteilung zwischen den Stimulationen dar ($p < 0,001$). Im paarweisen Vergleich (post-hoc Test Dunn-Bonferroni) wurde bei Stimulation mit dem Serum gesunder Probanden ein höherer Makrophagenanteil als bei der Stimulation mit FBS ($p < 0,001$) oder der Stimulation mit Serum von Patienten mit SLE ($p = 0,001$) festgestellt. Ebenso zeigte die Stimulation durch das Serum von Patienten mit RA zur Stimulation durch FBS ($p <$

0,001) und zur Stimulation durch das Serum von Patienten mit SLE ($p < 0,001$) einen höheren Anteil. Zudem wies die Stimulation durch das Serum von Patienten mit OA zur Stimulation durch FBS ($p < 0,001$) und SLE-Seren ($p < 0,001$) einen höheren Makrophagenanteil auf.

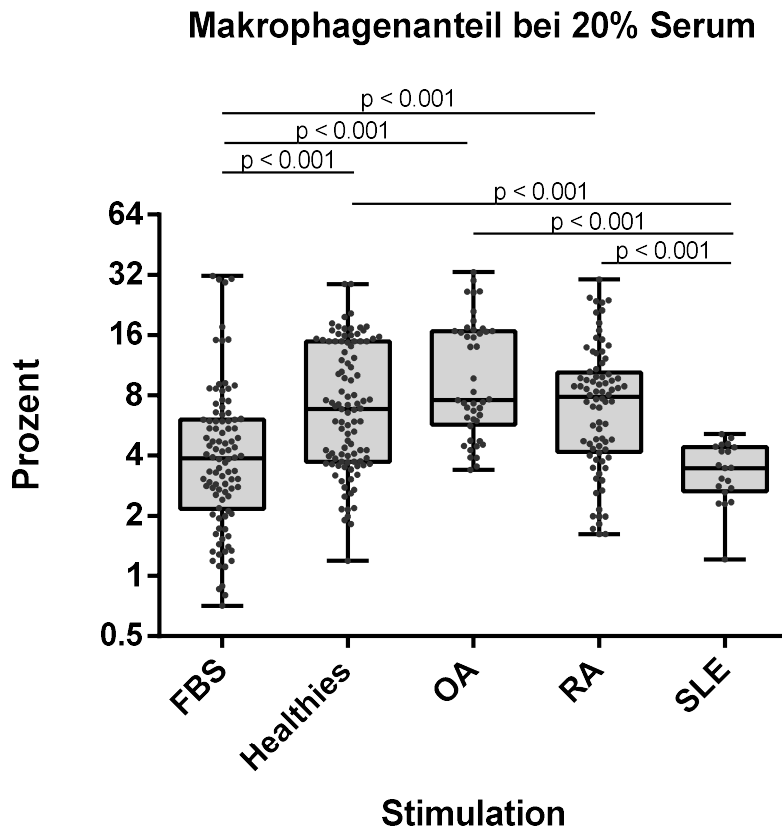


Abb. 6: Makrophagenanteil bei 20 % Serum

Einfluss der Stimulation mit 19 Proben fetal bovines Serumalbumin (FBS), dem Serum 20 gesunder Probanden (*Healthies*), dem Serum von 20 Patienten mit rheumatoider Arthritis (RA), 11 mit Osteoarthritis (OA) und 5 mit systemischem Lupus erythematoses (SLE) bei 20 % Serum im Kulturmedium auf die Ausbildung differenzierter Makrophagen aus Monozyten gesunder Probanden nach sieben Tagen. Darstellung in *Box-Whisker-Plots* mit Median, unterem und oberem Quartil, *Whiskers* von Minimum bis Maximum und Einzelwertdarstellung in Punkten. Anteil der Makrophagen an allen gezählten *Events* (logarithmische Skalierung) in Prozent auf der y-Achse, Stimulationen auf der x-Achse. Angabe von signifikanten Unterschieden im Paarvergleich (Kruskal-Wallis, post-hoc Dunn-Bonferroni) mit horizontalen Strichern und p -Werten.

3.2.3 Unterschiede je Stimulation bei 40 % Serum

Bei 40 % Serum im Kulturmedium zeigte sich ebenfalls ein signifikanter Unterschied des Makrophagenanteils zwischen den Stimulationen ($p < 0,001$; Kruskal-Wallis-Test). Die Seren der Gesunden führten zur Ausbildung eines höheren Anteils an Makrophagen als FBS ($p < 0,001$; post-hoc Test Dunn-Bonferroni). Daneben differenzierte bei der Stimulation durch Seren von Patienten mit OA ($p = 0,002$) sowie RA ($p < 0,001$) ein größerer Anteil Makrophagen als bei FBS (s. Abbildung 7). Zu der Stimulation durch das Serum von Patienten mit SLE ist der Unterschied bei 40 % Serum nicht mehr signifikant.

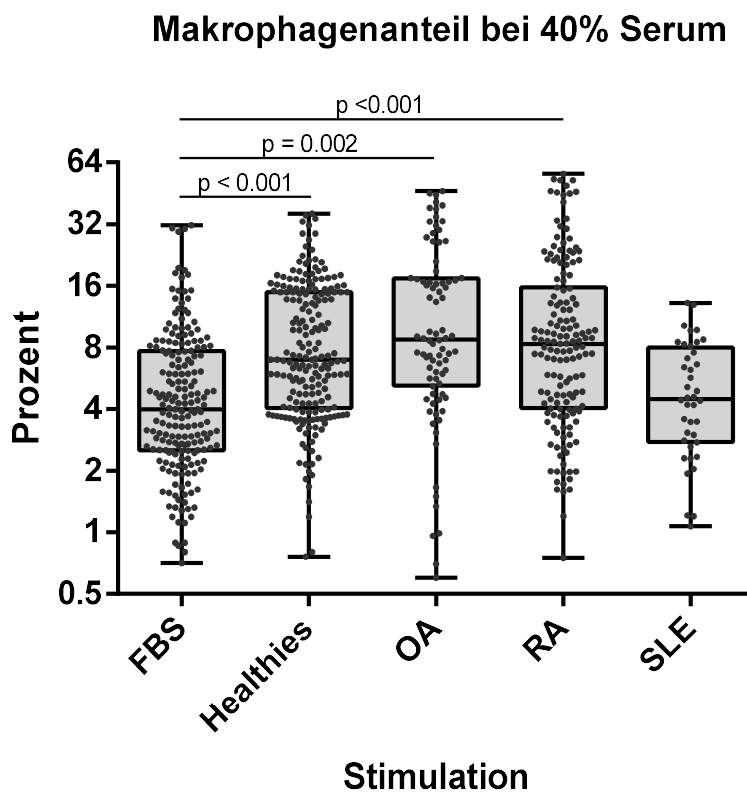


Abb. 7: Makrophagenanteil bei 40 % Serum

Einfluss der Stimulation mit 19 Proben fetal bovines Serumalbumin (FBS), dem Serum 20 gesunder Probanden (*Healthies*), dem Serum von 20 Patienten mit rheumatoider Arthritis (RA), 11 mit Osteoarthritis (OA) und 5 mit systemischem Lupus erythematoses (SLE) bei 40 % Serum im Kulturmedium auf die Ausbildung differenzierter Makrophagen aus Monozyten gesunder Probanden nach sieben Tagen. Darstellung in *Box-Whisker-Plots* mit Median, unterem und oberem Quartil, *Whiskers* von Minimum bis Maximum und Einzelwertdarstellung in Punkten. Anteil an allen gezählten *Events* in Prozent (logarithmische Skalierung) auf der y-Achse, Stimulation auf der x-Achse. Unterschiede im Paarvergleich (Kruskal-Wallis-Test, post-hoc Dunn-Bonferroni) als horizontale Striche unter Angabe des p -Wertes.

3.3 Expression Oberflächenmarker

Die Daten der Oberflächenmarker CD206, CD86, CD163, CD14 und CD16 waren nicht normalverteilt ($p < 0,001$; Shapiro-Wilk-Test). Für die Analysen wurden daher nichtparametrische Testverfahren angewandt.

3.3.1 Oberflächenmarker bei Zytokinstimulation

Der Oberflächenmarker CD206 wies nach sieben Tagen unter der Differenzierung mit IL-4 und IL-13 für M2 Makrophagen im Vergleich zur Differenzierung mit LPS und IFN- γ für M1 Makrophagen eine höhere Expression auf ($p < 0,001$; Mann-Whitney-U-Test, s. Abbildung 8).

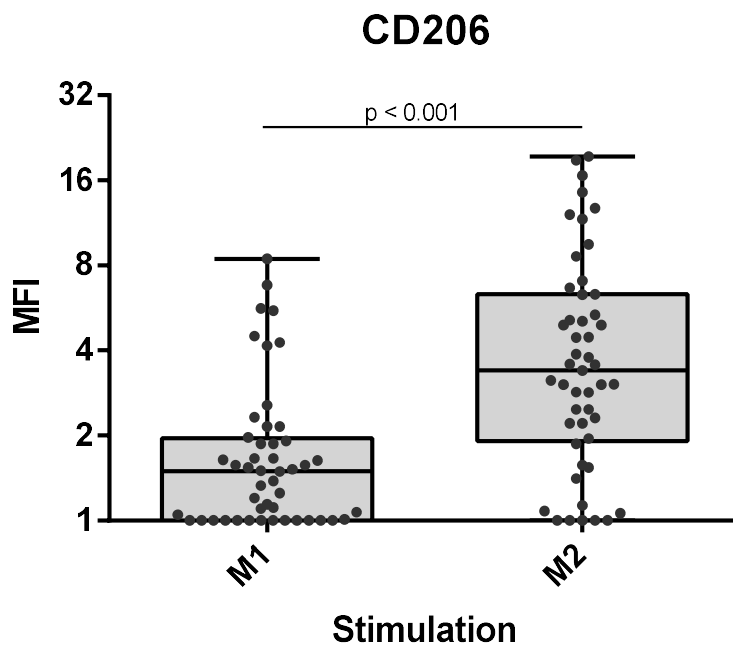


Abb. 8: Expression CD206 für M1 und M2

Einfluss der Stimulation humaner Monozyten gesunder Probanden zu Makrophagen Typ M1 mit Interferon gamma (IFN- γ) und Lipopolysaccharid (LPS) oder Typ M2 mit Interleukin 4 (IL-4) und Interleukin 13 (IL-13) auf die Expression von CD206. Darstellung in *Box-Whisker-Plots* mit Median, unterem und oberem Quartil, *Whiskers* von Minimum bis Maximum und Einzelwertdarstellung in Punkten. *Mean Fluorescence Intensity* (MFI) auf der y-Achse (logarithmische Skalierung), Stimulation auf der x-Achse. Darstellung signifikanter Unterschied mit horizontalem Strich unter Angabe des p -Wertes (Mann-Whitney-U-Test).

Für den Oberflächenmarker CD86 lag die Expression nach sieben Tagen Differenzierung mit IFN- γ und LPS für M1 Makrophagen höher als unter der Differenzierung mit IL-4 und IL-13 für M2 Makrophagen ($p = 0,013$; Mann-Whitney-U-Test; s. Abbildung 9).

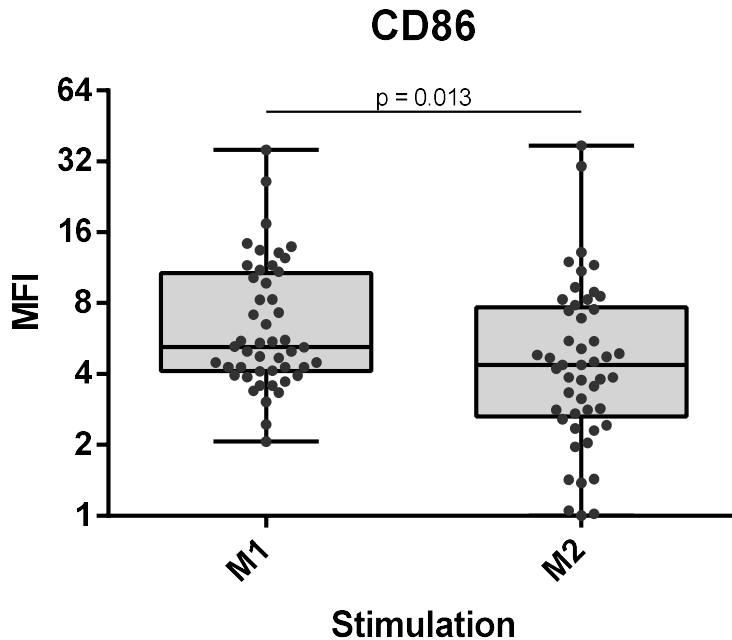


Abb. 9: Expression CD86 für M1 und M2

Einfluss der Stimulation humaner Monozyten gesunder Probanden für Makrophagen Typ M1 mit Interferon gamma (IFN- γ) und Lipopolysaccharid (LPS) oder für Makrophagen Typ M2 mit Interleukin 4 (IL-4) und Interleukin 13 (IL-13) auf die Expression von CD86. Darstellung in *Box-Whisker-Plots* mit Median, unterem und oberem Quartil, *Whiskers* von Minimum bis Maximum und Einzelwertdarstellung in Punkten. *Mean Fluorescence Intensity* (MFI) auf der y-Achse (logarithmische Skalierung), Stimulation auf der x-Achse. Darstellung signifikanter Unterschied mit horizontalem Strich unter Angabe des p -Wertes (Mann-Whitney-U-Test).

Der Oberflächenmarker CD163 zeigte nach sieben Tagen unter der Differenzierung mit IL-4 und IL-13 für M2 Makrophagen eine höhere Expression als unter der Differenzierung mit IFN- γ und LPS für M1 Makrophagen ($p = 0,007$; Mann-Whitney-U-Test; s. Abbildung 10).

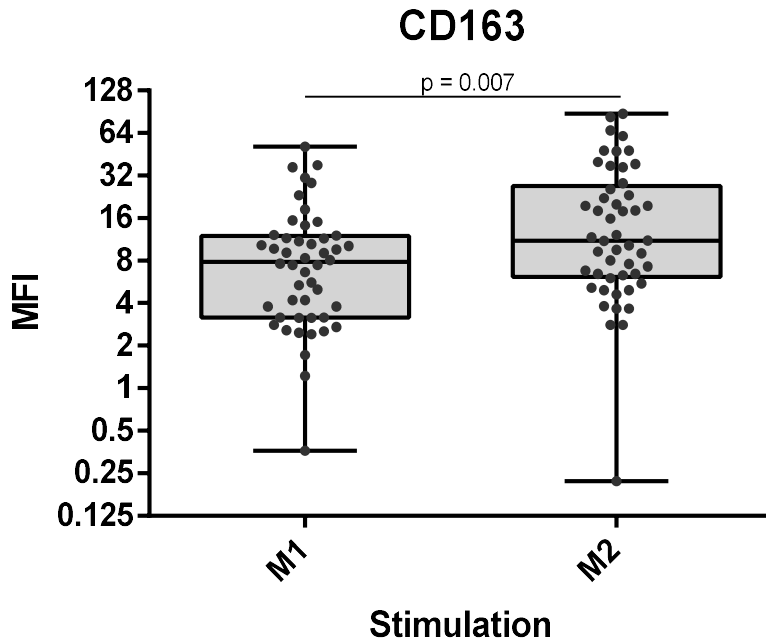


Abb. 10: Expression CD163 für M1 und M2

Einfluss der Stimulation humaner Monozyten gesunder Probanden zu Makrophagen Typ M1 mit Interferon gamma (IFN- γ) und Lipopolysaccharid (LPS) oder zu Makrophagen Typ M2 mit Interleukin 4 (IL-4) und Interleukin 13 (IL-13) auf die Expression von CD163. Darstellung in *Box-Whisker-Plots* mit Median, unterem und oberem Quartil, *Whiskers* von Minimum bis Maximum und Einzelwertdarstellung in Punkten. *Mean Fluorescence Intensity* (MFI) auf der y-Achse (logarithmische Skalierung), Stimulation auf der x-Achse. Darstellung signifikanter Unterschied mit horizontalem Strich unter Angabe des p -Wertes (Mann-Whitney-U-Test).

Die Expression des Oberflächenrezeptors CD14 zeigte nach sieben Tagen keinen Unterschied zwischen der Differenzierung mit IFN- γ und LPS für M1 Makrophagen und der Differenzierung mit IL-4 und IL-13 für M2 Makrophagen ($p = 0,880$; Mann-Whitney-U-Test; s. Abbildung 11).

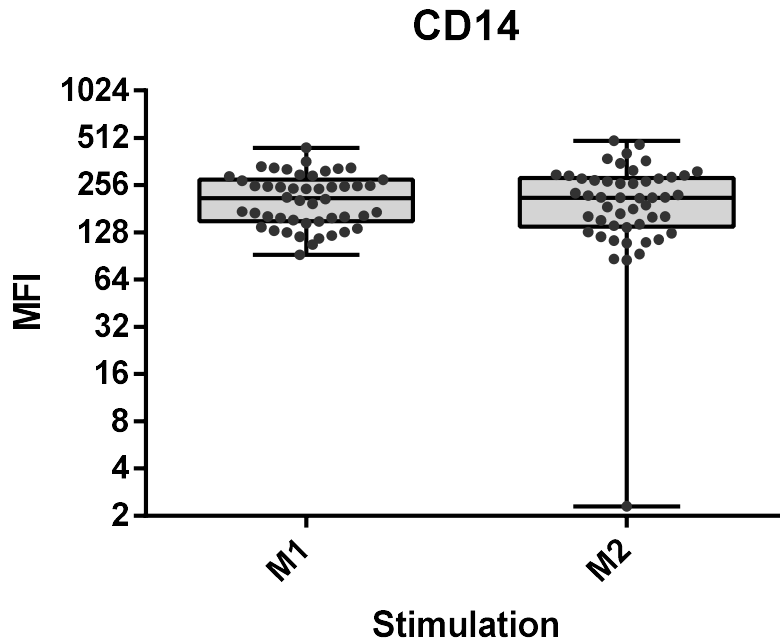


Abb. 11: Expression CD14 für M1 und M2

Einfluss der Stimulation humaner Monozyten gesunder Probanden zu Makrophagen Typ M1 mit Interferon gamma (IFN- γ) und Lipopolysaccharid (LPS) oder zu Makrophagen Typ M2 mit Interleukin 4 (IL-4) und Interleukin 13 (IL-13) auf die Expression von CD14. Darstellung in *Box-Whisker-Plots* mit Median, unterem und oberem Quartil, *Whiskers* von Minimum bis Maximum und Einzelwertdarstellung in Punkten. *Mean Fluorescence Intensity* (MFI) auf der y-Achse (logarithmische Skalierung), Stimulation auf der x-Achse.

Die Expression des Oberflächenrezeptors CD16 zeigte nach sieben Tagen ebenfalls keinen Unterschied zwischen den mit IFN- γ und LPS differenzierten Makrophagen für M1 sowie den mit IL-4 und IL-13 differenzierten Makrophagen für M2 ($p = 0,276$; Mann-Whitney-U-Test; s. Abbildung 12).

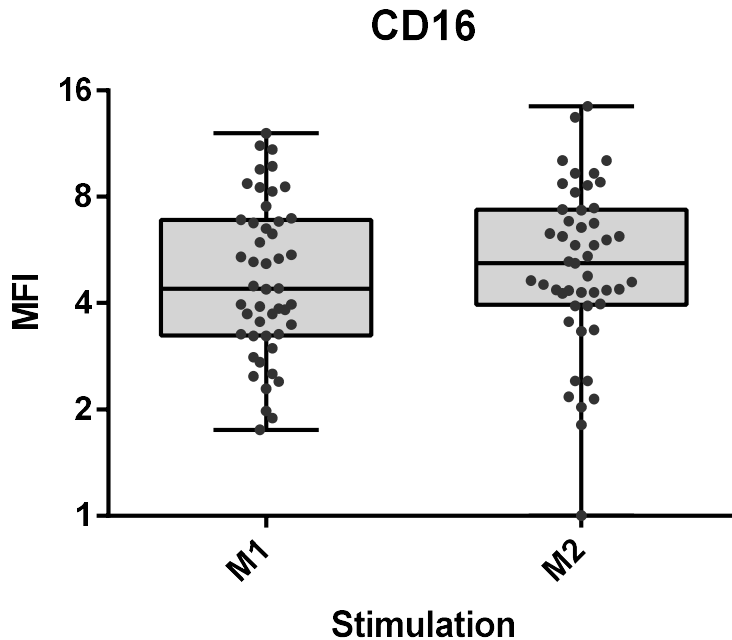


Abb. 12: Expression CD16 für M1 und M2

Einfluss der Zytokinstimulation für M1 mit Interferon gamma (IFN- γ) und Lipopolysaccharid (LPS) oder M2 mit Interleukin 4 (IL-4) und Interleukin 13 (IL-13) auf die Expression von CD16 bei der Differenzierung humaner Monozyten gesunder Probanden zu Makrophagen. Darstellung in *Box-Whisker-Plots* mit Median, unterem und oberem Quartil, *Whiskers* von Minimum bis Maximum und Einzelwertdarstellung in Punkten. *Mean Fluorescence Intensity* (MFI) auf der y-Achse (logarithmische Skalierung), Stimulation auf der x-Achse.

3.3.2 Oberflächenmarker bei Serumstimulation

Die durch das Serum gesunder Probanden differenzierten Makrophagen zeigten für den Marker CD206 einen signifikanten Anstieg von einem Serumanteil von 20 % zur Verwendung von 40 % Serum ($p < 0,001$; Mann-Whitney-U-Test).

Die Verteilung von CD206 bei 20 % Serum unterschied sich über die Stimulationen ($p < 0,001$; Kruskal-Wallis-Test). Im paarweisen Vergleich (post-Hoc Test Dunn-Bonferroni) exprimierten die durch das Serum gesunder Probanden differenzierten Makrophagen mehr CD206 als die durch das Serum von Patienten mit OA ($p = 0,006$) oder RA ($p = 0,001$) differenzierten Makrophagen.

Auch bei 40 % Serumanteil unterschied sich die Verteilung von CD206 über die Kategorie Stimulation ($p < 0,001$; Kruskal-Wallis-Test). Im paarweisen Vergleich (post-Hoc Test Dunn-Bonferroni) zeigten die durch gesundes Serum differenzierten Makrophagen im Vergleich zu den durch das Serum von Patienten mit SLE ($p < 0,001$), OA ($p < 0,001$), RA ($p < 0,001$) als auch den durch FBS ($p < 0,001$) differenzierten Makrophagen eine höhere Expression des Markers (s. Abbildung 13).

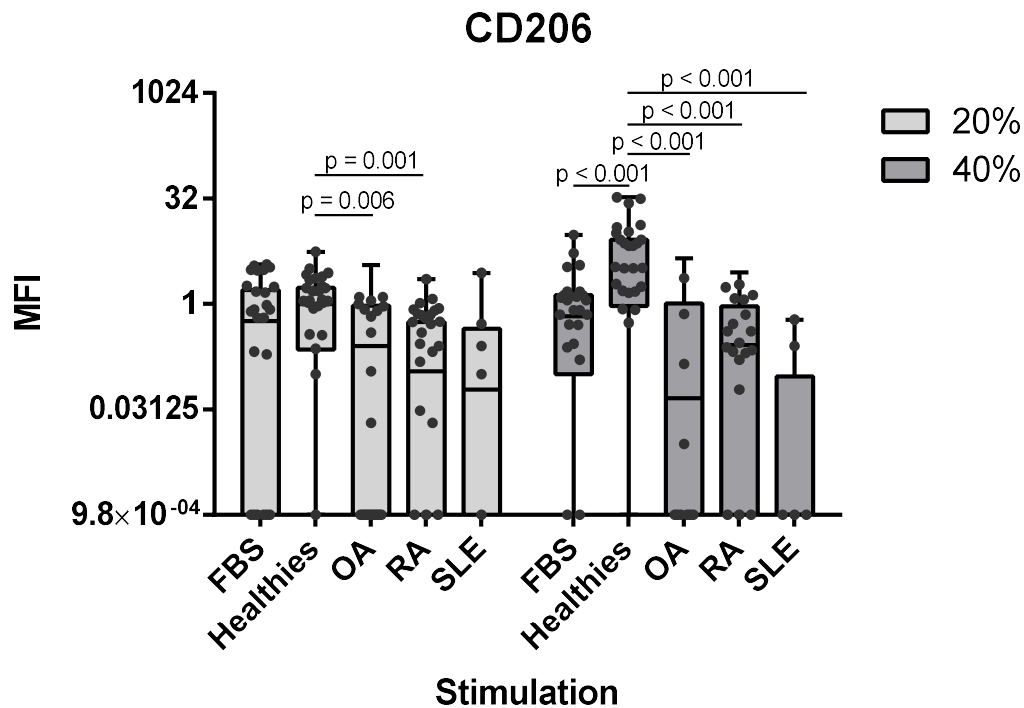


Abb. 13: Expression CD206 unter Serumstimulation

Einfluss der Stimulationen mit 19 Proben fetal bovines Serumalbumin (FBS), dem Serum 20 gesunder Probanden (*Healthies*), dem Serum von 20 Patienten mit rheumatoider Arthritis (RA), 11 mit Osteoarthritis (OA) und 5 mit systemischem Lupus erythematoses (SLE) bei 20 % Serum sowie bei 40 % Serum im Kulturmedium auf die Expression des Oberflächenmarkers CD206 auf den aus Monozyten gesunder Probanden differenzierten Makrophagen nach sieben Tagen. Darstellung in *Box-Whisker-Plots* mit Median, unterem und oberem Quartil, *Whiskers* von Minimum bis Maximum und Einzelwertdarstellung in Punkten. *Mean Fluorescence Intensity* (MFI) auf der y-Achse (logarithmische Skalierung) und die Stimulationen auf der x-Achse. Signifikante Unterschiede zwischen den Gruppen wurden als horizontale Striche unter Angabe des *p*-Wertes gekennzeichnet (Kruskal-Wallis-Test, post-hoc Dunn-Bonferroni).

Für die Marker CD86, CD163, CD14 und CD16 lag für keine der Gruppen ein Unterschied zwischen den Serumkonzentrationen 20 % und 40 % vor ($p > 0,05$; Mann-Whitney-U-Test; Daten nicht dargestellt). In den weiteren Analysen wurden die Daten der Serumkonzentrationen 20 % und 40 % dieser Marker zusammengefasst (CD86, CD163, CD14, CD16).

Die Verteilung von CD86 unterschied sich über die Stimulationen ($p < 0,001$; Kruskal-Wallis-Test). Dabei zeigte sich bei den durch das Serum Gesunder differenzierten Makrophagen im post-Hoc Test (Dunn-Bonferroni) eine höhere Expression als bei den durch das Serum von Patienten mit RA ($p < 0,001$) oder durch FBS differenzierten Makrophagen ($p = 0,006$; s. Abbildung 14). Zwischen den weiteren Gruppen gab es keine Unterschiede.

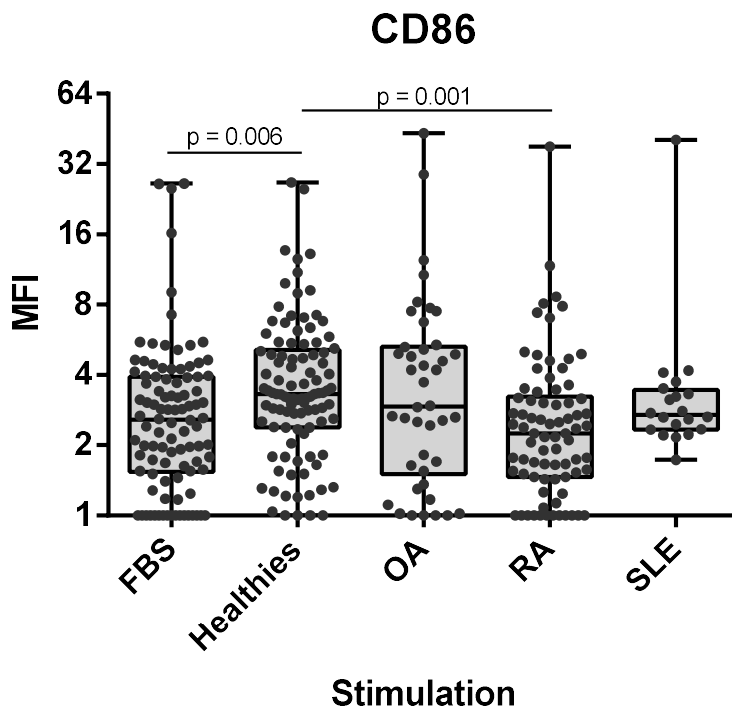


Abb. 14: Expression CD86 unter Serumstimulation

Einfluss der Stimulationen mit 19 Proben fetalem bovines Serumalbumin (FBS), dem Serum 20 gesunder Probanden (*Healthies*), dem Serum von 20 Patienten mit rheumatoider Arthritis (RA), 11 mit Osteoarthritis (OA) und 5 mit systemischem Lupus erythematoses (SLE) auf die Expression des Oberflächenmarkers CD86 auf den aus Monozyten gesunder Probanden differenzierten Makrophagen nach sieben Tagen. Darstellung in *Box-Whisker-Plots* mit Median, unterem und oberem Quartil, *Whiskers* von Minimum bis Maximum und Einzelwertdarstellung in Punkten. *Mean Fluorescence Intensity* (MFI) auf der y-Achse (logarithmische Skalierung) und die Stimulation auf der x-Achse. Signifikante Unterschiede zwischen den Gruppen wurden als horizontale Striche unter Angabe des *p*-Wertes gekennzeichnet (Kruskal-Wallis-Test, post-hoc Dunn-Bonferroni).

Die Verteilung der Expression von CD163 unterschied sich ($p < 0,001$; Kruskal-Wallis-Test) über die Stimulationen. Der paarweise Vergleich (post-Hoc Test Dunn-Bonferroni) zeigte eine höhere Expression von CD163 bei durch die Seren gesunder Probanden, durch FBS, sowie durch die Seren von Patienten mit SLE oder RA differenzierten Makrophagen im Vergleich zu den durch das Serum von Patienten mit OA differenzierten Makrophagen (je $p < 0,001$). Des Weiteren wiesen die Makrophagen nach der Differenzierung durch das Serum von Patienten mit RA eine höhere Expression von CD163 auf als nach der Stimulation durch FBS ($p = 0,041$, s. Abbildung 15).

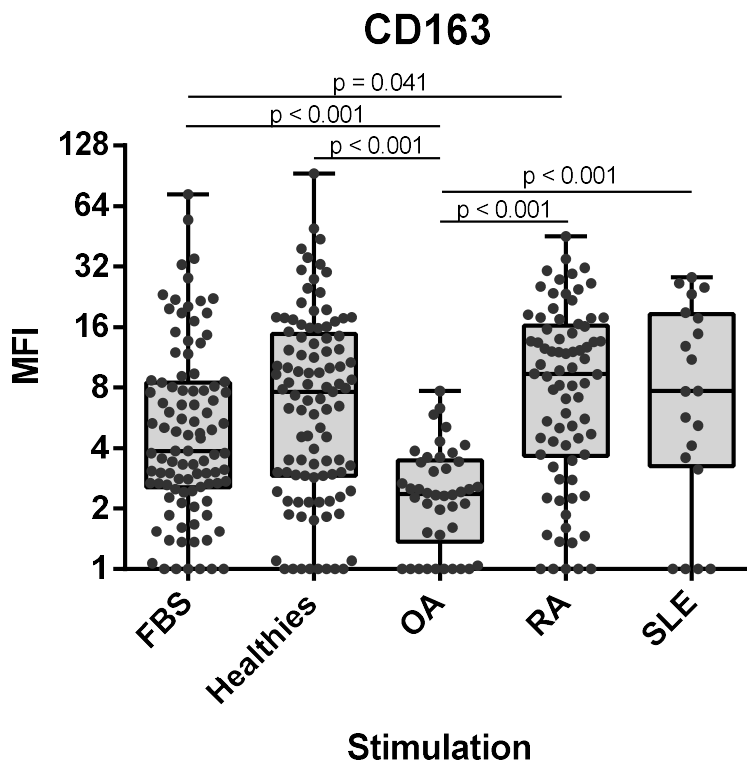


Abb. 15: Expression CD163 unter Serumstimulation

Einfluss der Stimulationen mit 19 Proben fetal bovines Serumalbumin (FBS), dem Serum 20 gesunder Probanden (*Healthies*), dem Serum von 20 Patienten mit rheumatoider Arthritis (RA), 11 mit Osteoarthritis (OA) und 5 mit systemischem Lupus erythematoses (SLE) auf die Expression des Oberflächenmarkers CD163 auf den aus Monozyten gesunder Probanden differenzierten Makrophagen nach sieben Tagen. Darstellung in *Box-Whisker-Plots* mit Median, unterem und oberem Quartil, *Whiskers* von Minimum bis Maximum und Einzelwertdarstellung in Punkten. *Mean Fluorescence Intensity* (MFI) auf der y-Achse (logarithmische Skalierung) und die Stimulation auf der x-Achse. Signifikante Unterschiede zwischen den Gruppen wurden als horizontale Striche unter Angabe des p -Wertes gekennzeichnet (Kruskal-Wallis-Test, post-hoc Dunn-Bonferroni).

Die Expression des Oberflächenmarkers CD14 unterschied sich über die Serumstimulationen ($p = 0,001$; Kruskal-Wallis-Test). Im paarweisen Vergleich (post-hoc Test Dunn-Bonferroni) wiesen die Makrophagen nach der Stimulation mit dem Serum gesunder Probanden im Vergleich zu den Makrophagen nach der Stimulation durch das Serum von Patienten mit SLE eine höhere Expression von CD14 auf ($p = 0,008$). Ebenso wiesen die Makrophagen nach der Differenzierung durch FBS ($p = 0,007$), OA ($p = 0,007$) und durch Serum von Patienten mit RA ($p < 0,001$) je im Vergleich zur Differenzierung durch Serum von Patienten mit SLE eine höhere Expression von CD14 auf (s. Abbildung 16).

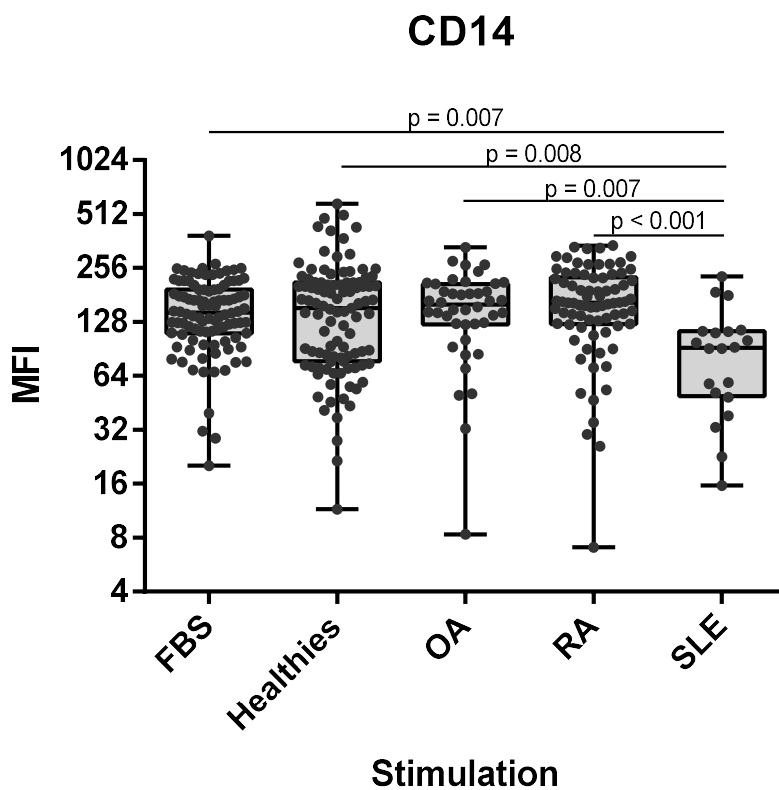


Abb. 16: Expression CD14 unter Serumstimulation

Einfluss der Stimulationen mit 19 Proben fetalem bovines Serumalbumin (FBS), dem Serum 20 gesunder Probanden (*Healthies*), dem Serum von 20 Patienten mit rheumatoider Arthritis (RA), 11 mit Osteoarthritis (OA) und 5 mit systemischem Lupus erythematoses (SLE) auf die Expression des Oberflächenmarkers CD14 auf den aus Monozyten gesunder Probanden differenzierten Makrophagen nach sieben Tagen. Darstellung in *Box-Whisker-Plots* mit Median, unterem und oberem Quartil, *Whiskers* von Minimum bis Maximum und Einzelwertdarstellung in Punkten. *Mean Fluorescence Intensity* (MFI) auf der y-Achse (logarithmische Skalierung) und die Stimulation auf der x-Achse. Signifikante Unterschiede zwischen den Gruppen wurden als horizontale Striche unter Angabe des p -Wertes gekennzeichnet (Kruskal-Wallis-Test, post-hoc Dunn-Bonferroni).

Beim Oberflächenmarker CD16 zeigte sich ein Unterschied in der Verteilung über die Stimulationen ($p < 0,001$; Mann-Whitney-U-Test). Der paarweise Vergleich (post-hoc Test Dunn-Bonferroni) zeigte eine höhere Expression bei den durch das Serum Gesunder differenzierten Makrophagen als nach der Differenzierung durch das Serum von Patienten mit OA ($p < 0,001$) oder als nach der Differenzierung durch FBS ($p < 0,001$). Außerdem wiesen die durch das Serum von Patienten mit RA differenzierten Makrophagen eine signifikant höhere Expression auf als die durch das Serum von Patienten mit OA ($p < 0,001$) oder durch FBS ($p < 0,001$) differenzierten Makrophagen. Die Makrophagen, die mit den Seren von Patienten mit SLE differenziert wurden, exprimierten ebenfalls mehr CD16 als die Makrophagen nach der Differenzierung mit dem Serum von Patienten mit OA ($p = 0,026$; s. Abbildung 17).

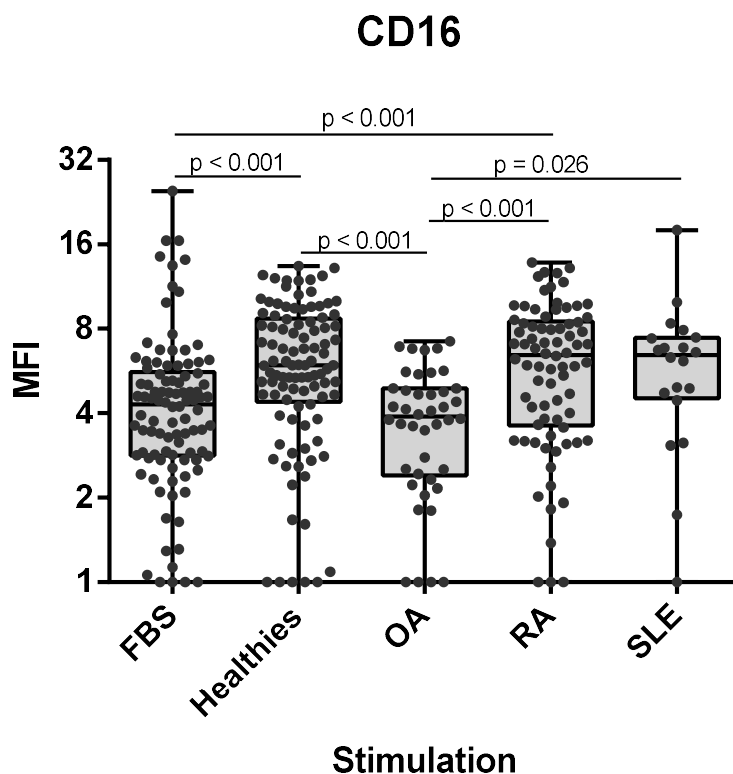


Abb. 17: Expression CD16 unter Serumstimulation

Einfluss der Stimulationen mit 19 Proben fetal bovines Serumalbumin (FBS), dem Serum 20 gesunder Probanden (*Healthies*), dem Serum von 20 Patienten mit rheumatoider Arthritis (RA), 11 mit Osteoarthritis (OA) und 5 mit systemischem Lupus erythematoses (SLE) auf die Expression des Oberflächenmarkers CD16 auf den aus den Monozyten gesunder Probanden differenzierten Makrophagen nach sieben Tagen. Darstellung in *Box-Whisker-Plots* mit Median, unterem und oberem Quartil, *Whiskers* von Minimum bis Maximum und Einzelwertdarstellung in Punkten. *Mean Fluorescence Intensity* (MFI) auf der y-Achse (logarithmische Skalierung) und die Stimulation auf der x-Achse. Signifikante Unterschiede zwischen den Gruppen wurden als horizontale Striche unter Angabe des p -Wertes gekennzeichnet (Kruskal-Wallis-Test, post-hoc Dunn-Bonferroni).

3.4 Zytokinmessung in Zellkulturüberständen

Die Daten aus den Zytokinassays IL-6, IL-10, TNF- α und TGF- β zeigten nach dem Shapiro-Wilk-Test keine Normalverteilung (je $p < 0,001$). Für die weiteren Analysen wurden daher nichtparametrische Testverfahren angewandt.

3.4.1 Zytokinstimulation

Für die Produktion des Zytokins IL-6 in den Zellkulturüberständen wurden unter der Differenzierung der Makrophagen mit IFN- γ und LPS für M1 höhere Werte gemessen als unter der Differenzierung mit IL-4 und IL-13 für M2 ($p < 0,001$; Mann-Whitney-U-Test; s. Abbildung 18).

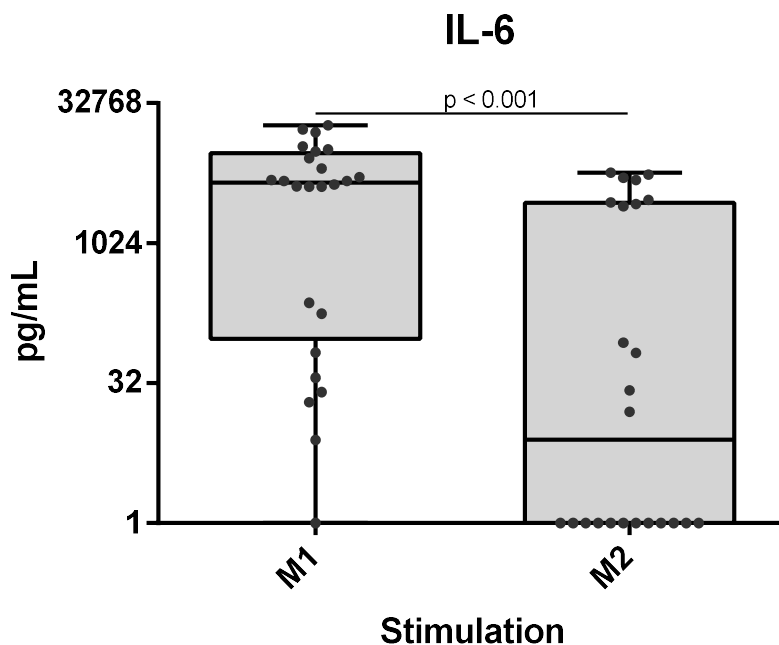


Abb. 18: Level IL-6 für M1 und M2

Einfluss der Stimulation für M1 mit Interferon gamma (IFN- γ) und Lipopolysaccharid (LPS) oder M2 mit Interleukin 4 (IL-4) und Interleukin 13 (IL-13) auf die Interleukin 6 (IL-6) Produktion der nach sieben Tagen aus Monozyten gesunder Probanden differenzierten Makrophagen. Darstellung in *Box-Whisker-Plots* mit Median, unterem und oberem Quartil, *Whiskers* von Minimum bis Maximum und Einzelwertdarstellung in Punkten. Konzentration in pg/mL (logarithmische Skalierung) auf der y-Achse, Stimulation auf der x-Achse. Angabe signifikanter Unterschied als horizontaler Strich mit p -Wert (Mann-Whitney-U-Test).

Die Produktion von TNF- α in den Zellkulturüberständen zeigte im Mann-Whitney-U-Test unter der Differenzierung der Makrophagen mit IFN- γ und LPS für M1 höhere Werte als unter der Differenzierung mit IL-4 und IL-13 für M2 ($p = 0,001$; s. Abbildung 19).

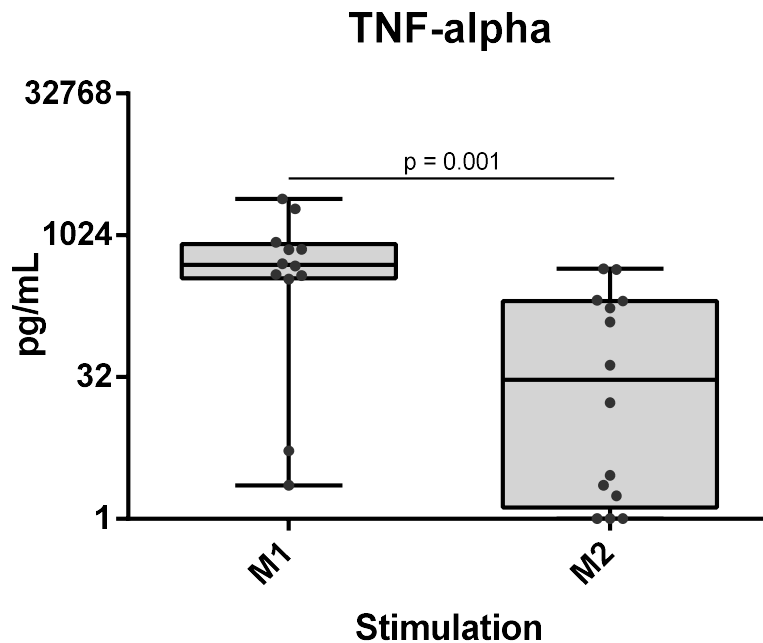


Abb. 19: Level TNF- α für M1 und M2

Einfluss der Stimulation für M1 mit Interferon gamma (IFN- γ) und Lipopolysaccharid (LPS) oder M2 mit Interleukin 4 (IL-4) und Interleukin 13 (IL-13) auf die Tumornekrosefaktor alpha (TNF- α) Produktion der nach sieben Tagen aus Monozyten gesunder Probanden differenzierten Makrophagen. Darstellung in *Box-Whisker-Plots* mit Median, unterem und oberem Quartil, *Whiskers* von Minimum bis Maximum und Einzelwertdarstellung in Punkten. Konzentration in pg/mL auf der y-Achse (logarithmische Skalierung), Stimulation auf der x-Achse. Angabe signifikanter Unterschied als horizontaler Strich mit p -Wert (Mann-Whitney-U-Test).

Die Produktion des Zytokins IL-10 in den Zellkulturüberständen zeigten im Mann-Whitney-U-Test keinen Unterschied zwischen der Differenzierung der Makrophagen mit IFN- γ und LPS für M1 und der Differenzierung der Makrophagen mit IL-4 und IL-13 für M2 ($p = 0,128$; s. Abbildung 20).

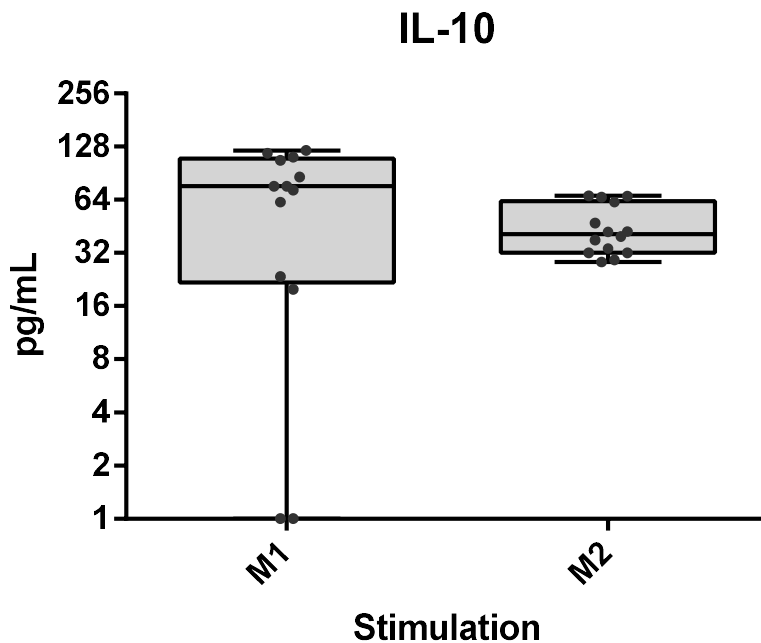


Abb. 20: Level IL-10 für M1 und M2

Einfluss der Stimulation für M1 mit Interferon gamma (IFN- γ) und Lipopolysaccharid (LPS) oder M2 mit Interleukin 4 (IL-4) und Interleukin 13 (IL-13) auf die Interleukin 10 (IL-10) Produktion der nach sieben Tagen aus Monozyten gesunder Probanden differenzierten Makrophagen. Darstellung in *Box-Whisker-Plots* mit Median, unterem und oberem Quartil, *Whiskers* von Minimum bis Maximum und Einzelwertdarstellung in Punkten. Konzentration (pg/mL binärer Logarithmus) auf der y-Achse, Stimulation auf der x-Achse.

Auch für die Level von TGF- β in den Zellkulturüberständen konnte im Mann-Whitney-U-Test kein Unterschied zwischen der Stimulation mit IFN- γ und LPS für M1 und der Stimulation mit IL-4 und IL-13 für M2 nachgewiesen werden ($p = 0,874$; s. Abbildung 21).

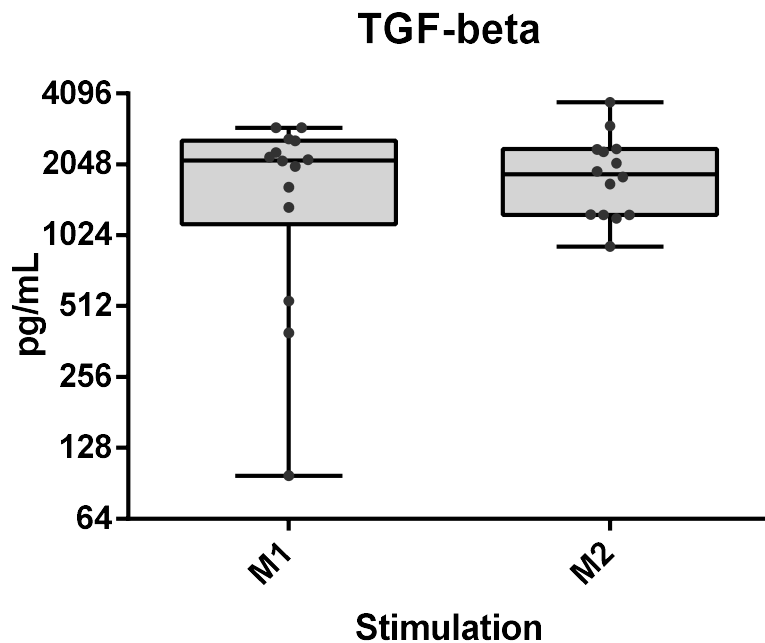


Abb. 21: Level TGF- β für M1 und M2

Einfluss der Stimulation für M1 mit Interferon gamma (IFN- γ) und Lipopolysaccharid (LPS) oder M2 mit Interleukin 4 (IL-4) und Interleukin 13 (IL-13) auf die TGF- β (*transforming growth factor*) Produktion der nach sieben Tagen aus Monozyten gesunder Probanden differenzierten Makrophagen. Darstellung in *Box-Whisker-Plots* mit Median, unterem und oberem Quartil, *Whiskers* von Minimum bis Maximum und Einzelwertdarstellung in Punkten. Konzentration in pg/mL auf der y-Achse (logarithmische Skalierung), Stimulation auf der x-Achse.

3.4.2 Serumstimulation

Bei der Differenzierung der Makrophagen durch die Seren gesunder Probanden ($p = 0,016$; Mann-Whitney-U-Test) und Patienten mit RA ($p = 0,006$; Mann-Whitney-U-Test) ergab sich in der Produktion von IL-6 ein Unterschied zwischen den Serumkonzentrationen 20 % und 40 %.

In der Stimulation mit 20 % Serum war IL-6 über die Stimulationen unterschiedlich verteilt ($p < 0,001$; Kruskal-Wallis-Test). In der post-hoc Analyse nach Dunn-Bonferroni zeigte sich im Zellkulturüberstand nach Stimulation durch die Seren gesunder Probanden mehr IL-6 als nach der Stimulation durch FBS ($p < 0,001$), sowie mehr IL-6 als nach der Stimulation durch Seren von Patienten mit SLE ($p < 0,001$) und RA ($p = 0,005$).

Bei Stimulation mit 40 % Serum wies IL-6 über die Stimulationen ebenfalls eine unterschiedliche Verteilung auf ($p < 0,001$; Kruskal-Wallis-Test). Der paarweise Vergleich nach Dunn-Bonferroni zeigte eine höhere Produktion von IL-6 nach der Differenzierung von Makrophagen durch das Serum gesunder Probanden ($p < 0,001$), durch das Serum von Patienten mit OA ($p = 0,017$) sowie RA ($p = 0,001$) als nach Differenzierung der Makrophagen durch FBS. Außerdem lag das Level von IL-6 nach der Stimulation der Makrophagen mit dem Serum gesunder Probanden ($p < 0,001$), Patienten mit OA ($p = 0,013$) und RA ($p = 0,001$) über dem Wert nach Stimulation durch das Serum von Patienten mit SLE (s. Abbildung 22).

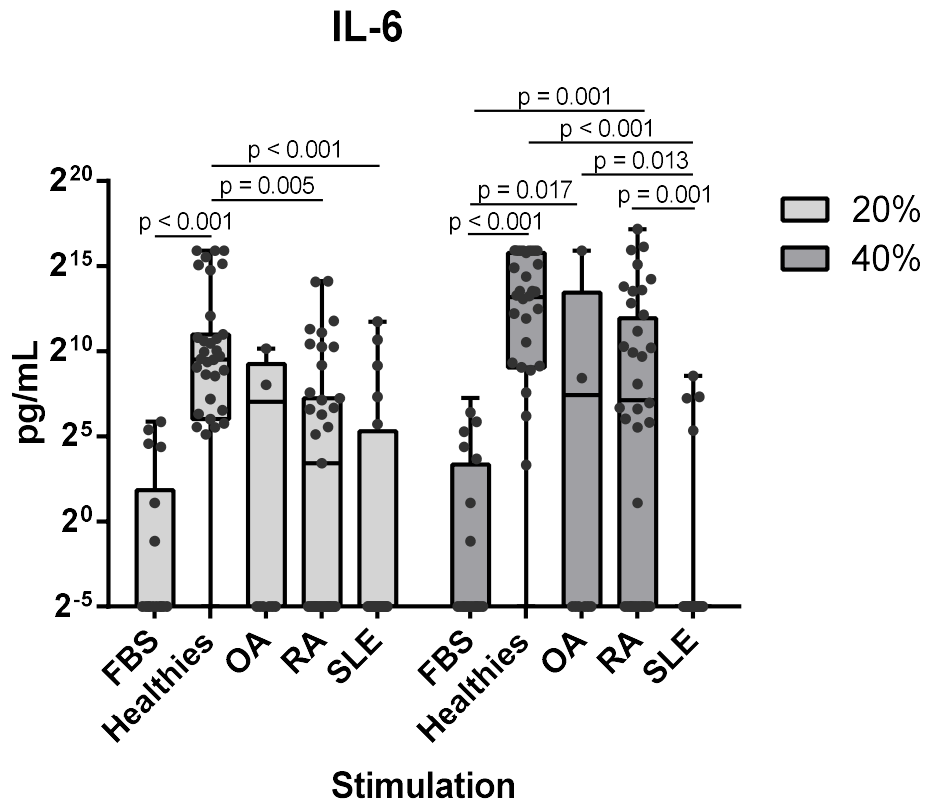


Abb. 22: Level IL-6 unter Serumstimulation

Einfluss der Stimulation mit 19 Proben fetal bovines Serumalbumin (FBS), dem Serum 20 gesunder Probanden (*Healthies*), dem Serum von 20 Patienten mit rheumatoider Arthritis (RA), 11 mit Osteoarthritis (OA) und 5 mit systemischem Lupus erythematoses (SLE) zu 20 % und 40 % im Kulturmedium auf die Produktion von Interleukin 6 (IL-6) im Überstand der nach sieben Tagen aus Monozyten gesunder Probanden differenzierten Makrophagen. Darstellung in *Box-Whisker-Plots* mit Median, unterem und oberem Quartil, *Whiskers* von Minimum bis Maximum und Einzelwertdarstellung in Punkten. Konzentration in pg/mL auf der y-Achse (logarithmische Skalierung), Stimulation auf der x-Achse. Angabe signifikanter Unterschiede mit horizontalen Strichen und p -Werten (Kruskal-Wallis-Test, post-hoc Dunn-Bonferroni).

Für die Produktion von TNF- α zeigte sich zwischen den eingesetzten Serumkonzentrationen zur Differenzierung der Makrophagen kein Unterschied ($p > 0,05$; Mann-Whitney-U-Test; Daten nicht dargestellt). Daher wurden die Daten der Konzentrationen 20 % und 40 % für TNF- α zusammengefasst.

Nach den Stimulationen war TNF- α unterschiedlich verteilt ($p < 0,001$; Kruskal-Wallis-Test). Im paarweisen Vergleich nach Dunn-Bonferroni bestand eine höhere Produktion nach der Differenzierung von Makrophagen durch das Serum gesunder Probanden im Vergleich zur Stimulation durch FBS ($p < 0,001$), sowie ein höheres Level nach der Differenzierung der Makrophagen durch das Serum von Patienten mit RA und OA im Vergleich zur Differenzierung durch FBS ($p =$

0,005 und $p = 0,004$). Des Weiteren wiesen die Proben nach der Stimulation durch das Serum gesunder Probanden ein höheres Level von TNF- α auf als nach der Stimulation durch das Serum von Patienten mit SLE ($p = 0,002$; s. Abbildung 23).

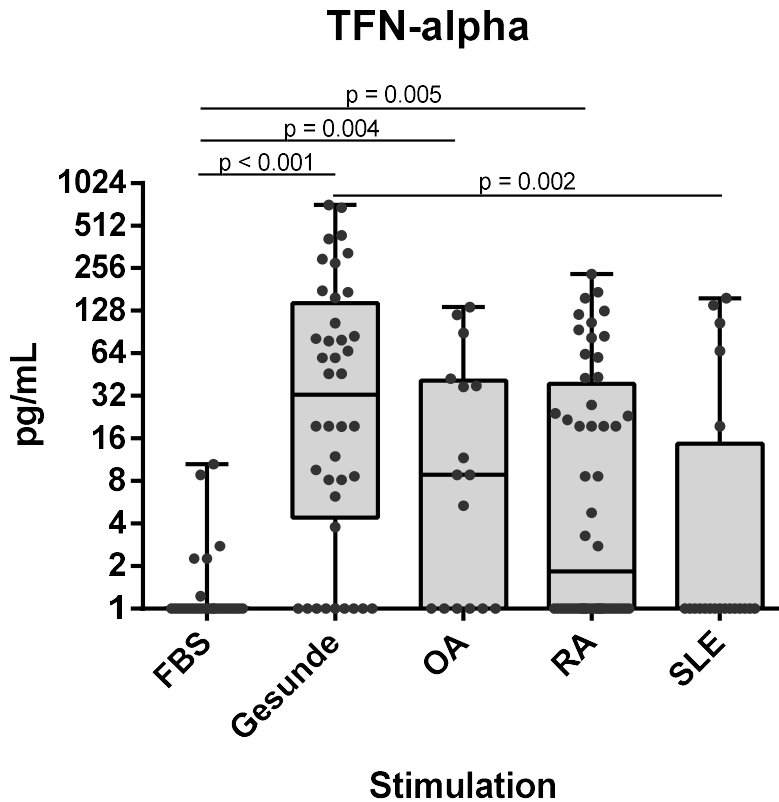


Abb. 23: Level TNF- α unter Serumstimulation

Einfluss der Stimulation mit 19 Proben fetal bovines Serumalbumin (FBS), dem Serum 20 gesunder Probanden (*Healthies*), dem Serum von 20 Patienten mit rheumatoider Arthritis (RA), 11 mit Osteoarthritis (OA) und 5 mit systemischem Lupus erythematoses (SLE) zu 20 % und 40 % im Kulturmedium auf die Produktion von Tumornekrosefaktor alpha (TNF- α) im Überstand der nach sieben Tagen aus Monozyten gesunder Probanden differenzierten Makrophagen. Darstellung in *Box-Whisker-Plots* mit Median, unterem und oberem Quartil, *Whiskers* von Minimum bis Maximum und Einzelwertdarstellung in Punkten. Konzentration in pg/mL auf der y-Achse (logarithmische Skalierung), Stimulation auf der x-Achse. Angabe signifikanter Unterschiede mit horizontalen Strichen und p -Werten (Kruskal-Wallis-Test, post-hoc Dunn-Bonferroni).

Für die Produktion von IL-10 bestand bei den durch das Serum Gesunder ($p = 0,001$; Mann-Whitney-U-Test) sowie durch das Serum von Patienten mit RA ($p = 0,018$; Mann-Whitney-U-Test) differenzierten Makrophagen ein Unterschied zwischen den Serumkonzentrationen von 20% und 40%.

Die Level von IL-10 wiesen bei einem Anteil von 20 % Serum im Kruskal-Wallis-Test keinen Unterschied zwischen den Stimulationen auf ($p = 0,426$). Erst bei 40 % Serum zeigte sich ein Unterschied zwischen den Stimulationen ($p < 0,001$, Kruskal-Wallis-Test). Dieser ließ sich in der post-hoc Analyse nach Dunn-Bonferroni auf eine höhere Produktion von IL-10 nach der Differenzierung zu Makrophagen mit dem Serum gesunder Probanden als nach Differenzierung durch FBS ($p < 0,001$) oder dem Serum von Patienten mit RA ($p = 0,018$) zurückführen (s. Abbildung 24).

IL-10

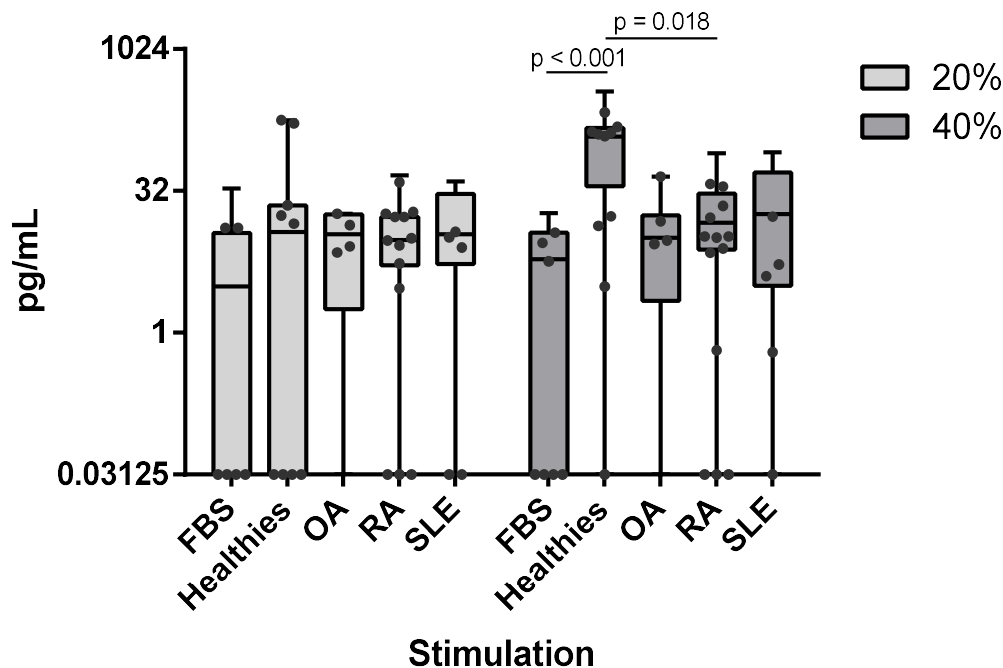


Abb. 24: Level IL-10 unter Serumstimulation

Einfluss der Stimulation mit 19 Proben fetal bovines Serumalbumin (FBS), dem Serum 20 gesunder Probanden (*Healthies*), dem Serum von 20 Patienten mit rheumatoider Arthritis (RA), 11 mit Osteoarthritis (OA) und 5 mit systemischem Lupus erythematoses (SLE) zu 20 % und 40 % im Kulturmedium auf die Produktion von Interleukin 10 (IL-10) im Überstand der nach sieben Tagen aus Monozyten gesunder Probanden differenzierten Makrophagen. Darstellung in *Box-Whisker-Plots* mit Median, unterem und oberem Quartil, *Whiskers* von Minimum bis Maximum und Einzelwertdarstellung in Punkten. Konzentration in pg/mL auf der y-Achse (logarithmische Skalierung), Stimulation auf der x-Achse. Angabe signifikanter Unterschiede mit horizontalen Strichen und p-Werten (Kruskal-Wallis-Test, post-hoc Dunn-Bonferroni).

Die Level von TGF- β unterschieden sich zwischen den Serumkonzentrationen 20 % und 40 % bei der Stimulation mit dem Serum Gesunder, sowie von Patienten mit RA und SLE (je $p < 0,001$; Mann-Whitney-U-Test).

Die Verteilung über die Stimulationen unterschied sich bei 20 % Serum ebenfalls ($p = 0,009$; Kruskal-Wallis-Test). Die Differenzierung der Makrophagen durch Serum von Patienten mit RA führte zu einer höheren Produktion von TGF- β als nach der Differenzierung durch FBS ($p = 0,021$). Bei der Konzentration von 40 % Serum zeigten die Level von TGF- β ebenfalls eine unterschiedliche Verteilung über die Stimulationen ($p < 0,001$, Kruskal-Wallis). Die Differenzierung von Makrophagen mit Serum von Gesunden ($p < 0,001$), RA ($p < 0,001$) und SLE ($p = 0,033$) führte zu einer höheren Produktion von TGF- β im Vergleich zu FBS differenzierten

Makrophagen. Außerdem wiesen die Zellkulturüberstände der durch RA-Serum differenzierte Makrophagen ($p < 0,001$) signifikant mehr TGF- β auf als nach Stimulation mit OA-Serum (paarweiser Vergleich nach Dunn-Bonferroni, s. Abbildung 25).

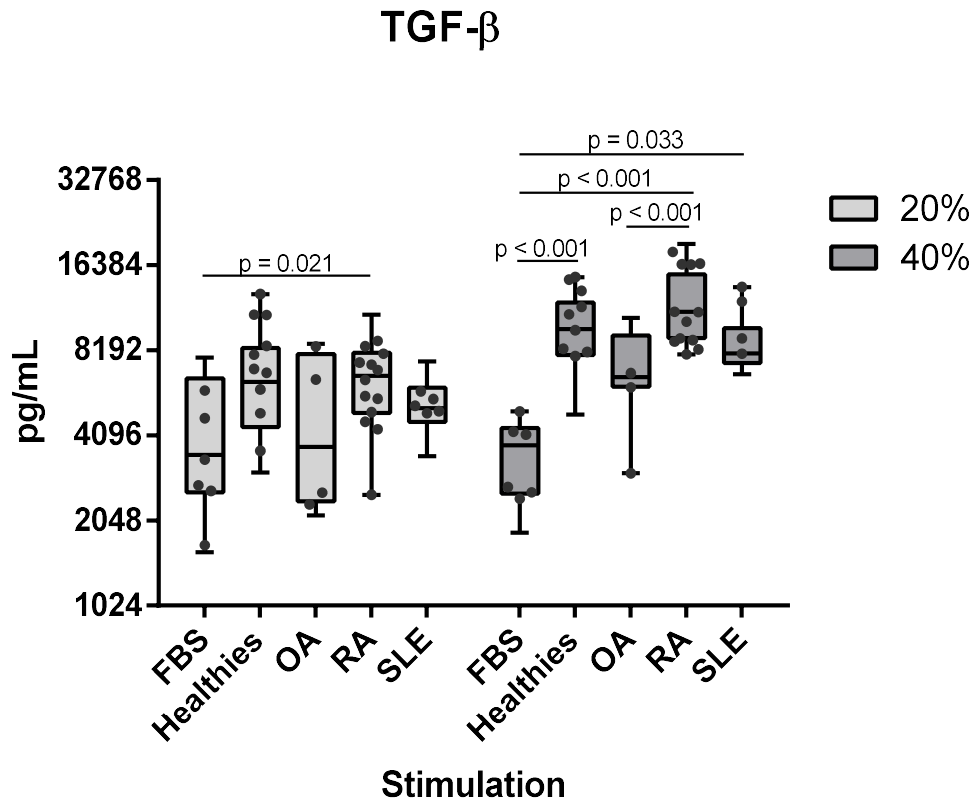


Abb. 25: Level TGF- β unter Serumstimulation

Einfluss der Stimulation mit 19 Proben fetal bovines Serumalbumin (FBS), dem Serum 20 gesunder Probanden (*Healthies*), dem Serum von 20 Patienten mit rheumatoider Arthritis (RA), 11 mit Osteoarthritis (OA) und 5 mit systemischem Lupus erythematosus (SLE) zu 20 % und 40 % im Kulturmedium auf die Produktion von TGF- β (*transforming growth factor*) im Überstand der nach sieben Tagen aus Monozyten gesunder Probanden differenzierten Makrophagen. Darstellung in *Box-Whisker-Plots* mit Median, unterem und oberem Quartil, *Whiskers* von Minimum bis Maximum und Einzelwertdarstellung in Punkten. Konzentration in pg/mL auf der y-Achse (logarithmische Skalierung), Stimulation auf der x-Achse. Angabe signifikanter Unterschiede mit horizontalen Strichen und p -Werten (Kruskal-Wallis-Test, post-hoc Dunn-Bonferroni).

3.5 Übersicht Oberflächenmarker und Zytokine je Patientengruppe

Tabelle 5 stellt einen Vergleich der Ränge aus dem Kruskal-Wallis-Test für die einzelnen Oberflächenmarker und Zytokine zwischen den mit Serum von Gesunden, OA-, RA- und SLE-Patienten differenzierten Makrophagen dar. Die Bewertungen sind im relativen Vergleich zu betrachten, der höchste Rang ist mit „++++“ gekennzeichnet, der zweite Rang mit „+++“, der dritte Rang mit „++“ und der letzte Rang mit „+“. Quantitative Unterschiede zwischen den Rängen sind in Tabelle 6 nicht dargestellt. Die Tabelle ist daher immer in Kombination mit den o.g. Ergebnissen zu betrachten und dient dem besseren Überblick über die Markerexpression je Stimulationsgruppe.

Die höchsten Werte für CD206 exprimierten die durch das Serum von Gesunden differenzierten Makrophagen gefolgt von den durch das Serum von Patienten mit RA, OA und zuletzt SLE differenzierten Makrophagen. Bei CD163 zeigten die durch das Serum von Patienten mit RA differenzierten Makrophagen die höchste Expression, die Werte der Makrophagen nach der Differenzierung durch das Serum von Patienten mit SLE und den Gesunden lagen nur wenig niedriger, auf dem letzten Rang lagen die durch OA-Serum differenzierten Makrophagen. Der Oberflächenmarker CD86 zeigte eine ähnliche Verteilung über die Gruppen. Auf dem höchsten Rang lagen die Makrophagen, die durch das Serum Gesunder differenziert wurden, gefolgt von den Makrophagen nach der Differenzierung durch das Serum von Patienten mit OA, SLE und RA. Bei CD16 wiesen ebenfalls die Makrophagen nach Stimulation durch die Seren Gesunder die höchste Expression auf, doch auch nach der Stimulation mit dem Serum von Patienten mit RA exprimierten die differenzierten Makrophagen hohe Werte. Danach folgten die Makrophagen nach der Differenzierung mit dem Serum von Patienten mit OA und SLE. Für CD14 fiel vor allem die niedrige Expression bei den durch SLE-Seren differenzierten Makrophagen auf. Die Werte der weiteren Gruppen lagen auf einem ähnlichen Niveau, am höchsten bei den durch das Serum von Patienten mit RA differenzierten Makrophagen, gefolgt von den Makrophagen nach Differenzierung durch das Serum von Patienten mit OA und zuletzt durch das Serum gesunder Probanden.

Für das Zytokin IL-6 wurde die höchste Produktion bei den durch gesunde Seren differenzierten Makrophagen nachgewiesen. Niedrigere Werte wiesen die Gruppen OA gefolgt von RA und SLE auf. Für die Produktion von IL-10 lagen ebenfalls die durch das Serum Gesunder differenzierten Makrophagen auf dem höchsten Rang. Mit niedrigeren Werten folgten die Makrophagen nach Stimulation durch die Seren von Patienten mit SLE, RA sowie OA. Ebenso lagen bei TNF- α die durch das Serum Gesunder differenzierten Makrophagen auf dem höchsten Rang. Niedrigere Werte für TNF- α zeigten die differenzierten Makrophagen nach Stimulation durch das Serum von Patienten mit OA, RA und SLE. Für TGF- β wiesen die durch das Serum von Patienten mit RA differenzierten Makrophagen die höchsten Werte auf gefolgt von den durch das Serum Gesunder differenzierte Makrophagen. Mit etwas niedrigeren Werten folgten die Makrophagen nach Differenzierung durch das Serum von Patienten mit SLE und zuletzt mit OA.

Tabelle 5: Übersicht der gemessenen Marker im Vergleich der Ränge

	Gesunde	OA	RA	SLE
CD206	+++++	++	+++	+
CD163	++	+	+++++	+++
CD86	+++++	+++	+	++
CD16	+++++	+	+++	++
CD14	++	+++	+++++	+
IL-6	+++++	+++	++	+
IL-10	+++++	+	++	+++
TNF- α	+++++	+++	++	+
TGF- β	+++	+	+++++	++

Zuordnung der Ränge im Kruskal-Wallis-Test für die Oberflächenmarker CD206, CD163, CD86, CD16, CD14 auf den nach sieben Tagen aus Monozyten gesunder Probanden differenzierten Makrophagen sowie die von ihnen produzierten Zytokine Interleukin 6 (IL-6), Interleukin 10 (IL-10), Tumor Nekrose Faktor alpha (TNF- α) und *transforming growth factor beta* (TGF- β) je Stimulation der Monozyten mit gesundem Serum (20 Probanden), dem Serum von Patienten mit Osteoarthrose (OA, 11 Patienten), rheumatoider Arthritis (RA, 20 Patienten) und systemischem Lupus erythematodes (SLE, 5 Patienten). , der höchste Rang entspricht „+++++“, der zweite Rang „+++“, der dritte Rang „++“ und der niedrigste Rang „+“.

3.6 Multinomial logistische Regression

Die multinomial logistische Regression ermittelt den Einfluss der Markerexpression auf die Zuordnung zur Stimulationsgruppe. Die Analyse bezieht sich auf die Stimulation mit den Seren der Patientengruppen OA und RA in Referenz zur Stimulation mit dem Serum Gesunder. Die Patientengruppe mit SLE wurden aufgrund der geringeren Fallzahl in dieser Analyse nicht verwendet. Als Ergebnis der Analyse wurde das *Odds Ratio* (OR) mit 95 % Konfidenzintervall und der p-Wert bestimmt. Für ein *Odds Ratio* > 1 steigert die Expression des Oberflächenmarker die Wahrscheinlichkeit zur untersuchten Gruppe zu gehören (und nicht zur Referenzgruppe). Für ein *Odds Ratio* < 1 wird die Wahrscheinlichkeit kleiner, bei Expression des Oberflächenmarkers zur untersuchten Gruppe zu gehören.

Es gab keine signifikante Abweichung zwischen der Zuordnung durch das aktuelle Modell und den beobachteten Daten ($p = 0,996$; Pearson-Chi-square Test). Das Modell bot daher eine gute Anpassung. Mit Hinzufügen der Oberflächenmarker CD206, CD68, CD163, CD14 und CD16 passte das Modell insgesamt signifikant besser zu den Daten als ohne die Oberflächenmarker ($p < 0,001$; Likelihood-Quotient-Tests). Jeder der Marker CD206, CD163, CD14 und CD16 verbesserte für sich genommen signifikant die Anpassung des Modells (je Marker $p < 0,001$; Likelihood-Quotienten-Tests). Die Vorhersage durch CD86 eignete sich jedoch nicht zur Verbesserung des Modells ($p = 0,124$).

Für die Gruppe der mit OA-Serum differenzierten Makrophagen zeigten die Marker CD206 ($p < 0,001$), CD163 ($p = 0,002$), CD14 ($p < 0,001$) und CD16 ($p < 0,001$) die beste Beschreibung (s. Tabelle 6). Der Zusammenhang mit CD86 war nicht signifikant ($p = 0,126$). Nahm die Expression des Markers CD206 zu, sank die Wahrscheinlichkeit, dass die betrachteten Makrophagen mit OA-Serum differenziert wurden (OR 0,387; 95% KI [0,221; 0,678]). Die Erhöhung des Markers CD163 (OR 0,761; 95% KI [0,642; 0,902]) und des Markers CD16 (OR 0,602, 95% KI [0,455; 0,796]) senkten die Wahrscheinlichkeit ebenfalls, dass die betrachteten Makrophagen mit OA-Serum differenziert wurden. Die Expression des Markers CD14 wirkte hingegen als Prädiktor für die Differenzierung mit OA-Serum (OR 1,015; 95% KI [1,007; 1,023]).

Tabelle 6: Odds Ratio von OA zu Gesunden

Parameter	OR	95% KI	p-Wert
CD206	0,387	0,221 – 0,678	0,001
CD86	1,090	0,976 – 1,216	0,126
CD163	0,761	0,642 – 0,902	0,002
CD14	1,015	1,007 – 1,023	< 0,001
CD16	0,602	0,455 – 0,796	< 0,001

Einfluss der Marker CD206, CD86, CD163, CD14 und CD16 auf die Wahrscheinlichkeit, dass die betrachteten Makrophagen durch das Serum von Patienten mit Osteoarthritis (OA) differenziert wurden in Referenz zu den mit gesundem Serum differenzierten Makrophagen. Angabe des Odds Ratio (OR), des zugehörigen 95% Konfidenzintervalls (KI) und des *p*-Wertes.

Für die Einordnung in die Gruppe der mit RA-Serum differenzierten Makrophagen lieferten die Marker CD206 ($p < 0,001$), CD163 ($p = 0,018$), CD14 ($p = 0,005$) und CD16 ($p = 0,010$) einen Beitrag (s. Tabelle 7). Bei CD86 war der Beitrag dagegen nicht signifikant ($p = 0,978$). Die Expression von CD206 zeigte sich als negativer Prädiktor für durch RA-Serum differenzierten Makrophagen (OR 0,269; 95% KI [0,157; 0,459]), ebenso verringert die Expression von CD16 die Wahrscheinlichkeit, dass die betrachteten Makrophagen durch RA-Serum differenziert wurden (OR 0,819; 95% KI [0,704; 0,953]). Die Marker CD163 (OR 1,056; 95% KI [1,009; 1,105]) und CD14 (OR 1,007; 95% KI [1,002; 1,012]) erhöhten hingegen pro Einheit die Wahrscheinlichkeit, dass die Makrophagen mit RA-Serum differenziert wurden.

Tabelle 7: Odds Ratio von RA zu Gesunden

Parameter	OR	95% KI	p-Wert
CD206	0,268	0,157 – 0,459	< 0,001
CD86	1,001	0,904 – 1,109	0,978
CD163	1,056	1,009 – 1,105	0,018
CD14	1,007	1,002 – 1,012	0,005
CD16	0,819	0,704 – 0,953	0,010

Einfluss der Marker CD206, CD86, CD163, CD14 und CD16 auf die Wahrscheinlichkeit, dass die betrachteten Makrophagen durch das Serum von Patienten mit rheumatoider Arthritis (RA) differenziert wurden, als Referenz dienen die mit gesundem Serum differenzierten Makrophagen. Angabe des Odds Ratio, des zugehörigen 95 %-Konfidenzintervalls (KI) und des *p*-Wertes.

3.7 Random Forest

Die *Random Forest* Analyse diente als Klassifikationsverfahren für die Zuordnung der differenzierten Makrophagen aus den Serumstimulationen zu den durch Zytokinstimulation definierten Phänotypen M1 und M2. Dabei wurden anhand der Oberflächenmarker die Zuordnung M1 und M2 mit binären Entscheidungsbäumen getroffen. Durch Wiederholungen der einzelnen Entscheidungsbäume (*decision trees*, 1000 *Bootsrap*ziehungen) erhielten wir einen Entscheidungswald (*decision forest*). Dieser Entscheidungswald, der mit den Daten aus der Zytokinstimulation trainiert wurde, traf dann für die serumstimulierten Daten die Klassifikation M1 oder M2.

Dabei betrug die Wahrscheinlichkeit, durch das Serum Gesunder M1-Makrophagen zu differenzieren 37,8 % (95% KI [33,7; 42,4]) und M2-Makrophagen zu entwickeln 62,2 % (95% KI [57,6; 66,3]). Die Wahrscheinlichkeit, durch das Serum Gesunder M2 zu differenzieren, lag damit höher. Bei der Differenzierung der Makrophagen durch das Serum von Patienten mit OA war die Wahrscheinlichkeit für M1 mit 68,2 % (95% KI [62,4; 73,3]) höher als bei den Gesunden. Bei den durch das Serum von Patienten mit RA differenzierten Makrophagen waren die Chancen für M1 mit 49,7 % (95 %-KI [43,8; 55,6]) ausgeglichen zu M2 mit 50,3 % (95% KI [44,4; 56,2]). Damit lag die Wahrscheinlichkeit für M1 bei den durch das Serum von Patienten mit RA differenzierten Makrophagen höher als bei den durch das Serum Gesunder differenzierten Makrophagen und niedriger als bei durch das Serum von Patienten mit OA differenzierten Makrophagen. SLE-Seren differenzierten die Makrophagen mit einer Wahrscheinlichkeit von 41,8 % (95% KI [32,9; 50,3]) für M1 als statistischer Trend eher zu M2 mit einer Wahrscheinlichkeit von 58,2 % (95% KI [49,7; 67,1]). Damit lag die Wahrscheinlichkeit für M1 signifikant niedriger als bei der Differenzierung durch OA-Seren und als Trend etwas höher als bei der Differenzierung durch das Serum Gesunder (s. Abbildung 25).

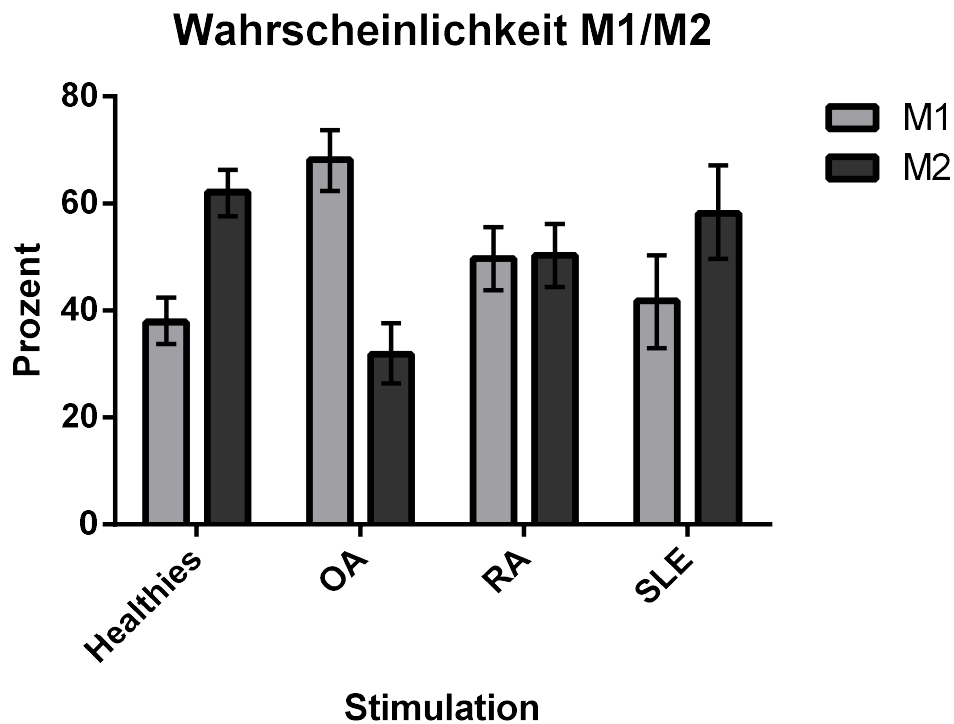


Abb. 26: Zuordnung Serumstimulation zu den Phänotypen M1 und M2

Darstellung der Wahrscheinlichkeit für die Phänotypen M1 oder M2 aus dem *Random Forest* Modell, das anhand der Oberflächenmarker CD206, CD163, CD86, CD14 und CD16 in der Zytokinstimulation mit Lipopolysaccharid (LPS) und Interferon gamma (IFN- γ) für M1 sowie Interleukin 4 (IL-4) und Interleukin 13 (IL-13) für M2 trainiert wurde, je Simulation mit dem Serum Gesunder (20 Probanden, *Healthies*) und dem Serum von Patienten mit rheumatoider Arthritis (RA, 20 Patienten), mit Osteoarthrose (OA, 11 Patienten) und systemischem Lupus erythematodes (SLE, 5 Patienten). Angabe der Wahrscheinlichkeit in Prozent auf der y-Achse und der Serumstimulation auf der x-Achse.

4 Diskussion

4.1 Anteil differenzierter Makrophagen

Unter allen Stimulationen erfolgte eine Differenzierung von Monozyten zu Makrophagen und das Überleben für sieben Tage. Der höchste Anteil zeigte sich nach der Zytokinstimulation, bei der M-CSF als Wachstumsfaktor genutzt wurde (in Kulturmedium mit 10 % FBS). M-CSF hat *in vivo* ebenso wie *in vitro* einen wichtigen Einfluss auf das Überleben und die Differenzierung der Makrophagen, in dem es die Apoptose hemmt und die Anzahl der polarisationsempfänglichen Makrophagen steigert [109], [110], [111]. Im Mausmodell erhöht M-CSF die Anzahl der zirkulierenden Monozyten und Makrophagen [112]. Zwischen den Stimulationen für M1 (LPS und IFN- γ) und für M2 (IL-4, IL-13) zeigte sich kein Unterschied im Anteil der Makrophagen. Auf die Differenzierung von Monozyten zu Makrophagen hatten sie in dieser Untersuchung keinen spezifischen Einfluss.

In der Serumstimulation ließ sich mit der Konzentrationssteigerung von 20 % auf 40 % ein höherer Anteil differenzierter Makrophagen beobachten. Unter der Stimulation mit FBS kam es unabhängig von der Konzentration zu einer schlechteren Differenzierung von Makrophagen als unter den anderen Stimulationen. Die schlechtere Differenzierung durch FBS im Vergleich zu humanem Serum ist auch in einer anderen Studien nachgewiesen worden [113]. Mögliche Gründe sind die nicht zu den humanen Monozyten passende Spezies und die Hitzeinaktivierung des FBS. Für einige Zelllinien ergaben Untersuchungen, dass ihr Wachstum in FBS durch die Hitzeinaktivierung eingeschränkt ist [109]. Dennoch lassen sich in dieser Arbeit mit FBS ohne Zugabe weiterer Zytokine Makrophagen aus humanen Monozyten differenzieren. Die Seren von Patienten mit SLE zeigten bei 20 % Serum im Vergleich zu den anderen Patientengruppen ebenfalls eine schlechtere Differenzierung und Überleben der Makrophagen. Bei einem Serumanteil von 40% war dieser Unterschied nicht signifikant. Diese Beobachtung passt zur höheren Apoptoserate von PBMCs, die im peripheren Blut von SLE-Patienten beschrieben ist [114]. Die Daten dieser Arbeit sprechen für einen Einfluss von Faktoren im Serum auf das verminderte Überleben der Zellen. Der Einfluss des SLE-Serums auf die Induktion von Apoptose wurde bereits in anderen Studien an

gesunden humanen Monozyten sowie Monozytenzelllinien nachgewiesen, Veränderungen im Komplementsystem, Autoantikörper und Zytokine wie TNF- α werden als Faktoren diskutiert [115], [116]. Eine weitere Studie legt dar, dass die verstärkte Apoptoseneigung durch SLE-Serum auf der Induktion von klassischer Caspase-abhängiger Apoptose über Death-Rezeptor unabhängige Mechanismen beruhe [117]. Die Seren der Gesunden, RA und OA waren in dieser Arbeit gut geeignet, um Makrophagen zu differenzieren. In den Serumfaktoren, die die Differenzierung der Makrophagen begünstigen, zeigte sich kein relevanter Unterschied zwischen den Gruppen.

4.2 Zytokinstimulation für M1 und M2

4.2.1 Expression Oberflächenmarker

Die Oberflächenmarker CD206 und CD163 wiesen wie in der Literatur beschrieben eine höhere Expression unter M2 Bedingungen auf und CD86 wies unter M1 Bedingungen eine höhere Expression auf [54], [56]. Die Zytokinstimulation bewirkte somit eine erfolgreiche Polarisation undifferenzierter Makrophagen in Richtung der erwarteten Phänotypen M1 und M2. Bei CD16 zeigte sich hingegen kein Unterschied zwischen den Stimulationen. CD16 gilt in der Literatur häufig als Marker für den Phänotyp M1 [54]. Andererseits zeigte die Stimulation von humanen Monozyten mit IFN- γ für einen M1-Phänotyp und mit IL-4 für einen M2-Phänotyp in einer anderen Studie ebenfalls keinen signifikanten Unterschied bei der Expression von CD16 [118]. CD16 scheint gegebenenfalls ein weniger eindeutiger und konsistenter Marker für M1 zu sein, er wird daher in dieser Arbeit zurückhaltend beurteilt in Bezug auf die Einteilung zu den Phänotypen M1 und M2.

4.2.2 Zytokinmessung im Zellkulturüberstand

Bei den M1-stimulierten Makrophagen wurde wie erwartet eine höhere Sekretion der Zytokine IL-6 und TNF- α nachgewiesen, es konnte ein funktionaler M1-Phänotyp hervorrufen werden. Bei den Zytokinen IL-10 und TGF- β zeigte sich kein signifikanter Unterschied zwischen M1 und M2 stimulierten Zellen. IL-10 gilt in der Literatur als ein klassischer Marker für M2-Makrophagen, niedrige Level werden jedoch auch von M1-Makrophagen produziert [119]. Die Produktion kann u.a. auch durch den M1-Stimulator LPS angeregt werden [59], [120]. In einer anderen Studie

konnte ebenfalls kein Unterschied in der Sekretion für IL-10 zwischen den Phänotypen M1 und M2 nachwiesen werden, da IL-10 von allen stimulierten Makrophagentypen in geringfügigen Mengen produziert wurde [121]. Darüber hinaus zeigen die M2-Subtypen eine unterschiedliche Produktion von IL-10. Besonders hohe Level sind für den Subtyp M2b beschrieben [5] und liegen in der Literatur höher als bei dem in der vorliegenden Arbeit stimulierten M2a Phänotyp [58]. Weitere Studien zeigten bei der Differenzierung von M1-Makrophagen eine moderate Sekretion von IL-10, beim Subtyp M2b hohe Level und bei den Subtypen M2a und M2c lediglich niedrige Sekretionslevel [122], [123]. Aus diesem Grund ist der Nachweis signifikanter Unterschiede und damit eine Abgrenzung zum M1-Phänotyp erschwert. Es lässt sich in der Literatur daher nicht mit jeder M2-Stimulation im Vergleich zu M1 eine höhere Produktion von IL-10 bewirken. In dieser Studie haben wurden M1-Makrophagen differenziert, die neben den proinflammatorischen Zytokinen auch IL-10 und TGF- β produzieren können, während die M2a-Stimulation mit IL-4 und IL-13 Makrophagen mit mäßiger Produktion an IL-10 und TGF- β differenzierte. Dennoch sind die Marker anhand der Literatur insgesamt weiterhin M2 in Abhängigkeit der gewählten Stimulation und des Subtyps zuzuordnen.

4.2.3 Bewertung der Zytokinstimulation

Zusammenfassend wurden die Makrophagen im verwendeten Versuchsaufbau erfolgreich mit Zytokinen zu M1 und M2 polarisiert. Der stimulierte Phänotyp M1 ergab die charakteristische Expression von CD86 in Kombination mit der Produktion von IL-6 und TNF- α . Der Phänotyp M2 exprimierte die charakteristischen Marker CD206, CD163. Die nicht wie initial erwartet verteilten Marker CD16, IL-10 und TGF- β zeigen auch in der Literatur teilweise inkonsistente Ergebnisse und lassen sich u.a. auf unterschiedliche Stimulationswege bezüglich Zytokinkombinationen und Stimulationsdauer im konkreten Modell zurückführen.

4.3 Stimulation mit humanem Serum und FBS

4.3.1 Expression Oberflächenmarker

Das Serum der Gesunden induzierte nach sieben Tagen eine hohe Expression des Markers CD206. Dies wurde vor allem bei der Stimulation mit 40 % Serum deutlich und weist darauf hin, dass im Serum von Gesunden Faktoren vorhanden sind, die den M2-typischen Marker und damit die Polarisation zu M2 in Abhängigkeit von der Konzentration begünstigen. Mögliche Faktoren hierbei, die *in vitro* die Expression von CD206 fördern, sind die Zytokine TGF- β und IL-4 oder Wachstumsfaktoren wie GM-CSF [124], [125]. In allen anderen Gruppen blieb die konzentrationsabhängige Induktion des M2-Markers CD206 aus.

Der Oberflächenmarker CD86 wies ähnliche Werte zwischen den Gruppen auf. Nach Stimulation mit dem Serum Gesunder war die höchste Expression von CD86 (signifikant zu FBS und RA) messbar. Eine hohe Expression von CD86 spricht jedoch nicht zwangsweise für den Phänotyp M1, sondern wird auch beim M2-Subtypen M2b exprimiert [54], [57]. Ein weiterer Hinweis, dass CD86 nicht als eindeutiger Marker für M1 angesehen werden kann, ist die Hochregulation von CD86 durch u.a. IL-4, das *in vitro* klassischerweise für die Stimulation des Phänotyps M2 verwendet wird [118]. Vor allem im Vergleich zu RA-Serum ließ sich die Expression von CD86 mit gesundem Serum besser induzieren.

Für CD163 zeigte die Verwendung der Seren von Gesunden und Patienten mit RA sowie SLE hohe Werte. Auffällig ist hingegen der deutlich niedrigere Wert bei Verwendung von OA-Serum. Dies spricht für eine Polarisation zu einem M1-Phänotyp durch OA-Serum, während durch Serum von RA- und SLE-Patienten mit der Expression von CD163 und niedriger Expression von CD206 ein M2-ähnlicher Subtyp induziert wird. So wird beim Subtyp M2c die vermehrte Expression von CD163 beschrieben [57]. Des Weiteren können erhöhte Serumlevel von IL-10 bei Patienten mit SLE einen Einfluss auf die Expression von CD163 haben, da *in vitro* die Stimulation mit IL-10 den Marker CD163 spezifisch hochreguliert [118]. Außerdem gilt IL-6 als Induktor von CD163 [82]. Neben einer Erhöhung des Serumlevels von IL-10 bei SLE ist auch das Serumlevel von IL-6 bei SLE und RA erhöht [15], [31], [32]. Auch eine eventuell vorhandene Therapie mit Glucocorticoiden oder Ciclosporin A kann Einfluss auf die Ausbildung des

Phänotyps mit einer hohen Expression von CD163 nehmen, da Glucocorticoide CD163 hochregulieren und Ciclosporin A die Expression vermindert [126]. In einer Studie zur Differenzierung von SLE-Monozyten aus dem peripheren Blut konnte mittels genetischer Analyse gezeigt werden, dass CD163 unabhängig von Serumeinflüssen mehr als in den gesunden Kontrollen hochreguliert wurde [127]. In einer weiteren Studie war CD163 bei Stimulation von gesunden Monozyten mit M1-Zytokinen (GM-CSF, LPS, IFN- γ) in Anwesenheit von 20% SLE-Serum signifikant erhöht [128]. Daher scheinen sowohl die Monozyten als auch die Faktoren im Serum von SLE einen Phänotyp mit hoher Expression von CD163 zu begünstigen. Bei RA zeigte sich in einer Studie bei der spontanen Differenzierung der RA-Monozyten kein Unterschied in der Expression von CD163 zwischen RA und Gesunden [129]. Dies spricht für eine entscheidendere Rolle des Serums bei der Induktion von CD163 in Patienten mit RA.

Die Expression von CD14 lag bei den Stimulationen mit FBS, mit gesundem Serum, mit OA-Serum und RA-Serum auf einem ähnlichen Niveau. Unter der Stimulation mit SLE-Serum hingegen ließ sich im Vergleich zu den anderen Stimulationen signifikant weniger CD14 nachweisen. CD14 spielt bei der Phagozytose apoptotischer Zellen durch Makrophagen eine wichtige Rolle [130]. Bei Patienten mit SLE ist diese Funktion der Makrophagen fehlerhaft und auch *in vitro* ist die Efferozytose durch Makrophagen, die aus Monozyten des peripheren Blutes generiert wurden, bei Patienten mit SLE im Vergleich zu Gesunden signifikant gestört [17], [131]. Der negative Einfluss von Faktoren aus dem Serum bei SLE auf die Expression von CD14 kann als möglicher Baustein bei der Erklärung des Efferozytosedefekts bei SLE dienen. Bei Verlust von CD14 kommt es zur Akkumulation apoptotischer Zellen [26]. CD14-depletierte Mäuse zeigen eine defekte *Clearance* apoptotischer Zellen, die durch noch vorhandene antiinflammatorische Signale alleine noch nicht zur Entstehung von Inflammation und Autoimmunität führt [72]. Für die Entstehung von Autoimmunität scheinen daher weitere Veränderungen in der inflammatorischen Antwort notwendig zu sein. Ob die defekte Efferozytose in SLE vorwiegend auf einen anlagebedingten Defekt der Makrophagen oder sekundär durch Abnormalitäten im Serum bedingt wird, ist nicht vollständig geklärt [131]. Die verminderte Expression des Efferozytoserezeptors CD14 bei Differenzierung von Makrophagen mittel SLE-Serum in dieser Arbeit deutet auf einen relevanten Einfluss von Faktoren im Serum der Patienten hin.

Die Expression von CD16 ist bei der Stimulation mit OA-Serum deutlich niedriger als bei Verwendung anderer Seren. Das Serum von OA differenziert Makrophagen mit insgesamt weniger spezifischen M1- oder M2-Oberflächenmarker abseits von CD14. Es zeichnet sich anhand der Oberflächenmarker ein eher unspezifischer Phänotyp ab.

4.3.2 Zytokinmessung im Zellkulturüberstand

Das Zytokin IL-6 wurde durch mit gesundem Serum stimulierten Makrophagen am meisten gebildet, während es im Serum von Gesunden je nach Studie nicht nachweisbar ist [132] oder nur in äußerst geringen Konzentrationen gemessen wird [133]. Die deutlich höheren Werte für IL-6 im Zellüberstand der Makrophagen, die mit gesundem Serum differenziert wurden, ist daher mit hoher Wahrscheinlichkeit auf einen IL-6 produzierenden Phänotyp zurückzuführen. Dies kann für einen M1 ähnlichen Phänotyp oder den Subtyp M2b sprechen [54], [57]. Auch im Vergleich zu den Patienten mit RA, die schon im Serum höhere Werte von IL-6 (RA durchschnittlich 53,7 pg/mL, Gesunde 5,1 pg/mL) abhängig von der Krankheitsaktivität aufweisen [15], lagen die durch gesundes Serum differenzierten Makrophagen in ihrer Produktion von IL-6 signifikant höher.

Auch bei TNF- α zeigten die Makrophagen, die mit Serum von Gesunden differenziert wurden im Zellüberstand die höchsten Werte. Diese lagen signifikant höher als bei Makrophagen, die mit Serum von SLE-Patienten oder FBS differenziert wurden. Im Serum Gesunder sind die Werte von TNF- α je nach Messung nicht detektierbar [132] oder in einem sehr niedrigem Bereich [133]. Im Serum von RA und SLE sind die Level jedoch höher als bei Gesunden [16], [134]. Der durch gesundes Serum differenzierte Phänotyp zeichnet sich also durch eine vermehrte Produktion von TNF- α aus. Dies ist erneut mit einer Differenzierung zum Phänotyp M1 oder M2b erklärbar [54], [57].

IL-10 lag auch bei mit gesundem Serum stimulierten Makrophagen auf dem höchsten Niveau, während es im Serum von Gesunden nicht [135] oder nur niedrig [133] messbar ist. Es wurde bei der Stimulation der Monozyten mit gesundem Serum daher einen Makrophagenphänotyp polarisiert, der mehr IL-10 produziert als bei der Stimulation mit Patientenseren oder FBS. Der Unterschied zwischen den durch das Serum Gesunder und von Patienten mit RA differenzierten Makrophagen

war in diesem Fall signifikant, bei den durch das Serum von Patienten mit OA und SLE differenzierten Makrophagen lassen sich Trends ableiten. Durch die Stimulation mit gesundem Serum konnte außerdem ein M2-Phänotyp polarisiert werden, der eine deutlichere IL-10-Produktion aufwies als durch die M2-Stimulation mit den Zytokinen IL-4 und IL-13. Zusammenfassend liegt die Vermutung nahe, dass im gesunden Serum neben den in der Zytokinstimulation verwendeten Substanzen noch weitere Faktoren vorhanden sind, die auf die Funktionalität der Makrophagen entscheidenden Einfluss nehmen.

Bei TGF- β zeigten die mit RA-Serum sowie die mit gesundem Serum stimulierten Makrophagen die höchste Produktion. Dies spricht für eine Polarisation in Richtung M2 [48]. In der Literatur werden über die Messung von TGF- β je nach Messmethode sehr große Schwankungen angegeben. Besonders bei der Messung im Serum kommt die Spannbreite u.a. durch die Freisetzung von TGF- β aus Thrombozyten zustande [136]. Da unter Serumstimulation mit 20 % und 40 % sehr viel höhere Mengen von TGF- β produziert wurden als unter der Zytokinstimulation, ist von einem Einfluss durch das Serum und ggf. Kontamination mit Thrombozyten auszugehen. Dies wurde berücksichtigt, indem die Ergebnisse der Zytokin- und Serumstimulationen getrennt betrachtet und lediglich innerhalb der Gruppe verglichen wurde. Zudem wird der Einfluss der Serumkontamination durch die Verdünnung auf einen Anteil von 20-40 % im Kulturmedium abgemildert. Des Weiteren empfehlen Studien zur Stabilität von TGF- β eine Lagerung bei 4 °C oder bei noch niedrigeren Temperaturen für spätere Messungen [137]. Nach der Stimulation von sieben Tagen bei 37 °C in den vorliegenden Versuchen ist daher mit einer Abnahme des ursprünglich vorhandenen TGF- β zu rechnen. Sowohl durch die Verdünnung als auch durch die Dauer der Stimulation wird der Einfluss des möglichen TGF- β aus dem Serum mutmaßlich geringer. Des Weiteren zeigten sich zwischen der Stimulation mit 20 % und 40 % nicht proportionale Veränderungen im Verhältnis zwischen den Stimulationsgruppen. Dies spricht ebenfalls für den relevanten Einfluss der Produktion durch Monozyten/Makrophagen während der Stimulation.

4.4 Übersicht Marker je Stimulation

Durch FBS differenzierte Makrophagen zeigten überwiegend eine niedrige Zytokinsekretion und wenig Expression der Oberflächenmarker. Am ehesten wurde der Marker CD206 im Vergleich der Gruppen auf einem etwas höherem Niveau exprimiert. Die Stimulation mit FBS induziert daher einen eher wenig polarisierten Phänotyp. Ein möglicher Grund ist wie bei der geringeren Differenzierung zu Makrophagen (siehe Abb. 6 und 7) die Hitzeinaktivierung. Außerdem lässt sich durch die Exposition verschiedener Pathogene während der evolutionären Entwicklung zwischen den Spezies eine Variabilität der Makrophagendifferenzierung erwarten [138]. Dies zeigt sich z.B. darin, dass sich bei Mäusen beobachtete Ergebnisse z.B. von Makrophagenmarkern nicht immer auf den Menschen übertragen lassen [139]. Auch wenn FBS eine Differenzierung von Monozyten zu Makrophagen bewirkte, lassen sich keine eindeutigen Rückschlüsse auf den Phänotypen M1 oder M2 treffen, der damit induziert wird. Mit humanem Serum lässt sich besser eine spontane Differenzierung und Polarisierung von Makrophagen erreichen als mit FBS. In den weiteren Betrachtungen wurden daher die humanen Gruppen in den Fokus genommen.

Die mit gesundem Serum differenzierten Makrophagen wiesen sowohl typische M1- (CD86, CD16, IL-6, TNF- α) als auch typische M2-Merkmale (CD206, IL-10) in der höchsten Ausprägung auf. Die Expression des M2-Markers CD163 lag im Gruppenvergleich an dritter Stelle, allerdings mit sehr geringen Unterschieden, sodass auch dieser Marker deutlich exprimiert wurde. Zum scheinbaren Widerspruch der hohen Expression der M1- neben den M2-Markern lässt sich festhalten, dass es sich bei der Einteilung von M1 und M2 um ein *in vitro* etabliertes System handelt, bei dem die Phänotypen durch wenige Zytokine polarisiert werden. *In vivo* zeigt sich kein festgelegter Phänotyp M1 oder M2, sondern eine Mischung verschiedener Phänotypen bzw. ein Spektrum von M1 zu M2 [48]. Es handelt sich bei den Phänotypen M1 und M2 um Extreme eines heterogenen Spektrums an Phänotypen [51]. Eine M1 Signatur schließt das Vorliegen von sonst M2 zugeordneten Eigenschaften nicht aus und umgekehrt, sie können auch nebeneinander existieren [140]. Deswegen lassen sich Beobachtungen nicht immer eindeutig M1 oder M2 zuordnen [43]. Insbesondere für den Phänotyp M2 ist die Ausprägung verschiedener Untergruppen bekannt [43]. Die Expression der als

M1-typisch geltenden Marker CD86, TNF- α und IL-6 spricht in Kombination mit dem M2-typischen Zytokin IL-10 für das Vorliegen des Subtyps M2b [141]. Daher kann die Polarisation der Makrophagen mit gesundem Serum vorwiegend der Richtung M2 zugeordnet werden, bei der am ehesten eine Verteilung zwischen M2a (CD206, CD163) und M2b (CD86, IL-10, IL-6, TNF- α) dominiert. Vor allem die hohe Produktion von IL-10 spricht für den Phänotyp M2b, da der mit gesundem Serum generierte Phänotyp besser IL-10 produziert als der Phänotyp aus der Zytokinstimulation (IL-4/IL-13) für M2a.

Im Vergleich der Stimulationsgruppen mit OA-Serum fiel auf, dass mit OA-Serum differenzierte Makrophagen für keinen Marker Maximalwerte aufwiesen. Eine eher höhere Expression zeigten die Marker CD86, CD14 sowie die Level von IL-6 und TNF- α , allerdings lagen die proinflammatorischen Zytokine unter dem Niveau der Makrophagen, die mit dem Serum Gesunder erzeugt wurden. Daher wurden die mit OA-Serum induzierten Makrophagen in dieser Arbeit eher einem Phänotyp in Richtung M1 zugeordnet, da alle Marker für M2 im Vergleich zu anderen Gruppen auf einem sehr niedrigen Niveau lagen. Insgesamt scheint das Serum von OA jedoch einen wenig spezifischen und eher wenig aktiven Phänotyp zu stimulieren.

Die Differenzierung mit RA-Serum wies im Vergleich der Gruppen für die Marker CD163, CD14 und TGF- β die höchste Expression auf. Darüber hinaus zeigte sich die Expression der Oberflächenmarker CD16 und CD206, jedoch lag die Expression von CD206 deutlich unter den Gesunden. Die hohe Expression des Markers CD163 kann für den Subtyp M2c sprechen [142]. Typisch für den M2c Phänotyp ist auch die eher niedrige Expression von CD86 [142], [143]. Der Phänotyp M2c wird durch TGF- β gefördert und produziert seinerseits TGF- β , was zu den hohen Werten von TGF- β bei durch RA-Serum induzierten Makrophagen passt [5]. Die Produktion von IL-10 ist ebenfalls charakteristisch für den Phänotyp M2c, zeigt in der Messung im Überstand von RA-Serum induzierten Makrophagen jedoch lediglich mittlere Werte im Vergleich zu den mit gesundem Serum induzierten Phänotyp. Dies widerspricht jedoch nicht zwangsläufig dem Phänotyp M2c. In einer anderen Studie waren die Werte von IL-10 bei M2c im Vergleich zu M2b ebenfalls niedriger [122]. Eine zusätzliche Rolle könnte auch die Therapie bei Patienten mit RA spielen, denn Glucocorticoide fördern die Ausbildung des Phänotyps M2c [144]. In diesem Versuchsaufbau kann bezüglich eines Therapieeinflusses jedoch keine Aussage

getroffen werden. Insgesamt könnte bei der Stimulation mit RA-Serum daher ein M2c-Phänotyp vorliegen, aufgrund der eher geringen IL-10 Produktion ist allerdings auch ein eigener Subtyp unabhängig der etablierten M1 und M2 (a, b, c) Klassifikation möglich.

Die Makrophagen bei Differenzierung mit SLE-Serum wiesen wenige Marker in hoher Ausprägung auf. Am ehesten zeigten sich beim Marker CD163 und IL-10 hohe Werte. Der Spiegel von IL-10 lag allerdings ähnlich wie bei durch RA- und OA-Serum differenzierten Makrophagen deutlich unter den mit gesundem Serum differenzierten Makrophagen. Die hohe Expression von CD163 kann wie bei RA für den Subtyp M2c sprechen [142]. Die sehr niedrige Expression von CD14 und eher niedrige Expression von CD16 gilt jedoch nicht als typisch für M2c [59], [142]. Es scheint sich daher um einen eigenen Subtyp zu handeln, der vor allem CD163 exprimiert. Er kann keinem der beschriebenen Subtypen eindeutig zugeordnet werden. Insgesamt scheint es sich um einen eher inaktiveren Phänotyp zu handeln, bei dem insbesondere die geringe Expression von CD14 auffällig ist. Bei weiteren Stimulationen abseits der klassischen Wege zu M1 oder M2 (LPS, IFN- γ , IL-4, IL-10, IL-13...) z.B. durch Faktoren in chronischer Inflammation ist eine individuelle Signatur nach Makrophagendifferenzierung beschrieben, die jenseits der dichotomen M1/M2 Achse liegen kann [145]. Die Ergebnisse dieser Arbeit lassen vermuten, dass die verschiedenen Stimulationsgruppen jeweils zur Ausbildung einer eigenen Makrophagensignatur führen. Diese lassen sich mitunter nur bedingt in die beschriebenen Subtypen des klassischen M1/M2-Schemas einordnen und benötigen zur genauen Charakterisierung weitere Untersuchungen. An dieser Stelle wird deutlich, dass die M1/M2-Klassifikation für Makrophagen in SLE durch eine zu starke Vereinfachung an ihre Grenzen stößt.

4.5 Multinomial logistische Regression

Die Wahrscheinlichkeit dafür, dass der beobachtete Makrophagenphänotyp durch Stimulation mit RA-Serum erzeugt wurde, erhöht sich in der multinomial logistischen Regression leicht bei Expression von CD163 und verringert sich deutlich bei Expression von CD206 in Referenz zu den mit gesundem Serum differenzierten Makrophagen. Auch hier ist die Aussage möglich, dass sich der durch RA-Serum

polarisierte Phänotyp vor allem durch eine hohe Expression von CD163 auszeichnet, ohne den ebenfalls klassischen M2-Marker CD206 höher zu exprimieren. Eine genauere Zuteilung lässt sich hier nicht treffen. Die Daten sprechen jedoch gegen einen reinen, klassischen M2 Phänotyp und passen zu der Hypothese eines M2-Subtyps mit hohen Werten von CD163. Der Marker CD16 vermindert die Wahrscheinlichkeit dafür, dass der beobachtete Makrophagenphänotyp durch Stimulation mit RA-Serum erzeugt wurde. Dies spricht eher gegen die Polarisation zu einem reinen M1-Phänotyp. CD14 erhöht dagegen in geringem Maße die Wahrscheinlichkeit, dass der beobachtete Makrophagenphänotyp durch Stimulation mit RA-Serum polarisiert wurde. Der Marker CD14 ist insgesamt nicht sehr auffällig oder aussagekräftig für die Zuordnung der Gruppen.

Bei OA-Serum vermindert sowohl die Expression von CD206, von CD163 als auch von CD16 die Wahrscheinlichkeit, dass die beobachteten Makrophagen durch OA-Serum induziert wurden. Dies spricht für einen Phänotyp mit wenigen spezifischen Markern. Durch den deutlich negativ prädiktiven Einfluss der M2-Marker CD206 und CD163 ist der induzierte Phänotyp am ehesten in Richtung M1 einzuordnen. Die ebenfalls deutlich verminderte Wahrscheinlichkeit des M1-typischen Marker CD16 spricht jedoch gegen einen klassischen M1 Phänotyp. Die Marker CD14 und CD86 zeigen keinen wesentlichen Einfluss auf die Bestimmung des Phänotyps. Sie sind jedoch in Kombination mit dem Anteil der differenzierten Makrophagen ein Hinweis, dass die Differenzierung der Monozyten zu Makrophagen durch OA-Serum insgesamt erfolgreich war.

4.6 Random Forest

Das *Random Forest* Modell ergänzt die Einordnung der Phänotypen, die durch die verschiedenen Seren erzeugt wurden, und ist anhand der definierten M1/M2 Zytokinstimulationen bzgl. der Oberflächenmarker trainiert worden. Nach der Entscheidung des *Random Forest* induzieren gesunde Seren in 62,2 % einen Phänotyp, der dem Zytokin-induzierten M2 Phänotyp entspricht und in 37,8 % einen Phänotyp, der dem Zytokin-induzierten M1 Phänotyp zugeordnet werden kann. Dies passt zu der bisherigen Einordnung des mit gesundem Serum induzierten

Phänotyps M2. Allerdings handelt es sich nicht ausschließlich um M2-Makrophagen, da diese nur das Ende eines Spektrums sind. Der deutliche Anteil der M1 zugeordneten Makrophagen lässt sich noch weiter interpretieren. Zum einen finden sich *in vivo* gemischte Phänotypen, bei denen M1 und M2 ineinander übergehen können [51]. So wurden in einer Studie mit der Stimulation von humanen Monozyten mit Serum für sieben Tage zwei nebeneinander existierende Makrophagenmorphologien festgestellt, die in der Studie je mit einem anderen Phänotyp assoziiert werden [146]. Zum Anderen lässt sich der M1-Marker CD86, wie oben diskutiert, auch dem Subtyp M2b zuordnen [54]. Insgesamt ist somit von einer Polarisierung durch gesundes Serum in Richtung M2 auszugehen.

Die durch RA-Seren erzeugten Makrophagen verteilt der *Random Forest* ausgeglichen auf M1 und M2. Bei genauerer Betrachtung der einzelnen Marker zeigt sich, dass die hier als M2 klassifizierten Makrophagen bei RA andere Merkmale aufweisen als die bei den Gesunden als M2 eingeordnete Makrophagen. Es handelt sich um Makrophagen mit wenig CD206, CD86 und viel CD163, dies entspricht am ehesten dem Subtyp M2c [57], [142]. Da der *Random Forest* anhand der Zytokinstimulation trainiert wurde, ist die Aufteilung für die Identifikation von Subtypen nicht repräsentativ. Die gleiche Aufteilung zwischen M1 und M2 spricht daher für die Polarisierung eines eigenen Subtyps.

Bei durch SLE-Seren differenzierten Makrophagen wurden die Daten mehr einer M2-Polarisierung (58,2 %) als einer M1-Polarisierung (41,8 %) zugeordnet. Auch hier zeigte die genauere Analyse der Marker, dass es sich bei der M2-Zuordnung um einen Phänotyp mit hoher CD163-Expression und wenig CD206 handelt. Im Unterschied zu RA-Seren zeigen die Makrophagen nach Differenzierung mit SLE-Serum weniger CD14, daher liegt nach Differenzierung mit SLE-Serum ein anderer Subtyp als bei RA vor. Dies spiegelt sich z.B. in den etwas anderen Prozentwerten für M1 und M2 wider. In einer Studie zu SLE-Monozyten ist beschrieben worden, dass die Monozyten bei SLE im Vergleich zu Gesunden mit einer Tendenz in Richtung M1 ebenso wie mit Eigenschaften von M2 (CD163) assoziiert sind [127]. Die Daten des *Random Forest* sprechen für einen Einfluss des Serums von Patienten mit SLE, gesunde Monozyten eher in Richtung des Phänotyps M1 zu polarisieren.

Bei OA-Serum zeigt sich im *Random Forest* am deutlichsten eine Polarisierung zu M1 (68,2 %). Dies liegt in der genaueren Analyse an der fehlenden Expression vieler spezifischer Marker. Dazu zählen sowohl die M2-typischen Marker CD206 und CD163 als auch der für M1 beschriebene Marker CD16. Da jedoch viele Marker vermindert sind, sprechen die Daten insgesamt für einen wenig spezifisch polarisierten M1-ähnlichen Phänotyp.

4.7 Zusammenhang Atherosklerose

Bei der Stimulation mit Serum gesunder Probanden findet sich in den Versuchen eine Polarisierung zu atheroprotektiven M2-Makrophagen mit der Expression der typischen Marker CD206 und CD163 sowie der Sekretion der antiinflammatorischen Zytokine IL-10 und TGF- β . Bei genauerer Betrachtung gehen ist neben dem M2a-Subtyp mit den oben genannten Markern von einem Anteil des M2b-Subtyps auszugehen. Für den Subtyp M2b wird eine antiatherosklerotische Wirkung durch Inhibition der Leukozyteninfiltration vermutet [141], [147]. Es werden über die Reduktion der Nekrose und Apoptose von Kardiomyozyten kardioprotektive Effekte angenommen [122].

Bei den Gruppen RA und SLE ist die hohe, durch Serum induzierte Expression von CD163 in Kombination mit niedrigem CD206 auffällig. Makrophagen in atherosklerotischen Plaques können ebenfalls ein ambivalentes Muster in der Expression einiger M1- und einiger M2-Marker aufweisen [148]. CD163 wird dem als eher atheroprotektiv geltenden Phänotyp M2 zugeordnet [69]. So wurden CD163 positive Makrophagen bisher häufig als atheroprotektiv angesehen. Die Bedeutung von CD163 ist jedoch bislang nicht vollständig geklärt und wird unterschiedlich diskutiert [149]. So findet sich nach einer Studie in CD163-defizienten Mäusen ein instabilerer Plaquetyp. Die Plaques sowie deren nekrotischer Kern waren außerdem größer, es zeigte sich ein höherer Lipidgehalt und mehr proinflammatorische Zytokine [150]. Dies unterstreicht die stabilisierende Wirkung von CD163 positiven Makrophagen auf atherosklerotische Plaques. Auf der anderen Seite hinterfragen Studien die atheroprotektiven Eigenschaften von CD163 positiven Makrophagen und beschreiben die Assoziation von CD163 mit Plaquevulnerabilität und proatherogenen Eigenschaften [149]. CD163 positive Makrophagen fördern zudem

die Angiogenese, Gefäßpermeabilität und Leukozyteninfiltration in atherosklerotischen Plaques [151], [152]. Somit ist der Einfluss eines Phänotyps mit hoher CD163 Expression auf atherosklerotische Läsionen nicht sicher zuzuordnen. Da CD163 stark in hämorrhagischen Plaqueanteilen und mäßig in frühen Stadien der Atherosklerose präsent ist, scheint der Marker in den verschiedenen Phasen eine wichtige und weiterhin umstrittene Rolle zu spielen [148]. Ihm kann jedoch nicht eindeutig eine protektive Funktion zugeschrieben werden.

Bei Differenzierung mit OA-Seren zeigten die Oberflächenmarker am ehesten einen M1-ähnlichen bzw. wenig differenzierten Phänotyp an. Der M1-Phänotyp ist mit der Instabilität und Progression von atherosklerotischen Plaques assoziiert [69], [153]. Es kann hier nicht sicher differenziert werden, ob es sich bei Differenzierung mit OA-Seren in Bezug auf Atherosklerose um einen ungünstigen oder wenig beeinflussenden, inaktiven Phänotyp handelt.

Insbesondere die Stimulation mit gesundem Serum bewirkte eine Bildung von Makrophagen, die IL-10 in größeren Mengen produzieren. IL-10 zeigt einen antiatheromatösen Effekt im Mausmodell durch Inhibition der Lipidaufnahme und scheint antiapoptotische Eigenschaften zu haben [154]. Des Weiteren hemmt IL-10 die Formation zu M1 und wirkt dadurch protektiv auf atherosklerotische Läsionen [155]. Dies bestätigt die Annahme, dass Gesunde im Gegensatz zu den systemisch rheumatischen Erkrankungen mit ihren Mediatoren im Serum am ehesten einen atheroprotektiven Phänotyp stimulieren. Diese Beobachtung stimmt mit ihrem im Vergleich niedrigeren kardiovaskulären Risiko überein. Weder OA-, RA- oder SLE-Seren induzierten Makrophagen die ähnlich viel IL-10 produzierten. Daher scheinen die mit gesundem Serum differenzierten Makrophagen abseits von M1 einen günstigen Phänotyp in Bezug auf Atherosklerose auszubilden.

Sowohl bei durch OA-, RA- als auch SLE-Serum differenzierten Makrophagen finden sich Hinweise, dass es sich um einen weniger günstigen Phänotyp in Bezug auf Atherosklerose handelt, im Vergleich zur Stimulation mit gesundem Serum. Dabei könnte eine verminderte Fähigkeit zur Efferozytose eine Rolle spielen. In den initialen Phasen von Atherosklerose findet sich im Mausmodell vorwiegend der Phänotyp M2 [69], der eine hohe Phagozytosefähigkeit aufweist [156]. Die Fähigkeit zur Efferozytose wirkt sich durch die Bildung anti-inflammatorischer Zytokine positiv auf die atherosklerotische Läsion aus [62].

Fördern systemische Faktoren im Serum jedoch die Ausbildung eines atherogenen Phänotyps mit verminderter Fähigkeit zur Efferozytose, kann dies ein Grund für das häufigere und frühere Auftreten von Atherosklerose in Patienten mit systemisch rheumatischen Erkrankungen sein. Eine verminderte Fähigkeit zur Efferozytose wird auch bei Patienten mit SLE beschrieben [17], [29]. In diesem Zusammenhang zeigte die Differenzierung mit SLE-Serum in diesem Versuch eine verminderte Expression des Efferozytoserezeptors CD14 auf den entstehenden Makrophagen [46].

4.8 Bewertung und Limitationen der Methode

Ein Vorteil dieser Studie liegt darin, dass alle im Serum vorhandenen Mediatoren für die Stimulation der Monozyten genutzt werden. Neben den klassischen Zytokinen (TNF- α , IL-10, TGF- β , IFN- γ o.ä.) für die *in vitro* Stimulation von M1 und M2, können auch unbekannte Faktoren sowie das komplexe Zusammenspiel von Mediatoren in dem Versuchsaufbau ihre Wirkung entfalten. So ließ sich eine krankheitsspezifische, charakteristische Polarisation zu Phänotypen auch außerhalb des dichotomen M1/M2-Schema zeigen. Außerdem wurde die Wirkung des Serums nicht durch Faktoren wie die zusätzliche Gabe von M-CSF oder anderen Zytokinen beeinflusst

Indem sich diese Arbeit auf den Einfluss der systemischen Komponente über Serumfaktoren konzentriert, kann keine Aussage zu den Faktoren getroffen werden, die im Gewebe die Polarisation der Makrophagen beeinflussen. Außerdem ist mit sieben Tagen eine längere Einwirkzeit der Serumzytokine als *in vivo* für die Differenzierung der Makrophagen nötig. Bei der Atherogenese wandern Monozyten unter Einfluss von Faktoren aus dem peripheren Blut ein und bilden neue Makrophagen in einem fortwährenden Prozess [61], [157]. In diesen Prozessen können die Mediatoren aus dem Serum einen entscheidenden Einfluss haben, daher ist insgesamt von einer relevanten Prägung durch im Serum enthaltene Faktoren auszugehen.

Durch die Verwendung gesunder Monozyten für alle Stimulationen können die dargestellten Effekte überwiegend auf die Serumfaktoren zurückgeführt werden. In dieser Arbeit wurden die systemischen Veränderungen von Entzündungsmediatoren bei den rheumatischen Erkrankungen und OA in den

Fokus genommen. Weitere möglicherweise modulierenden Einflussfaktoren wie Art der Therapie, Krankheitsaktivität, Alter, BMI oder Rauchen sind in dieser Studie jedoch wenig aussagekräftig bzw. nicht untersucht und müssen in weiteren Studien mit entsprechenden Untergruppen geklärt werden. Ein Einfluss dieser Faktoren auf die Ergebnisse ist daher nicht auszuschließen.

Inwiefern der je Erkrankung gebildete Subtyp anti-inflammatorische oder proinflammatorische sowie anti-atheromatöse oder atherogene Eigenschaften aufweist, kann anhand vorheriger Studien und den beschriebenen Markern dargelegt werden. Allerdings gibt der Phänotyp von Makrophagen zwar Hinweise, aber keine zwangsläufige Auskunft über die Funktion [111]. Der unmittelbare Einfluss des stimulierten Phänotyps auf Atherosklerose muss ebenfalls in weiteren Studien untersucht werden.

4.9 Schlussfolgerung

Die dargestellten Ergebnisse bestätigen zum Teil die Hypothese, dass Serum von RA und von SLE im Vergleich zum Serum von Gesunden und von OA-Makrophagen eher zum Phänotyp M1 differenzieren lässt. Die mit gesundem Serum differenzierten Makrophagen wiesen über Expression von CD206 und CD163 am eindeutigsten auf einen M2-Phänotyp (M2a) hin. Sie zeigten auch funktionell die M2-typische Produktion von IL-10 und TGF- β . Die zusätzliche Expression der Marker CD86, IL-6 und TNF- α deutet auf einen Anteil des Subtyps M2b. Insgesamt ist daher von einer Dominanz anti-inflammatorischer M2-Phänotypen auszugehen, die eher günstig auf Atherosklerose wirken und durch gesundes Serum induziert werden. Bei RA-Seren und SLE-Seren lässt sich durch die niedrige Expression von CD206 und IL-10 durch induzierte Makrophagen ein Trend in Richtung M1 nachvollziehen. Allerdings exprimieren die induzierten Makrophagen in beiden Fällen den M2-typischen Marker CD163. Dies spricht gegen einen reinen M1-Phänotyp und für einen eigenen Subtyp mit hoher Expression von CD163. Bei Differenzierung mit SLE-Serum zeigt sich eine weitere Besonderheit, vor allem in der niedrigen Expression des Opsoninrezeptors CD14 auf den induzierten Makrophagen und dem generell geringeren Anteil differenzierter Makrophagen. Diese Beobachtung kann mit der erhöhten Apoptoserate von PBMCs und der

defekten Efferozytose beim SLE assoziiert werden. Bei Differenzierung mit OA-Seren zeigt sich auf den induzierten Makrophagen mit niedriger Expression von CD163, CD206 und CD16 sowie niedriger Sekretion der M2-typischen Zytokine IL-10 und TGF- β am ehesten ein M1-ähnlicher Phänotyp bzw. ein wenig spezifischer Phänotyp. Der Einfluss der unter RA-, SLE- und OA-Serum induzierten Makrophagen auf Atherosklerose lässt sich anhand der Literatur im Vergleich zum Einfluss der gesunden Seren als weniger günstig einschätzen. Die Ergebnisse zu den Stimulationsgruppen je Erkrankung unterstützen, dass es sich bei der M1/M2-Klassifikation um ein vereinfachtes Modell handelt, das um neue Makrophagensignaturen je nach pathologischem Prozess erweitert werden sollte. Des Weiteren sind Zusammenhänge zwischen Phänotyp und Funktion der Makrophagen weiter zu untersuchen. Es zeigte sich darüber hinaus, dass sich schon mit Faktoren aus dem Serum eine Prägung zu einem Muster an Phänotypen erreichen ließ. Dies spricht für den Einfluss der systemischen Komponente bei RA und SLE auf die Makrophagenpolarisation und die Relevanz in Bezug auf kardiovaskuläre Erkrankungen.

5 Literaturverzeichnis

- [1] A. Y. Gasparyan, "Cardiovascular risk and inflammation in rheumatic diseases," *Rheumatology International*, vol. 37, no. 1. Springer Berlin Heidelberg, pp. 1–2, 2017, doi: 10.1007/s00296-016-3619-8.
- [2] G. Stojan and M. Petri, "Atherosclerosis in Systemic lupus erythematosus," *J Cardiovasc Pharmacol. Author manuscript; available PMC 2015 April 22. Publ.*, vol. 62, no. 3, pp. 255–262, 2015, doi: 10.1097/FJC.0b013e31829dd857.Atherosclerosis.
- [3] I. Del Rincón, K. Williams, M. P. Stern, G. L. Freeman, and A. Escalante, "High incidence of cardiovascular events in a rheumatoid arthritis cohort not explained by traditional cardiac risk factors," *Arthritis Rheum.*, vol. 44, no. 12, pp. 2737–2745, 2001, doi: 10.1002/1529-0131(200112)44:12<2737::aid-art460>3.0.co;2-%23.
- [4] M. McMahon, B. H. Hahn, and B. J. Skaggs, "Systemic lupus erythematosus and cardiovascular disease: Prediction and Potential for Therapeutic Intervention," *Expert Rev Clin Immunol*, vol. 7, no. 2, pp. 227–241, 2013, doi: 10.1586/eci.10.98.Systemic.
- [5] D. A. Chistiakov, Y. V Bobryshev, and A. N. Orekhov, "Changes in transcriptome of macrophages in atherosclerosis," *J. Cell. Mol. Med.*, vol. 19, no. 6, pp. 1163–1173, 2015, doi: 10.1111/jcmm.12591.
- [6] J. L. Jameson, D. L. Kasper, D. L. Longo, A. S. Fauci, S. L. Hauser, and J. Loscalzo, *Harrisons's principles of internal medicine, Twentieth Edition*. 2018.
- [7] G. S. Firestein, "Evolving concepts of rheumatoid arthritis," *Nature*, vol. 423, no. 6937, pp. 356–361, 2003, doi: 10.1038/nature01661.
- [8] E. G. Favalli, M. Biggioggero, C. Crotti, A. Becciolini, M. G. Raimondo, and P. L. Meroni, "Sex and Management of Rheumatoid Arthritis," *Clinical Reviews in Allergy and Immunology*, vol. 56, no. 3. pp. 333–345, 2019, doi: 10.1007/s12016-018-8672-5.
- [9] F. Wolfe *et al.*, "The mortality of rheumatoid arthritis," *Arthritis Rheum.*, vol. 37, no. 4, pp. 481–494, 1994, doi: 10.1002/art.1780370408.
- [10] J. Listing *et al.*, "Mortality in rheumatoid arthritis: The impact of disease activity, treatment with glucocorticoids, TNF α inhibitors and rituximab," *Ann. Rheum. Dis.*, vol. 74, no. 2, pp. 415–421, 2015, doi: 10.1136/annrheumdis-2013-204021.
- [11] G. D. Kitas and S. E. Gabriele, "Cardiovascular disease in rheumatoid arthritis: State of the art and future perspectives," *Ann. Rheum. Dis.*, vol. 70, no. 1, pp. 8–14, 2011, doi: 10.1136/ard.2010.142133.
- [12] D. Giannini, M. Antonucci, F. Petrelli, S. Bilia, A. Alunno, and I. Puxeddu, "One year in review 2020: Pathogenesis of rheumatoid arthritis," *Clin. Exp. Rheumatol.*, vol. 38, no. 3, pp. 387–397, 2020.
- [13] I. B. McInnes and G. Schett, "Cytokines in the pathogenesis of rheumatoid arthritis," *Nature Reviews Immunology*, vol. 7, no. 6. pp. 429–442, 2007, doi: 10.1038/nri2094.
- [14] 2 Norsuzila Ya'acob¹, Mardina Abdullah¹, 2 and Mahamod Ismail¹ *et al.*, "Cytokines in Rheumatoid Arthritis (RA)," *Intech*, vol. 32, pp. 137–144, 1989, [Online]. Available: <http://www.intechopen.com/books/trends-in-telecommunications-technologies/gps-total-electron-content-tec-prediction-at-ionosphere-layer-over-the-equatorial-region%0AInTec>.
- [15] Y. Fujikawa, M. Shingu, T. Torisu, I. Itonaga, and S. Masumi, "Synovial fluid and serum levels of soluble interleukin-6 receptor in patients with rheumatoid arthritis," *Japanese J. Rheumatol.*, vol. 8, no. 1, pp. 27–36, 1998, doi: 10.3109/bf03041306.
- [16] L. Altomonte, A. Zoli, L. Mirone, P. Scolieri, and M. Magaró, "Serum levels of interleukin-1b, tumour necrosis factor-a and interleukin-2 in rheumatoid arthritis. Correlation with disease

- activity," *Clin. Rheumatol.*, vol. 11, no. 2, pp. 202–205, 1992, doi: 10.1007/BF02207957.
- [17] A. Laria, A. Lurati, M. Marrazza, D. Mazzocchi, K. A. Re, and M. Scarpellini, "The macrophages in rheumatic diseases," *Journal of Inflammation Research*, vol. 9. Dove Press, pp. 1–11, Feb. 09, 2016, doi: 10.2147/JIR.S82320.
- [18] M. C. Lebre and P. P. Tak, "Macrophage Subsets in Immune-Mediated Inflammatory Disease: Lessons from Rheumatoid Arthritis, Spondyloarthritis, Osteoarthritis, Behcet's Disease and Gout," *Open Arthritis J.*, vol. 3, no. 2, pp. 18–23, 2010, doi: 10.2174/1876539401003020018.
- [19] X. Yang, Y. Chang, and W. Wei, "Emerging role of targeting macrophages in rheumatoid arthritis: Focus on polarization, metabolism and apoptosis," *Cell Proliferation*, vol. 53, no. 7. 2020, doi: 10.1111/cpr.12854.
- [20] R. Brinks, R. Fischer-Betz, O. Sander, J. G. Richter, G. Chehab, and M. Schneider, "Age-specific prevalence of diagnosed systemic lupus erythematosus in Germany 2002 and projection to 2030," *Lupus*, vol. 23, no. 13, pp. 1407–1411, 2014, doi: 10.1177/0961203314540352.
- [21] S. Bernatsky *et al.*, "Mortality in systemic lupus erythematosus," *Arthritis Rheum.*, vol. 54, no. 8, pp. 2550–2557, 2006, doi: 10.1002/art.21955.
- [22] C. E. Fors Nieves and P. M. Izmirly, "Mortality in Systemic Lupus Erythematosus: an Updated Review," *Current Rheumatology Reports*, vol. 18, no. 4. 2016, doi: 10.1007/s11926-016-0571-2.
- [23] C. B. McCowan, "Systemic lupus erythematosus.," *Journal of the American Academy of Nurse Practitioners*, vol. 10, no. 5. pp. 225–231, 1998, doi: 10.1111/j.1745-7599.1998.tb01255.x.
- [24] A. Jönsen, A. Bengtsson, O. Nived, L. Truedsson, and G. Sturfelt, "Gene-environment interactions in the aetiology of systemic lupus erythematosus," *Autoimmunity*, vol. 40, no. 8, pp. 613–617, 2007, doi: 10.1080/08916930701511051.
- [25] L. Pan, M. P. Lu, J. H. Wang, M. Xu, and S. R. Yang, "Immunological pathogenesis and treatment of systemic lupus erythematosus," *World J. Pediatr.*, vol. 16, no. 1, pp. 19–30, 2020, doi: 10.1007/s12519-019-00229-3.
- [26] C. G. Katsiari, S. N. C. Liossis, and P. P. Sfikakis, "The pathophysiologic role of monocytes and macrophages in systemic lupus erythematosus: A reappraisal," *Semin. Arthritis Rheum.*, vol. 39, no. 6, pp. 491–503, 2010, doi: 10.1016/j.semarthrit.2008.11.002.
- [27] L. Colonna, C. Lood, and K. B. Elkon, "Beyond apoptosis in lupus," *Curr. Opin. Rheumatol.*, vol. 26, no. 5, pp. 459–466, 2014, doi: 10.1097/BOR.0000000000000083.
- [28] J. Pravda, "Systemic Lupus Erythematosus: Pathogenesis at the Functional Limit of Redox Homeostasis," *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, vol. 2019. 2019, doi: 10.1155/2019/1651724.
- [29] C. Gordon and M. Salmon, "Systemic Lupus Erythematosus/Series Editors: D The role of apoptosis in systemic lupus erythematosus," 1999.
- [30] K. N. Lai and D. Y. H. Yap, "Cytokines and their roles in the pathogenesis of systemic lupus erythematosus: From basics to recent advances," *J. Biomed. Biotechnol.*, vol. 2010, no. May, 2010, doi: 10.1155/2010/365083.
- [31] M. Linker-Israeli *et al.*, "Elevated levels of endogenous IL-6 in systemic lupus erythematosus . A putative role in in Pathogenesis," *J. Immunol.*, vol. 147, pp. 117–123, 1991.
- [32] F. A. Houssiau, M. Vanden Berghe, J. P. Devogelaer, C. Lefebvre, M. Lambert, and J. C. Renaud, "Serum interleukin 10 titers in systemic lupus erythematosus reflect disease activity," *Lupus*, vol. 4, no. 5, pp. 393–395, 1995, doi: 10.1177/096120339500400510.
- [33] L. A. Mandl, "Osteoarthritis year in review 2018: clinical," *Osteoarthr. Cartil.*, vol. 27, no. 3, pp. 359–364, 2019, doi: 10.1016/j.joca.2018.11.001.
- [34] Y. He *et al.*, "Pathogenesis of osteoarthritis: Risk factors, regulatory pathways in

- chondrocytes, and experimental models,” *Biology*, vol. 9, no. 8. pp. 1–32, 2020, doi: 10.3390/biology9080194.
- [35] M. B. Goldring and S. R. Goldring, “Osteoarthritis,” *Journal of Cellular Physiology*, vol. 213, no. 3. pp. 626–634, 2007, doi: 10.1002/jcp.21258.
- [36] D. Chen *et al.*, “Osteoarthritis: Toward a comprehensive understanding of pathological mechanism,” *Bone Research*, vol. 5. 2017, doi: 10.1038/boneres.2016.44.
- [37] H. Wang, J. Bai, B. He, X. Hu, and D. Liu, “Osteoarthritis and the risk of cardiovascular disease: a meta-analysis of observational studies OPEN,” 2016, doi: 10.1038/srep39672.
- [38] G. S. Fernandes and A. M. Valdes, “Cardiovascular disease and osteoarthritis: common pathways and patient outcomes,” doi: 10.1111/eci.12413.
- [39] S. Gordon and P. R. Taylor, “Monocyte and macrophage heterogeneity,” *Nat. Rev. Immunol.*, vol. 5, no. 12, pp. 953–964, 2005, doi: 10.1038/nri1733.
- [40] K. M. Lee, C. Yin, C. P. Verschoor, and D. M. Bowdish, “Macrophage Function Disorders,” *eLS*, 2013, doi: 10.1002/9780470015902.a0002174.pub3.
- [41] P. W. Whitworth, C. C. Pak, J. Esgro, E. S. Kleinerman, and I. J. Fidler, “Macrophages and cancer,” 1989. [Online]. Available: <https://link.springer.com/content/pdf/10.1007%2FBF00052607.pdf>.
- [42] T. A. Wynn, A. Chawla, and J. W. Pollard, “Macrophage biology in development, homeostasis and disease,” *Nature*, vol. 496, no. 7446. pp. 445–455, 2013, doi: 10.1038/nature12034.
- [43] F. Ginhoux, J. L. Schultze, P. J. Murray, J. Ochando, and S. K. Biswas, “New insights into the multidimensional concept of macrophage ontogeny, activation and function,” *Nature Immunology*, vol. 17, no. 1. pp. 34–40, 2016, doi: 10.1038/ni.3324.
- [44] R. D. Stout, C. Jiang, B. Matta, I. Tietzel, S. K. Watkins, and J. Suttles, “Macrophages Sequentially Change Their Functional Phenotype in Response to Changes in Microenvironmental Influences,” *J. Immunol.*, vol. 175, no. 1, pp. 342–349, 2005, doi: 10.4049/jimmunol.175.1.342.
- [45] R. D. Stout and J. Suttles, “Functional plasticity of macrophages: reversible adaptation to changing microenvironments,” *J. Leukoc. Biol.*, vol. 76, no. 3, pp. 509–513, 2004, doi: 10.1189/jlb.0504272.
- [46] C. D. Gregory, “CD14-dependent clearance of apoptotic cells: Relevance to the immune system,” *Curr. Opin. Immunol.*, vol. 12, no. 1, pp. 27–34, 2000, doi: 10.1016/S0952-7915(99)00047-3.
- [47] J. Yang, L. Zhang, C. Yu, X. F. Yang, and H. Wang, “Monocyte and macrophage differentiation: Circulation inflammatory monocyte as biomarker for inflammatory diseases,” *Biomark. Res.*, vol. 2, no. 1, pp. 1–9, 2014, doi: 10.1186/2050-7771-2-1.
- [48] P. Italiani and D. Boraschi, “From monocytes to M1/M2 macrophages: Phenotypical vs. functional differentiation,” *Frontiers in Immunology*, vol. 5, no. OCT. 2014, doi: 10.3389/fimmu.2014.00514.
- [49] D. C. Lacey *et al.*, “Defining GM-CSF– and Macrophage-CSF–Dependent Macrophage Responses by In Vitro Models,” *J. Immunol.*, vol. 188, no. 11, pp. 5752–5765, 2012, doi: 10.4049/jimmunol.1103426.
- [50] A. Mantovani, S. Sozzani, M. Locati, P. Allavena, and A. Sica, “Macrophage polarization: Tumor-associated macrophages as a paradigm for polarized M2 mononuclear phagocytes,” *Trends in Immunology*, vol. 23, no. 11. pp. 549–555, 2002, doi: 10.1016/S1471-4906(02)02302-5.
- [51] A. Sica and A. Mantovani, “Macrophage plasticity and polarization: In vivo veritas,” *Journal of Clinical Investigation*, vol. 122, no. 3. pp. 787–795, 2012, doi: 10.1172/JCI59643.
- [52] M. H. M. Barros, F. Hauck, J. H. Dreyer, B. Kempkes, and G. Niedobitek, “Macrophage polarisation: An immunohistochemical approach for identifying M1 and M2 macrophages,”

PLoS One, vol. 8, no. 11, 2013, doi: 10.1371/journal.pone.0080908.

- [53] S. K. Biswas and A. Mantovani, "Macrophage plasticity and interaction with lymphocyte subsets: Cancer as a paradigm," *Nature Immunology*, vol. 11, no. 10, pp. 889–896, 2010, doi: 10.1038/ni.1937.
- [54] A. Mantovani, A. Sica, S. Sozzani, P. Allavena, A. Vecchi, and M. Locati, "The chemokine system in diverse forms of macrophage activation and polarization," *Trends in Immunology*, vol. 25, no. 12, pp. 677–686, 2004, doi: 10.1016/j.it.2004.09.015.
- [55] F. O. Martinez, S. Gordon, M. Locati, and A. Mantovani, "Transcriptional Profiling of the Human Monocyte-to-Macrophage Differentiation and Polarization: New Molecules and Patterns of Gene Expression," *J. Immunol.*, vol. 177, no. 10, pp. 7303–7311, Nov. 2006, doi: 10.4049/jimmunol.177.10.7303.
- [56] M. Genin, F. Clement, A. Fattaccioli, M. Raes, and C. Michiels, "M1 and M2 macrophages derived from THP-1 cells differentially modulate the response of cancer cells to etoposide," *BMC Cancer*, vol. 15, no. 1, pp. 1–14, 2015, doi: 10.1186/s12885-015-1546-9.
- [57] N. B. Hao, M. H. Lü, Y. H. Fan, Y. L. Cao, Z. R. Zhang, and S. M. Yang, "Macrophages in tumor microenvironments and the progression of tumors," *Clin. Dev. Immunol.*, vol. 2012, no. June 2012, 2012, doi: 10.1155/2012/948098.
- [58] F. O. Martinez, A. Sica, A. Mantovani, and M. Locati, "Macrophage activation and polarization," *Frontiers in Bioscience*, vol. 13, no. 2, pp. 453–461, 2008, doi: 10.2741/2692.
- [59] G. Zizzo, B. A. Hilliard, M. Monestier, and P. L. Cohen, "Efficient Clearance of Early Apoptotic Cells by Human Macrophages Requires M2c Polarization and MerTK Induction," *J. Immunol.*, vol. 189, no. 7, pp. 3508–3520, 2012, doi: 10.4049/jimmunol.1200662.
- [60] B. Trojanowicz, C. Ulrich, E. Seibert, R. Fiedler, and M. Girndt, "Uremic conditions drive human monocytes to pro-atherogenic differentiation via an angiotensin-dependent mechanism.," *PLoS One*, vol. 9, no. 7, p. e102137, 2014, doi: 10.1371/journal.pone.0102137.
- [61] I. Tabas and K. E. Bornfeldt, "Macrophage Phenotype and Function in Different Stages of Atherosclerosis," *Circ. Res.*, vol. 118, no. 4, pp. 653–667, 2016, doi: 10.1161/CIRCRESAHA.115.306256.
- [62] M. Gong, X. Zhuo, and A. Ma, "STAT6 Upregulation Promotes M2 Macrophage Polarization to Suppress Atherosclerosis," *Med. Sci. Monit. Basic Res.*, vol. 23, pp. 240–249, 2017, doi: 10.12659/msmbr.904014.
- [63] K. Ley, Y. I. Miller, and C. C. Hedrick, "Monocyte and macrophage dynamics during atherogenesis.," *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.*, vol. 31, no. 7, pp. 1506–16, Jul. 2011, doi: 10.1161/ATVBAHA.110.221127.
- [64] Y. Kojima, I. L. Weissman, and N. J. Leeper, "The Role of Efferocytosis in Atherosclerosis," *Circulation*, vol. 135, no. 5, pp. 476–489, 2017, doi: 10.1161/CIRCULATIONAHA.116.025684.
- [65] D. Korn, S. C. Frasch, R. Fernandez-Boyanapalli, P. M. Henson, and D. L. Bratton, "Modulation of macrophage efferocytosis in inflammation," *Front. Immunol.*, vol. 2, no. NOV, 2011, doi: 10.3389/fimmu.2011.00057.
- [66] N. Leitinger and I. G. Schulman, "Phenotypic polarization of macrophages in atherosclerosis," *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.*, vol. 33, no. 6, pp. 1120–1126, 2013, doi: 10.1161/ATVBAHA.112.300173.
- [67] G. Chinetti-Gbaguidi *et al.*, "Human atherosclerotic plaque alternative macrophages display low cholesterol handling but high phagocytosis because of distinct activities of the PPAR γ and LXR α pathways," *Circ. Res.*, vol. 108, no. 8, pp. 985–995, 2011, doi: 10.1161/CIRCRESAHA.110.233775.
- [68] H. Xu, J. Jiang, W. Chen, W. Li, Z. Chen, and H. Medbury, "Vascular Macrophages in Atherosclerosis," *Journal of Immunology Research*, vol. 2019, 2019, doi: 10.1155/2019/4354786.

- [69] J. Khallou-Laschet *et al.*, "Macrophage plasticity in experimental atherosclerosis," *PLoS One*, vol. 5, no. 1, p. 8852, 2010, doi: 10.1371/journal.pone.0008852.
- [70] S. L. Kelley, T. Lukk, S. K. Nair, and R. I. Tapping, "The Crystal Structure of Human Soluble CD14 Reveals a Bent Solenoid with a Hydrophobic Amino-Terminal Pocket," *J. Immunol.*, vol. 190, no. 3, pp. 1304–1311, 2013, doi: 10.4049/jimmunol.1202446.
- [71] S. D. Wright *et al.*, "CD14 , a Receptor for Complexes of Lipopolysaccharide (LPS) and LPS Binding Protein Published by : American Association for the Advancement of Science Stable URL : <http://www.jstor.org/stable/2878193> JSTOR is a not-for-profit service that helps scholars," *Science (80-)*, vol. 249, no. 4975, pp. 1431–1433, 1990.
- [72] A. Devitt *et al.*, "Persistence of apoptotic cells without autoimmune disease or inflammation in CD 14-/- mice," *J. Cell Biol.*, vol. 167, no. 6, pp. 1161–1170, 2004, doi: 10.1083/jcb.200410057.
- [73] A. Devitt, S. Pierce, C. Oldreive, W. H. Shingler, and C. D. Gregory, "CD14-dependent clearance of apoptotic cells by human macrophages: The role of phosphatidylserine," *Cell Death and Differentiation*, vol. 10, no. 3. pp. 371–382, 2003, doi: 10.1038/sj.cdd.4401168.
- [74] Y. Zhang *et al.*, "Crystal structure of the extracellular domain of a human FcγRIII," *Immunity*, vol. 13, no. 3, pp. 387–395, 2000, doi: 10.1016/S1074-7613(00)00038-8.
- [75] R. Stewart, S. A. Hammond, M. Oberst, and R. W. Wilkinson, "The role of Fc gamma receptors in the activity of immunomodulatory antibodies for cancer," *J. Immunother. Cancer*, vol. 2, no. 1, pp. 1–10, 2014, doi: 10.1186/s40425-014-0029-x.
- [76] W. Hseun Yeap *et al.*, "CD16 is indispensable for antibody-dependent cellular cytotoxicity by human monocytes OPEN," *Nat. Publ. Gr.*, 2016, doi: 10.1038/srep34310.
- [77] D. J. Lenschow *et al.*, "Expression and functional significance of an additional ligand for CTLA-4," 1993.
- [78] L. Dyck and K. H. G. Mills, "Immune checkpoints and their inhibition in cancer and infectious diseases," *Eur. J. Immunol.*, vol. 47, pp. 765–779, 2017, doi: 10.1002/eji.201646875.
- [79] A. J. Coyle and J. C. Gutierrez-Ramos, "The expanding B7 superfamily: Increasing complexity in costimulatory signals regulating T cell function," *Nature Immunology*, vol. 2, no. 3. pp. 203–209, 2001, doi: 10.1038/85251.
- [80] M. A. Ruffner, H. K. Seon, N. R. Bianco, L. M. Francisco, A. H. Sharpe, and P. D. Robbins, "B7-1/2, but not PD-L1/2 molecules, are required on IL-10-treated tolerogenic DC and DC-derived exosomes for in vivo function," *Eur. J. Immunol.*, vol. 39, no. 11, pp. 3084–3090, 2009, doi: 10.1002/eji.200939407.
- [81] M. E. Keir and A. H. Sharpe, "The B7/CD28 costimulatory family in autoimmunity," *Immunol. Rev.*, vol. 204, pp. 128–143, 2005, doi: 10.1111/j.0105-2896.2005.00242.x.
- [82] J. H. Graversen, M. Madsen, and S. K. Moestrup, "CD163: a signal receptor scavenging haptoglobin-hemoglobin complexes from plasma," 2002.
- [83] B. O. Fabriek *et al.*, "The macrophage scavenger receptor CD163 functions as an innate immune sensor for bacteria," *Blood*, vol. 113, no. 4, pp. 887–892, 2009, doi: 10.1182/blood-2008-07-167064.
- [84] H. Van Gorp, P. L. Delputte, and H. J. Nauwynck, "Scavenger receptor CD163, a Jack-of-all-trades and potential target for cell-directed therapy," *Mol. Immunol.*, vol. 47, pp. 1650–1660, 2010, doi: 10.1016/j.molimm.2010.02.008.
- [85] L. Martinez-Pomares, "The mannose receptor," *J. Leukoc. Biol.*, vol. 92, no. 6, pp. 1177–1186, 2012, doi: 10.1189/jlb.0512231.
- [86] T. Kazuo *et al.*, "Macrophage Mannose Receptor CD206 Predicts Prognosis in Community-acquired Pneumonia," *Sci. Rep.*, vol. 9, no. 1, 2019, doi: 10.1038/s41598-019-55289-2.
- [87] T. B. H Geijtenbeek and S. I. Gringhuis, "Dendritic cells (DCs) are located throughout the body to capture and internalize invading pathogens, and subsequently process and present

- antigen on MHC class I and class II molecules to CD8 + and CD4 +," *Nat. Publ. Gr.*, 2009, doi: 10.1038/nri2569.
- [88] A. K. Azad, M. V. S. Rajaram, and L. S. Schlesinger, "Exploitation of the Macrophage Mannose Receptor (CD206) in Infectious Disease Diagnostics and Therapeutics.," *J. Cytol. Mol. Biol.*, vol. 1, no. 1, pp. 1–5, 2014, doi: 10.13188/2325-4653.1000003.
- [89] T. Hussell and T. J. Bell, "Alveolar macrophages: Plasticity in a tissue-specific context," *Nat. Rev. Immunol.*, vol. 14, no. 2, pp. 81–93, 2014, doi: 10.1038/nri3600.
- [90] J. Scheller, A. Chalaris, D. Schmidt-Arras, and S. Rose-John, "The pro- and anti-inflammatory properties of the cytokine interleukin-6," *Biochim. Biophys. Acta - Mol. Cell Res.*, vol. 1813, no. 5, pp. 878–888, 2011, doi: 10.1016/j.bbamcr.2011.01.034.
- [91] S. Naseem, R. Iqbal, and T. Munir, "Role of Interleukin-6 in Immunity : a Review," *Int. J. Life Sci. Res.*, vol. 4, no. 2, pp. 268–274, 2016.
- [92] C. Gabay, "Interleukin-6 and chronic inflammation," *Arthritis Res. Ther.*, vol. 8, no. SUPPL. 2, pp. 1–6, 2006, doi: 10.1186/ar1917.
- [93] E. Choy and S. Rose-John, "Interleukin-6 as a multifunctional regulator: Inflammation, immune response, and fibrosis," *Journal of Scleroderma and Related Disorders*, vol. 2, pp. S1–S5, 2017, doi: 10.5301/jsrd.5000265.
- [94] I. A. Clark, "How TNF was recognized as a key mechanism of disease," *Cytokine Growth Factor Rev.*, vol. 18, no. 3–4, pp. 335–343, 2007, doi: 10.1016/j.cytogfr.2007.04.002.
- [95] J. R. Bradley, "TNF-mediated inflammatory disease," *Journal of Pathology*, vol. 214, no. 2, pp. 149–160, 2008, doi: 10.1002/path.2287.
- [96] T. Calzascia *et al.*, "TNF- α is critical for antitumor but not antiviral T cell immunity in mice," *J. Clin. Invest.*, vol. 117, no. 12, pp. 3833–3845, 2007, doi: 10.1172/JCI32567.
- [97] H. T. Idriss and J. H. Naismith, "TNF α and the TNF receptor superfamily: Structure-function relationship(s)," *Microsc. Res. Tech.*, vol. 50, no. 3, pp. 184–195, 2000, doi: 10.1002/1097-0029(20000801)50:3<184::AID-JEMT2>3.0.CO;2-H.
- [98] M. H. Mannino, Z. Zhu, H. Xiao, Q. Bai, M. R. Wakefield, and Y. Fang, "The paradoxical role of IL-10 in immunity and cancer," *Cancer Lett.*, vol. 367, no. 2, pp. 103–107, 2015, doi: 10.1016/j.canlet.2015.07.009.
- [99] K. N. Couper, D. G. Blount, and E. M. Riley, "IL-10: The Master Regulator of Immunity to Infection," *J. Immunol.*, vol. 180, no. 9, pp. 5771–5777, 2008, doi: 10.4049/jimmunol.180.9.5771.
- [100] W. Ouyang and A. O'Garra, "IL-10 Family Cytokines IL-10 and IL-22: from Basic Science to Clinical Translation," *Immunity*, vol. 50, no. 4, pp. 871–891, 2019, doi: 10.1016/j.immuni.2019.03.020.
- [101] S. Sanjabi, L. A. Zenewicz, M. Kamanaka, and R. A. Flavell, "Anti-and Pro-inflammatory Roles of TGF- β , IL-10, and IL-22 In Immunity and Autoimmunity," *Curr Opin Pharmacol*, vol. 9, no. 4, pp. 447–453, 2009, doi: 10.1016/j.coph.2009.04.008.
- [102] A. Bakiri and E. Mingomata, "Novel Insights on Interleukin-10 Functions: A Manipulative Tool for the Deviation of Immune Response and Disease Outcome - European Medical Journal," *EMJ Allergy Immunol*, vol. 4, no. 1, pp. 88–94, 2019, [Online]. Available: <https://www.emjreviews.com/allergy-immunology/article/novel-insights-on-interleukin-10-functions-a-manipulative-tool-for-the-deviation-of-immune-response-and-disease-outcome/>.
- [103] J. Massagué, "TGF β signalling in context," *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, vol. 13, no. 10, pp. 616–630, 2012, doi: 10.1038/nrm3434.
- [104] M. A. Travis and D. Sheppard, "TGF- β activation and function in immunity," *Annual Review of Immunology*, vol. 32, pp. 51–82, 2014, doi: 10.1146/annurev-immunol-032713-120257.
- [105] A. W. Taylor, "Review of the activation of TGF- in immunity," *J. Leukoc. Biol.*, vol. 85, no. 1, pp. 29–33, 2008, doi: 10.1189/jlb.0708415.

- [106] G. S. Ashcroft, "Bidirectional regulation of macrophage function by TGF- β ," *Microbes Infect.*, vol. 1, no. 15, pp. 1275–1282, Dec. 1999, doi: 10.1016/S1286-4579(99)00257-9.
- [107] F. Liu *et al.*, "MSC-secreted TGF- β regulates lipopolysaccharide-stimulated macrophage M2-like polarization via the Akt/FoxO1 pathway," doi: 10.1186/s13287-019-1447-y.
- [108] M. Sanjadi, Z. Rezvanie Sichanie, H. Totonchi, J. Karami, R. Rezaei, and S. Aslani, "Atherosclerosis and autoimmunity: a growing relationship," *International Journal of Rheumatic Diseases*, vol. 21, no. 5. John Wiley & Sons, Ltd (10.1111), pp. 908–921, May 01, 2018, doi: 10.1111/1756-185X.13309.
- [109] Joseph Hauptman, "Heat Inactivation — Are You Wasting Your Time?," *Art To Sci.*, vol. 15, no. 1, pp. 1–4, 2009.
- [110] P. CHEVALLIER, "Progress in hematology.," *Presse Med.*, vol. 62, no. 15, pp. 334–336, 1954.
- [111] P. J. Murray, "Macrophage Polarization," *Annu. Rev. Physiol. is online*, vol. 79, pp. 541–66, 2017, doi: 10.1146/annurev-physiol-022516-034339.
- [112] E. R. Stanley *et al.*, "Biology and action of colony-stimulating factor-1," *Mol. Reprod. Dev.*, vol. 46, no. 1, pp. 4–10, 1997, doi: 10.1002/(SICI)1098-2795(199701)46:1<4::AID-MRD2>3.0.CO;2-V.
- [113] W. Safi, A. Kuehnl, A. Nüssler, H. H. Eckstein, and J. Pelisek, "Differentiation of human CD14+ monocytes: an experimental investigation of the optimal culture medium and evidence of a lack of differentiation along the endothelial line," *Exp. Mol. Med.*, vol. 48, p. e227, 2016, doi: 10.1038/emm.2016.11.
- [114] C. Ma, Y. Xia, Q. Yang, and Y. Zhao, "The contribution of macrophages to systemic lupus erythematosus," *Clin. Immunol.*, vol. 207, no. June, pp. 1–9, 2019, doi: 10.1016/j.clim.2019.06.009.
- [115] C. Klint, L. Truedsson, A. Andreasson, I. Johansson, and G. Sturfelt, "Toxic effects of SLE serum on normal monocytes in vitro: cell death induced by apoptosis related to complement dysfunction." [Online]. Available: www.nature.com/lup.
- [116] A. A. Bengtsson, G. Sturfelt, B. Gullstrand, and L. Truedsson, "Induction of apoptosis in monocytes and lymphocytes by serum from patients with systemic lupus erythematosus - An additional mechanism to increased autoantigen load?," *Clin. Exp. Immunol.*, vol. 135, no. 3, pp. 535–543, 2004, doi: 10.1111/j.1365-2249.2003.02386.x.
- [117] A. A. Bengtsson, B. Gullstrand, L. Truedsson, and G. Sturfelt, "SLE serum induces classical caspase-dependent apoptosis independent of death receptors," *Clin. Immunol.*, vol. 126, no. 1, pp. 57–66, Jan. 2008, doi: 10.1016/J.CLIM.2007.10.003.
- [118] C. A. Ambarus *et al.*, "Systematic validation of specific phenotypic markers for in vitro polarized human macrophages," *J. Immunol. Methods*, vol. 375, no. 1–2, pp. 196–206, 2012, doi: 10.1016/j.jim.2011.10.013.
- [119] A. Mantovani, A. Sica, and M. Locati, "Macrophage polarization comes of age," *Immunity*, vol. 23, no. 4, pp. 344–346, 2005, doi: 10.1016/j.immuni.2005.10.001.
- [120] T. Bartosh and J. Ylostalo, "Macrophage Inflammatory Assay," *BIO-PROTOCOL*, vol. 4, no. 14, 2014, doi: 10.21769/bioprotoc.1180.
- [121] D. Y. S. Vogel *et al.*, "Macrophages migrate in an activation-dependent manner to chemokines involved in neuroinflammation," *J. Neuroinflammation*, 2014, doi: 10.1186/1742-2094-11-23.
- [122] Y. Yue *et al.*, "M2b macrophages reduce early reperfusion injury after myocardial ischemia in mice: A predominant role of inhibiting apoptosis via A20," *Int. J. Cardiol.*, vol. 245, pp. 228–235, 2017, doi: 10.1016/j.ijcard.2017.07.085.
- [123] S. Mia, A. Warnecke, X. M. Zhang, V. Malmström, and R. A. Harris, "An optimized protocol for human M2 macrophages using M-CSF and IL-4/IL-10/TGF- β yields a dominant immunosuppressive phenotype," *Scand. J. Immunol.*, vol. 79, no. 5, pp. 305–314, 2014, doi:

10.1111/sji.12162.

- [124] Y. Yokozeki *et al.*, "Reduced TGF- β Expression and CD206-Positive Resident Macrophages in the Intervertebral Discs of Aged Mice," 2021, doi: 10.1155/2021/7988320.
- [125] F. Porcheray *et al.*, "Clinical and Experimental Immunology Macrophage activation switching: an asset for the resolution of inflammation," *Clin. Exp. Immunol.*, vol. 142, pp. 481–489, 2005, doi: 10.1111/j.1365-2249.2005.02934.x.
- [126] C. Moreno, P. Prieto, Á. Macías, A. De Cruz, and P. G. Través, "Identification of the Integral Membrane Protein RM3/1 on Human Monocytes as a Glucocorticoid-Inducible Member of the Scavenger Receptor Cysteine-Rich Family (CD163)," 2016.
- [127] B. D. Korman *et al.*, "Inflammatory expression profiles in monocyte-to- macrophage differentiation in patients with systemic lupus erythematosus and relationship with atherosclerosis," vol. 16, no. 4, pp. 1–12, 2014, doi: 10.1186/ar4609.
- [128] L. Benso, "Differential Function of in Vitro Generated Macrophages From Systemic Lupus Erythematosus and Non-Diseased Peripheral Blood Mononuclear Cells," 2018.
- [129] C. A. Ambarus, T. Noordenbos, M. J. H. de Hair, P. P. Tak, and D. L. P. Baeten, "Intimal lining layer macrophages but not synovial sublining macrophages display an IL-10 polarized-like phenotype in chronic synovitis," *Arthritis Res. Ther.*, vol. 14, no. 2, p. R74, 2012, doi: 10.1186/ar3796.
- [130] C. D. Gregory and A. Devitt, "CD14 and apoptosis," *Apoptosis*, vol. 4, no. 1, pp. 11–20, 1999, doi: 10.1023/A:1009673914340.
- [131] Y. Li, • Pui, Y. Lee, W. H. Reeves, and Ó. L. Hirszfeld, "Monocyte and Macrophage Abnormalities in Systemic Lupus Erythematosus," doi: 10.1007/s00005-010-0093-y.
- [132] N. G. Arvidson *et al.*, "Circadian rhythm of serum interleukin-6 in rheumatoid arthritis," *Ann. Rheum. Dis.*, vol. 53, pp. 521–524, 1994, doi: 10.1136/ard.53.8.521.
- [133] H. O. Kim, H. S. Kim, J. C. Youn, E. C. Shin, and S. Park, "Serum cytokine profiles in healthy young and elderly population assessed using multiplexed bead-based immunoassays," *J. Transl. Med.*, vol. 9, no. 1, pp. 1–7, 2011, doi: 10.1186/1479-5876-9-113.
- [134] A. Studnicka-Benke, G. Steiner, P. Petera, and J. S. Smolen, "Tumour necrosis factor alpha and its soluble receptors parallel clinical disease and autoimmune activity in systemic lupus erythematosus," *Br. J. Rheumatol.*, vol. 35, no. 11, pp. 1067–1074, 1996, doi: 10.1093/rheumatology/35.11.1067.
- [135] H. Y. Chun *et al.*, "Cytokine IL-6 and IL-10 as biomarkers in systemic lupus erythematosus," *J. Clin. Immunol.*, vol. 27, no. 5, pp. 461–466, 2007, doi: 10.1007/s10875-007-9104-0.
- [136] D. J. Grainger, D. E. Mosedale, and J. C. Metcalfe, "TGF-b in blood: a complex problem," 2000. [Online]. Available: www.elsevier.com/locate/cytogfr.
- [137] S. Simpson, J. Kaislasuo, S. Guller, and L. Pal, "Thermal stability of cytokines: A review," *Cytokine*, vol. 125, no. August 2019, 2020, doi: 10.1016/j.cyto.2019.154829.
- [138] P. J. Murray *et al.*, "Macrophage activation and polarization: nomenclature and experimental guidelines," *Immunity*, vol. 41, no. 1, pp. 14–20, 2014, doi: 10.1016/j.immuni.2014.06.008.
- [139] P. J. Murray and T. A. Wynn, "Obstacles and opportunities for understanding macrophage polarization," *J. Leukoc. Biol.*, vol. 89, pp. 557–563, 2011, doi: 10.1189/jlb.0710409.
- [140] F. O. Martinez and S. Gordon, "The M1 and M2 paradigm of macrophage activation: Time for reassessment," *F1000Prime Rep.*, vol. 6, Mar. 2014, doi: 10.12703/P6-13.
- [141] L. xun Wang, S. xi Zhang, H. juan Wu, X. lu Rong, and J. Guo, "M2b macrophage polarization and its roles in diseases," *Journal of Leukocyte Biology*, vol. 106, no. 2. pp. 345–358, 2019, doi: 10.1002/JLB.3RU1018-378RR.
- [142] S. Iqbal and A. Kumar, "Characterization of In vitro Generated Human Polarized Macrophages," *J. Clin. Cell. Immunol.*, vol. 06, no. 06, 2015, doi: 10.4172/2155-

9899.1000380.

- [143] C. Atri, F. Z. Guerfali, and D. Laouini, "Role of human macrophage polarization in inflammation during infectious diseases," *International Journal of Molecular Sciences*, vol. 19, no. 6, 2018, doi: 10.3390/ijms19061801.
- [144] K. Essandoh, Y. Li, J. Huo, and G. C. Fan, "MiRNA-mediated macrophage polarization and its potential role in the regulation of inflammatory response," *Shock*, vol. 46, no. 2, pp. 122–131, 2016, doi: 10.1097/SHK.0000000000000604.
- [145] J. Xue *et al.*, "Transcriptome-Based Network Analysis Reveals a Spectrum Model of Human Macrophage Activation," *Immunity*, vol. 40, no. 2, pp. 274–288, Feb. 2014, doi: 10.1016/j.immuni.2014.01.006.
- [146] S. Eligini *et al.*, "Human monocyte-derived macrophages spontaneously differentiated in vitro show distinct phenotypes," *J. Cell. Physiol.*, vol. 228, no. 7, pp. 1464–1472, 2013, doi: 10.1002/jcp.24301.
- [147] V. Frodermann *et al.*, "Heat-Killed staphylococcus aureus reduces atherosclerosis by inducing anti-inflammatory macrophages," *J. Intern. Med.*, vol. 279, no. 6, pp. 592–605, 2016, doi: 10.1111/joim.12484.
- [148] J. L. Stöger *et al.*, "Distribution of macrophage polarization markers in human atherosclerosis," *Atherosclerosis*, vol. 225, no. 2, pp. 461–468, 2012, doi: 10.1016/j.atherosclerosis.2012.09.013.
- [149] E. Bengtsson *et al.*, "CD163+ macrophages are associated with a vulnerable plaque phenotype in human carotid plaques," *Sci. Rep.*, vol. 10, no. 1, p. 14362, 2020, doi: 10.1038/s41598-020-71110-x.
- [150] C. Gutiérrez-Muñoz *et al.*, "CD163 deficiency increases foam cell formation and plaque progression in atherosclerotic mice," *FASEB J.*, vol. 34, no. 11, pp. 14960–14976, 2020, doi: 10.1096/fj.202000177R.
- [151] B. Pourcet and B. Staels, "Alternative macrophages in atherosclerosis: Not always protective!," *Journal of Clinical Investigation*, vol. 128, no. 3, pp. 910–912, 2018, doi: 10.1172/JCI120123.
- [152] L. Guo *et al.*, "CD163+ macrophages promote angiogenesis and vascular permeability accompanied by inflammation in atherosclerosis," *J. Clin. Invest.*, vol. 128, no. 3, pp. 1106–1124, 2018, doi: 10.1172/JCI93025.
- [153] K. J. Moore, F. J. Sheedy, and E. A. Fisher, "Macrophages in atherosclerosis: A dynamic balance," *Nat. Rev. Immunol.*, vol. 13, no. 10, pp. 709–721, 2013, doi: 10.1038/nri3520.
- [154] H. Yang and S. C. Chen, "The effect of interleukin-10 on apoptosis in macrophages stimulated by oxLDL," *Eur. J. Pharmacol.*, vol. 657, no. 1–3, pp. 126–130, 2011, doi: 10.1016/j.ejphar.2011.01.049.
- [155] P. J. Murray and T. A. Wynn, "Protective and pathogenic functions of macrophage subsets," *Nat. Rev. Immunol.*, 2011, doi: 10.1038/nri3073.
- [156] G. F. P. Bories and N. Leitinger, "Macrophage metabolism in atherosclerosis," *FEBS Letters*, vol. 591, no. 19, pp. 3042–3060, 2017, doi: 10.1002/1873-3468.12786.
- [157] L. Honold and M. Nahrendorf, "Resident and Monocyte-Derived Macrophages in Cardiovascular Disease," *Circulation Research*, vol. 122, no. 1, pp. 113–127, 2018, doi: 10.1161/CIRCRESAHA.117.311071.

6 Anhang

6.1 Abbildungsverzeichnis

Abb. 1: Übersicht M1 und M2 a, b, c	6
Abb. 2: Versuchsaufbau Makrophagendifferenzierung.....	14
Abb. 3: Versuchsaufbau Zytokinstimulation M1/M2.....	18
Abb. 4: Gatingstrategie nach FSC und PI	22
Abb. 5: Makrophagenanteil nach Zytokin- und Serumstimulation.....	28
Abb. 6: Makrophagenanteil bei 20 % Serum	29
Abb. 7: Makrophagenanteil bei 40 % Serum	30
Abb. 8: Expression CD206 für M1 und M2	31
Abb. 9: Expression CD86 für M1 und M2	32
Abb. 10: Expression CD163 für M1 und M2	33
Abb. 11: Expression CD14 für M1 und M2	34
Abb. 12: Expression CD16 für M1 und M2	35
Abb. 13: Expression CD206 unter Serumstimulation	37
Abb. 14: Expression CD86 unter Serumstimulation	38
Abb. 15: Expression CD163 unter Serumstimulation	39
Abb. 16: Expression CD14 unter Serumstimulation	40
Abb. 17: Expression CD16 unter Serumstimulation	41
Abb. 18: Level IL-6 für M1 und M2	42
Abb. 19: Level TNF- α für M1 und M2	43
Abb. 20: Level IL-10 für M1 und M2	44
Abb. 21: Level TGF- β für M1 und M2.....	45
Abb. 22: Level IL-6 unter Serumstimulation.....	47
Abb. 23: Level TNF- α unter Serumstimulation	48
Abb. 24: Level IL-10 unter Serumstimulation	50
Abb. 25: Level TGF- β unter Serumstimulation	51
Abb. 26: Zuordnung Serumstimulation zu den Phänotypen M1 und M2	57

6.2 Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Übersicht Kanäle FACS.....	19
Tabelle 2: Übersicht Antikörper und Isotypen.....	20
Tabelle 3: Einstellungen Laser je Kanal	21
Tabelle 4: Durchschnitt klinische Daten je Patientengruppe	26
Tabelle 5: Übersicht der gemessenen Marker im Vergleich der Ränge	53
Tabelle 6: Odds Ratio von OA zu Gesunden.....	55
Tabelle 7: Odds Ratio von RA zu Gesunden.....	55

Danksagung

Meinem Doktorvater Herrn Prof. Dr. med. Georg Pongratz danke ich herzlich für die Überlassung des Themas sowie die Unterstützung bei der Entwicklung und Umsetzung des Projektes. Seine wissenschaftliche Erfahrung und Begeisterung waren für mich in jedem Abschnitt der Arbeit sehr motivierend.

Ein weiterer großer Dank gilt dem Laborteam im Hiller Forschungszentrum Düsseldorf. Stellvertretend für das ganze Team danke ich Birgit Opgenoorth und Ellen Bleck für die hervorragende Unterstützung und Anleitung während der Durchführung des Projektes. Ihre stete Hilfsbereitschaft war für mich von großer Bedeutung. Tim Filla danke ich für die statistische Beratung.

Dem Team der Klinik für Rheumatologie unter Leitung von Herrn Prof. Dr. med. Schneider sowie dessen Nachfolger Herrn Prof. Dr. med. Distler möchte ich ebenfalls danken, insbesondere Frau Prof. Dr. med. Richter, Herrn PD Dr. med. Sander, Frau Dr. med. Mucke und Frau Dr. med. Kernder für Ihre Unterstützung zu meiner Arbeit, insbesondere in Hinblick auf die Proben und klinischen Daten.

Meinem Co-Betreuer Herrn Prof. Dr. med. Germing möchte ich für die Begleitung, unkomplizierten Absprachen und anregenden Gespräche danken.

In besonderer Weise danke ich meiner Familie für die bedingungslose Unterstützung, aufbauenden Worte und Rückhalt in allen Stationen der Arbeit sowie meinem Freund Clemens für das Korrekturlesen.