

Urologische Klinik und Poliklinik der Technischen
Universität München
Klinikum rechts der Isar

(Direktor: Univ.-Prof. Dr. R. Hartung)

Suche nach neuen Wegen der Zellmodulation

Ulrike Holzhey

Vollständiger Abdruck der von der Fakultät für Medizin der Technischen Universität München zur Erlangung des akademischen Grades eines Doktors der Medizin genehmigten Dissertation.

Vorsitzender: Univ.-Prof. Dr. D. Neumeier

Prüfer der Dissertation:

1. Univ.-Prof. Dr. R. Hartung
2. Univ.-Prof. Dr. B. Holzmann

Die Dissertation wurde am 24.10.02 bei der Technischen Universität München eingereicht und durch die Fakultät für Medizin am 12.02.03 angenommen.

I	EINLEITUNG	3
1	Überblick über das Immunsystem	3
2	Der Haupt-Histokompatibilitätskomplex (major histocompatibility complex, MHC)	3
3	T-Lymphozyten	5
3.1	T-Helferzellen (Th)	5
3.2	Zytotoxische T-Lymphozyten (ZTL)	7
3.3	T-Suppressorzellen (Ts)	8
4	Der T-Zell-Rezeptor (TZR)	8
5	Antigenprozessierung und -präsentation	9
5.1	Antigenpräsentierende Zellen (APZ)	9
5.2	Zwei Wege der Antigenpräsentation	9
5.3	Makrophagen	10
6	An der Immunabwehr beteiligte Lymphokine (Zytokine)	10
6.1	Lymphocyte Transforming Factor (LTF)	10
6.2	Lymphotoxin (LT)	10
6.3	Interferone	10
6.4	Interleukine (IL)	11
6.5	Tumornekrosefaktor (TNF)	12
6.6	Transforming Growth Factor (TGF)	12
II	EIGENE FRAGESTELLUNG	13
III	MATERIALIEN UND METHODEN	14
1	Medien, Zusätze und Reagenzien	14
1.1	Zellkulturmedium	14
1.2	Fetales Kälberserum (FCS)	14
1.3	Phosphatgepufferte Salzlösung (PBS)	14
1.4	Lektine	14
1.5	Mitomycin C	14
2	Verwendete Testsubstanzen	15
2.1	β -Adrenozeptor-Blocker Propranolol	15
2.2	Kalzium-Kanal-Blocker	16
2.3	Organische Nitrate	16
3	Zellgewinnung	17
3.1	Abtrennung von Lymphozyten aus dem Vollblut	17
3.2	Einfrieren der Lymphozyten	18
3.3	Auftauen der Zellsuspensionen	18
4	Testverfahren	18
4.1	ELISA (enzyme-linked immunosorbent assay)	18
4.2	Die gemischte Lymphozytenkultur- MLC (mixed lymphocyte culture) bzw. MLR (mixed lymphocyte reaction)	18
4.3	Die zellvermittelte Zytotoxizität- CML (cell-mediated lympholysis, <i>modifiziert</i>)	24
IV	ERGEBNISSE	29
1	Die gemischte Lymphozytenkultur- MLC (mixed-lymphocyte culture)	29
1.1	MLC mit Testsubstanzen, ohne Lektine	29
1.2	MLC mit Testsubstanzen, zusätzlich Con A	35
1.3	MLC mit Testsubstanzen, zusätzlich PHA	38
1.4	MLC mit Testsubstanzen, mit bzw. ohne Lektine	42

2	Die zellvermittelte Zytotoxizität- CML (cell-mediated lympholysis, <u>modifiziert</u>)	47
2.1	CML (<i>modifiziert</i>) mit Testsubstanzen, keine Lektine	47
2.2	CML (<i>modifiziert</i>) mit Testsubstanzen, zusätzlich Con A	52
2.3	CML (<i>modifiziert</i>) mit Testsubstanzen, zusätzlich PHA	55
2.4	CML (<i>modifiziert</i>) mit Testsubstanzen, mit bzw. ohne Lektine	58
V	DISKUSSION	63
1	Die verwendeten Tests	63
2	Die Wirkungen der einzelnen Substanzen	64
3	Die beteiligten Lymphokine	66
4	Ein Überblick über die Versuchsergebnisse	67
4.1	MLC	67
4.2	CML (<i>modifiziert</i>)	67
VI	ZUSAMMENFASSUNG	68
VII	LITERATURVERZEICHNIS	69
VIII	ANHANG	76
1	Abbildungsverzeichnis	76
2	Abkürzungsverzeichnis	77
3	Danksagung	78
4	Lebenslauf	79

I EINLEITUNG

1 Überblick über das Immunsystem

Das menschliche Immunsystem setzt sich aus Zellen und Molekülen zusammen, die gemeinsam für die Immunantwort verantwortlich sind, und dient der Abwehr von für den Organismus fremden und schädlichen Eindringlingen (u.a. Bakterien, Viren, Toxine). Die kleinere Rolle spielt hierbei die natürliche Immunabwehr- vor allem die Haut und Schleimhäute. Man unterscheidet die zellvermittelte (Effektormoleküle v.a. T-Lymphozyten) von der humoralen Immunität (bestehend v.a. aus Antikörpern und dem Komplementsystem).

Den entscheidenden Anteil hat das spezifische (erworbene) Immunsystem, bestehend aus Antikörpern und vor allem aus Lymphozyten, die gezielt gegen fremde Antigene vorgehen können.

Antigene sind für den Körper fremde Strukturen, z.B. Oberflächenbestandteile von Parasiten, Viren und Bakterien, aber auch Nukleinsäurebestandteile, Polysaccharide oder Proteine.

Die Lymphozyten der spezifischen Abwehr teilen sich auf in zwei Gruppen: B- und T-Lymphozyten sowie NK-Zellen (natural killer cells). B-Lymphozyten (bone marrow-derived oder auch Bursa Fabricii- abgeleitet, ein Organ, das nur bei Vögeln vorkommt) entstehen im Knochenmark aus hämatopoetischen Stammzellen und verteilen sich im Körper vor allem in den lymphatischen Organen (Milz, Tonsillen, Knochenmark) sowie in Blut- und Lymphbahnen. Zur Antigenerkennung tragen B-Lymphozyten auf ihrer Oberfläche Immunglobuline als spezifische Rezeptoren. Nach Bindung des Antigens kommt es zur Aktivierung der B-Lymphozyten, die Lymphoblasten differenzieren sich zu Effektorzellen bzw. Plasmazellen (Antikörperproduktion!), aber auch zu Gedächtniszellen. Von entscheidender Bedeutung dabei sind von aktivierten T-Lymphozyten (s.u.) abgegebene Mediatoren (Lymphokine wie IL-2, IL-4, IL-5), so daß nun über Antigen-Antikörper-Komplexe vermittelte unspezifische Abwehrmechanismen zur Inaktivierung des Antigens führen können (= humorale Immunabwehr).

NK-Zellen (Literaturstelle 2, S. 332) sind große lymphoide Zellen mit viel zytoplasmatischer Granula (daher auch der Name „large granular lymphocytes“, lgl), deren lytische Aktivität nicht durch spezifische Antigene induziert ist (= natürliche Killerzellen). Sie durchwandern keinen Thymusreifungsprozeß (s.u.) und besitzen keinen spezifischen T-Zell-Rezeptor. NK töten neoplastische und virusinfizierte Zellen, unterstützt von Antikörpern (= ADCC, antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity).

Die Vorläuferzellen der T-Lymphozyten wandern aus dem Knochenmark in den Thymus ein (daher der Name der T-Zellen). Dort entwickeln sie sich zu reifen T-Zellen und besiedeln dann die peripheren lymphatischen Organe. Sie sind verantwortlich für die zelluläre Immunabwehr und so vor allem beteiligt an der Transplantat-Abstoßung, an der Graft-versus-Host-Reaktion (GvH), an der Tumor-Regression und an der Abwehr von viralen, bakteriellen, mykotischen und parasitären Infekten.

T-Zellen können Antigene nicht (wie z.B. Antikörper) in freier, löslicher Form erkennen, sondern brauchen spezielle Präsentationsmoleküle- die MHC-Moleküle, um so Antigene in Form eines Peptidfragmentes erkennen zu können.

2 Der Haupt-Histokompatibilitätskomplex (major histocompatibility complex, MHC)

Der Haupt-Histokompatibilitätskomplex wurde ursprünglich nur mit den Prozessen der Transplantatabstoßung in Zusammenhang gebracht. Erst später erkannte man die Bedeutung dieser stark polymorphen Genprodukte (für jeden Locus gibt es zahlreiche allele Varianten!) in der Unterscheidung zwischen körpereigenen und fremden Antigenen sowie besonders in der Regulation der Immunantwort Antigen-spezifischer T-Lymphozyten. Der MHC-Komplex- beim Menschen „human leucocyte antigen“ (HLA)- System genannt- ist ein dreidimensionaler Genabschnitt auf dem kurzen Arm des Chromosoms 6 (113, S 118), der Glykoproteine auf der Zelloberfläche für die Antigenerkennung durch T-Lymphozyten kodiert und verantwortlich für die Unterscheidung von „Selbst“ und „Nichtselbst“ ist. Es handelt sich um ein kodominant vererbtes Antigenensystem, das eine wichtige Rolle u.a. bei Bluttransfusionen, Transplantationen und GvH-Reaktionen spielt.

MHC-Antigene bestimmen, ob ein Gewebe mit dem des Empfängers kompatibel ist, d.h. sie agieren als Allogene, die vom Immunsystem des Empfängers erkannt werden; Individuen, die die gleichen MHC-Moleküle exprimieren, können voneinander Gewebetransplantate akzeptieren (60, S 172). Als Nachweis gelten u.a. zwei Tests (MLC und CML), die später noch ausführlich besprochen werden.

Es werden 3 Klassen von MHC-Molekülen kodiert:

1.) MHC Klasse I-Moleküle (kodiert von den Genloci HLA-A, -B und -C beim Menschen) werden von fast allen kernhaltigen Zellen exprimiert und agieren mit CD8+-T-Zellen (s. Punkt 3.2.) Als separate Polypeptidketten setzen sie sich zusammen aus einer schweren Glykoproteinkette (45 kD) mit 3 extrazellulären (α 1-, α 2- und α 3-Domäne), einer transmembranalen und einer zytoplasmatischen Region. An die schwere Kette bindet zusätzlich β 2-Mikroglobulin (MG 11500, wichtig für die Stabilisierung des MHC Klasse I-Moleküls), das beim Menschen auf Chromosom 15 kodiert wird (80, S. 1102). Diese nicht-kovalente Bindung führt zu einer

Immunglobulin-ähnlichen Konfiguration. Die Fähigkeit der zytotoxischen T-Lymphozyten, eine virusinfizierte Zelle zu lysieren, hängt direkt von der Menge der Klasse I-Moleküle ab.

2.) MHC Klasse II-Moleküle (kodiert von den Genloci HLA-DR, -DP und -DQ), zwei nicht-kovalent assoziierte Peptidketten, bilden ein Heterodimer aus einer α -Glykoproteinkette (MG 33000) und einer β -Glykoproteinkette (MG 28000) mit je zwei Untereinheiten (80, S. 1102). Sie werden ebenfalls in eine extrazelluläre ($\alpha 1/\alpha 2$ - und $\beta 1/\beta 2$ -Domäne), eine transmembranale und eine zytoplasmatische Region unterteilt. Klasse II MHC-Moleküle werden nur auf B-Lymphozyten, Makrophagen, dendritischen Zellen und Endothelzellen sowie auf manchen T-Lymphozyten exprimiert, agieren mit CD4+T-Zellen (s. Punkt 3.1.) und können längere Peptide binden als Klasse I MHC-Moleküle.

Peptidfragmente von extrazellulären Proteinen binden normalerweise an Klasse II MHC-Moleküle, endogen synthetisierte Proteine an Klasse I MHC-Moleküle. Die Präsentation des Antigens an der Oberfläche von Antigen-präsentierenden Zellen (APZ) in Assoziation mit den Klasse II-MHC-Determinanten ist notwendig für die Induktion verschiedener T-Lymphozyten (Antigen-induzierte Proliferation, Hilfe für die Antikörper-Produktion durch B-Lymphozyten, Vermittlung verzögerter Überempfindlichkeit, Aktivierung der Helferzellen für zytotoxische T-Lymphozyten).

T-Lymphozyten können Peptid-Antigene nur erkennen, wenn diese mit einer bestimmten allelen Form eines MHC-Moleküls einen Komplex bilden.

3.) MHC Klasse III-Moleküle kodieren für verschiedene Komplementkomponenten (den klassischen sowie den alternativen Weg).

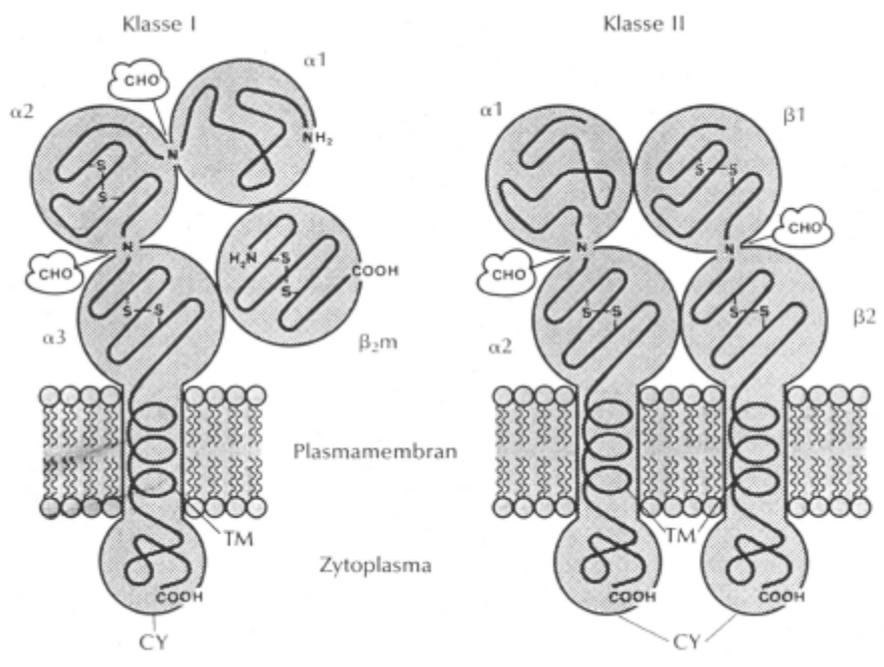


Abbildung 1: Allgemeiner Überblick über Klasse I- und Klasse II-MHC-Moleküle (Jan Klein)

CHO: Kohlenhydratseitenkette, CY: zytoplasmatische Region, TM: transmembranöse Region.

Von großer Bedeutung ist die Tatsache, dass T-Lymphozyten nur mit MHC-Molekülen reagieren können, die sie während ihrer Entwicklung im Thymus als „selbst“ kennengelernt haben = positive Selektion im Thymus durch fremde Peptide, die an eigene MHC-Moleküle gebunden sind, negative Selektion von T-Zellen, die mit eigenen Peptiden reagieren.

Damit ein Fremdprotein überhaupt mit dem MHC in Verbindung treten kann, muß es zunächst von den Antigen-präsentierenden Zellen (APZ) phagozytiert und verarbeitet werden (s. Punkt 5.), danach erscheint es in Verbindung mit dem MHC-Molekül auf der Zelloberfläche. Welche antigenen Determinanten präsentiert werden, hängt von der Struktur des MHC ab. Die Spezifität der Erkennung liegt beim Antigenrezeptor der T-Lymphozyten (s. Punkt 4.), da MHC-Moleküle ein relativ breites Spezifitätsspektrum für Peptidbindungen haben.

Bevor nun auf die Untergruppen der T-Lymphozyten eingegangen wird, muß ein weiterer Punkt geklärt werden: Lymphozyten besitzen definierte Oberflächenantigene, die CD- (= cluster of differentiation) Antigene. Diese Glykoproteine dienen als akzessorische Moleküle und erleichtern die Kommunikation zwischen den Zellen der Immunabwehr. Die Verteilung der Oberflächenantigene ist folgendermaßen:

CD 2,3,5,6,7 befinden sich auf T-Zellen, CD 4 auf den T-Helferzellen (Th), CD 8 auf den zytotoxischen bzw. T-Suppressorzellen (ZTL bzw. Ts), CD 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25 auf B-Zellen und CD 12, 13, 14 auf Makrophagen.

Die wichtigsten Oberflächenmarker sind CD 4 der T-Helferzellen und CD 8 der zytolytischen T-Zellen- man schreibt auch CD4+ bzw. CD8+. Sie besitzen unterschiedliche Muster der MHC-Restriktion und erleichtern die Interaktion der T-Zellen mit den APZ und ZTL-Zielzellen. Es gilt als sicher, daß die meisten der CD8+T-Zellen MHC Klasse I-restringiert, dagegen die meisten der CD4+T-Zellen MHC Klasse II-restringiert sind. Nur die extrazellulären Domänen von CD4 und CD8 binden an Klasse II- und Klasse I-MHC und agieren so als Adhäsionsmoleküle, die den Kontakt zwischen der T-Zelle und den APZ verstärken.

CD4+T-Zellen verlieren ihre Reaktionsbereitschaft, wenn sie Peptidantigene erkennen, die von anderen T-Zellen (die Klasse II-Moleküle exprimieren) präsentiert werden (2, S. 186)!

3 T-Lymphozyten

Es ist eine wichtige Frage, ob die verschiedenen T-Zellfunktionen von einer einzelnen T-Zell-Population mit verschiedenen Fähigkeiten ausgeübt wird oder ob jeweils eine einzelne Gruppe oder Subpopulation von T-Zellen verantwortlich ist (56, S. 232). T-Lymphozyten entstehen aus Stammzellen im Knochenmark und reifen im Thymus; die Thymozyten im Kortex interagieren mit MHC-exprimierenden Epithelzellen, so dass es zu einer Selektion kommt; das T-Zell-Repertoire bekommt eine Eigen-MHC-Restriktion sowie eine Eigentoleranz. T-Lymphozyten spielen eine Rolle bei der Transplantat-Abstoßung, der GvH-Reaktion, der Tumorregression, der immunologischen Spätreaktion und der Abwehr viraler, bakterieller, mykotischer und parasitärer Infekte.

T-Zellen bleiben nicht in den lymphatischen Organen, sondern zirkulieren über das Blut bzw. die Lymphe. 70 % der zirkulierenden Lymphozyten sind T-Lymphozyten; dabei sind drei Subpopulationen bekannt: T-Helferzellen (Th), zytotoxische bzw. zytolytische T-Zellen (ZTL) und T-Suppressorzellen (Ts).

3.1 T-Helferzellen (Th)

Es handelt sich um eine Subpopulation, die eine entscheidende Rolle bei der zellulären, aber auch bei der humoralen Immunität spielt; u.a. Assistenz bei der Antikörperproduktion der B-Zellen, bei der Antikörper-Freisetzung aus Plasmazellen, bei der Reifung von ZTL und Suppressorzellen, bei der Produktion von IL-1 und IL-2, bei der Konditionierung von Makrophagen zur Abtötung von intrazellulären Mikroorganismen u.v.m. Th rekrutieren und aktivieren Entzündungszellen (v.a. Makrophagen und Granulozyten) und bilden dadurch eine Brücke zur natürlichen Immunabwehr (2, S. 245).

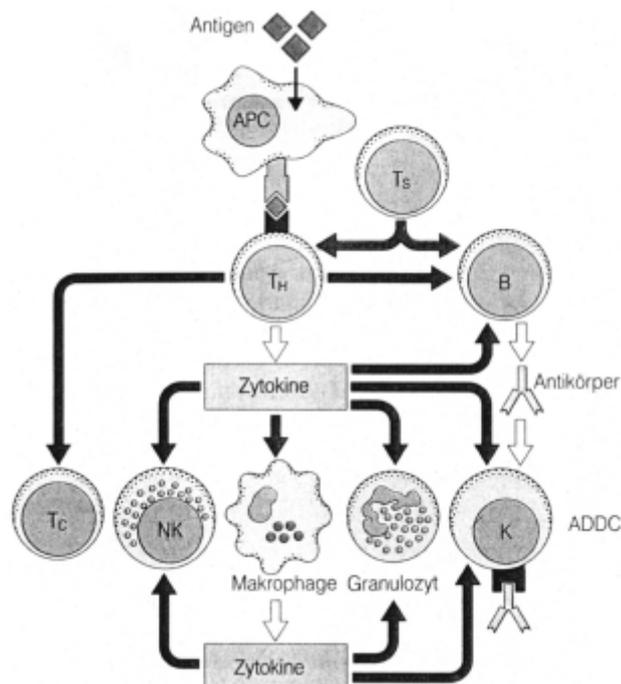


Abbildung 2: Zentrale Bedeutung der T-Helferzellen für die zellvermittelte Immunität (Ivan M. Roitt)

3.1.1 Th-Aktivierung

Naive T-Helferzellen unterscheiden sich von den aktivierten T-Zellen in ihrer Lymphokin-Produktion: sie können nur IL-2 sezernieren, T-Gedächtniszellen- sie leben sehr lange, z.B. führt eine Immunisierung im Kindesalter oft zu einer lebenslangen Immunität (80, S. 95)- dagegen neben IL-2 u.a. auch IL-4 und IFN- γ .

Aktivatoren sind Phytomitogene, Antigene und allogene Zellen, es kommt zur aktiven Stoffwechselleistung mit dem Endziel der Mitose.

Die Aktivierung und Proliferation hat zwei unterschiedliche Phasen: Aktivierung der ruhenden Zellen (G₀-Stadium) zum frühen G₁-Stadium des Zellzyklus durch die TZR-Stimulation sowie die IL-2-vermittelte G₁-Progression und die S-Phase.

Die wichtigste Voraussetzung und das erste Signal ist die Aktivierung von APZ durch Bindung des Antigens (58, S. 352). Nach Erkennen des fragmentierten Antigens als Komplex mit dem MHC durch die Helferzellen kommt es zur Bindung an den T-Zell-Rezeptor und zu dessen Aktivierung. Es folgt die Proliferation und Differenzierung in Effektor- und Gedächtniszellen. Die Interaktion des TZR mit dem Antigen-MHC-Komplex induziert Transmembransignale wie z.B. die Bildung von intrazellulären biochemischen Mediatoren, den sogenannten „second messengers“. Aktivierte Th sezernieren wachstumsfördernde Zytokine (v.a. IL-2) für andere T-Zellen, B-Zellen, Makrophagen und das vaskuläre Endothel und exprimieren auf ihrer Zelloberfläche passende Rezeptoren. T-Helferzellen sind somit die wichtigsten Koordinatoren der zellvermittelten Immunität. Die Produktion von IL-2 trägt zur Förderung der eigenen klonalen Expansion, zur Förderung anderer T-Zellen, die nicht IL-2 produzieren können (ZTL), von T-Zellen, die wenig IL-2 produzieren (Gedächtniszellen) und von Nicht-T-Zellen (NK, B-Zellen) bei (80, S. 493).

3.1.2 Unterteilung der T-Helferzellen in Th1 und Th2

Noch nicht lange bekannt ist die Tatsache, daß T-Helferzellen je nach Stimulation durch das umgebende Milieu, d.h. unter dem Einfluß verschiedener Lymphokine, von Th₀ in Th₁ bzw. Th₂ übergehen können (1, S. 787 sowie 57, S. 375 und 59, S. 50).

Th₀-Zellen sind normalerweise definiert als Produzenten von IL-2, IL-4 und IFN- γ und Vorläufer der Th₁- und Th₂-Zellen; sie könnten aber auch eine separate Population von T-Helferzellen darstellen. Vor der Differenzierung in Th₁ und Th₂ durchlaufen die T-Helferzellen ein Th₀-Stadium, in dem sie Zytokine sezernieren, die sowohl für Th₁ als auch für Th₂ charakteristisch sind (88, S. 256 sowie 78, S. 424 und 85, S. 542). Das Spektrum der T-Zell-Zytokin-Profile ist als dreidimensional anzusehen und beinhaltet daher extreme Phänotypen, die nicht Th₁, Th₂ oder Th₀ sind!

Die beiden Subpopulationen unterscheiden sich nicht nur in ihrer Zytokinproduktion, sondern auch in ihrer Reaktion auf diese Lymphokine. Der Beweis für die Existenz dieser beiden Untergruppen wurde unter Zuhilfenahme verschiedener T-Zell-Klone von Mäusen gefunden. Die verantwortlichen Mechanismen für die Differenzierung der naiven T-Helferzellen in Th₁ und Th₂ sind jedoch noch nicht vollständig geklärt (86, S. 9).

Th₁ sind inflammatorisch wirksame T-Helferzellen mit zytolytischen Eigenschaften; sie können die Immunglobulinproduktion der B-Zellen hemmen (das IFN- γ aus den Th₁-Zellen inhibiert alle IL-4-Effekte auf B-Zellen) und wirken so suppressiv, was die Antikörperproduktion betrifft. Dass sie so wenig Unterstützung für die B-Zellen liefern, könnte seine Ursache auch in der Fähigkeit von Th₁-Zellen haben, B-Zellen wahrscheinlich mittels IFN- γ und Lymphotoxin zu töten (88, S. 257).

Th₁ sind Induktoren der zellulären Immunantwort, produzieren IL-2, IL-3, TNF- α , IFN- γ (dadurch starke Makrophagenaktivierung; 80, S. 10) sowie Lymphotoxin und sind verantwortlich für die verzögerte Hypersensibilität. Für die Differenzierung in Th₁-Zellen ist die Anwesenheit von IL-12 und wahrscheinlich IFN- γ genauso erforderlich wie die Abwesenheit von IL-4. Dieses hat einen dominierenden Effekt über IL-12, was die Differenzierung in Th₂-Zellen fördert, wenn beide Interleukine gleichzeitig präsent sind (33, S. 2723).

Th₂ sind eher die „klassischen“ T-Helferzellen; sie unterstützen die B-Zellantwort, sind verantwortlich für deren Wachstum und Differenzierung und beteiligt, wenn es im Körper zu einer Eosinophilie (über IL-5) kommt. Sie induzieren die IgA-, IgE-, IgG- und IgM-Synthese durch autologe B-Lymphozyten in Anwesenheit des spezifischen Antigens, wobei die Ig-Antwort proportional zur Zahl der Th₂ ist, die man B-Zellen im Versuch hinzugefügt hat. Th₂ produzieren IL-4, IL-5, IL-6, IL-10 (dadurch Stimulation der T-Lymphozyten durch Makrophagen verhindert) sowie IL-13.

Beide Untergruppen sezernieren IL-3 und TNF- α (2, S. 246).

Zwischen Th₁ und Th₂ bestehen reziproke Beziehungen in Bezug auf Hemmung der Effektorfunktionen, die durch die beiden entgegengesetzten Untergruppen stimuliert werden, Hemmung der Proliferation/Zytokin-Produktion und Hemmung der Differenzierung ihrer Präkursoren (84, S. 45). Th₁ und Th₂ leben in einem fließenden Gleichgewicht und beeinflussen sich gegenseitig: die Zahl der Th₁ ist hoch in Anwesenheit von IL-2, von IFN- γ , von aktivierten CD8+ZTL, von Makrophagen als APZ und von intrazellulären Pathogenen. Th₁ sind vermindert unter dem Einfluß von IL-4 und IL-10 (indirekte Wirkung: IL-10 hemmt die Fähigkeit der APZ, die Th₁-Lymphokin-Produktion zu stimulieren (80, S. 748)!).

Th₂ proliferieren in Anwesenheit von IL-1, IL-4 (schon früh während der Antigen-Präsentation gebildet, steigert es die Antigen-induzierte Proliferation und Zytokinproduktion), IL-10 und von B-Zellen als APZ und werden gehemmt durch IFN- γ (Proliferation und Zytokinproduktion der Th₂ gehemmt) und CD8+ZTL. Die beiden Subpopulationen besitzen ebenfalls entgegengesetzte Wirkungen auf die Phagozyten: Th₁-Zellen stimulieren über IFN- γ die Expression der Klasse II MHC-Moleküle auf Makrophagen und steigern so deren zytotoxische Funktionen. IFN- γ fördert auch die Sekretion der inflammatorischen Zytokine TNF- α und IL-1.

Dagegen hemmen die Zytokine der Th2-Zellen (IL-4 und IL-10) die TNF- α -Produktion. Zusätzlich inhibiert IL-4 die Wirkungen von TNF- α und IL-1 (15, S. 1720).

Wahrscheinlich ist IL-1 an der Entwicklung von Th2-Zellen beteiligt; die Entfernung dieses Interleukins bzw. die Blockade durch einen Antagonisten führt dazu, dass die Th2-Zellen in Th0- oder sogar in Th1-Zellen umgewandelt werden. IFN- α , TGF- β und IL-12 fördern die Differenzierung von Th0-Zellen in Th1; der Beweis wurde wiederum durch die Blockade von IL-12 erbracht, was die Umwandlung der Th0-Zellen in Th2-Zellen bewirkte (88, S. 257).

Interessanterweise spielen auch die NK-Zellen eine wichtige Rolle: entfernt man sie aus den PBL-Populationen, ist die Fähigkeit von IL-12 gemindert, die Th2-Zellen in Th0- oder Th1-Zellen umzuwandeln; dieses zeigt, dass die inhibierende Wirkung von IL-12 auf Th2-Zellen zum Teil durch NK-Zellen hervorgerufen wird. Die Entfernung von NK-Zellen aus dem Blut hat dagegen keinerlei Wirkung auf die inhibitorische Aktivität von IFN- α . Wird den PBL IL-12 hinzugefügt, steigt die Menge des von den Th1-Zellen produzierten IFN- γ an (53, S. 22).

IFN- γ fördert die Entwicklung der Th1-Zellen direkt, indem es die IL-4-Produktion hemmt, wohingegen IL-12 unabhängig von den T-Zellen agiert, indem es die IFN- γ -Produktion direkt oder indirekt (über NK-Zellen) fördert (87, S. 289).

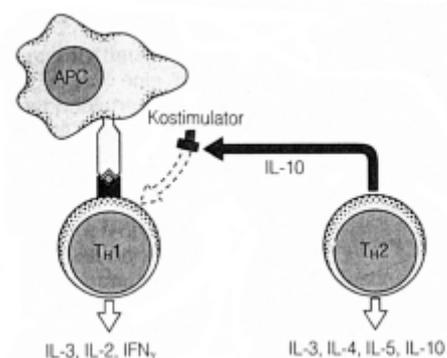
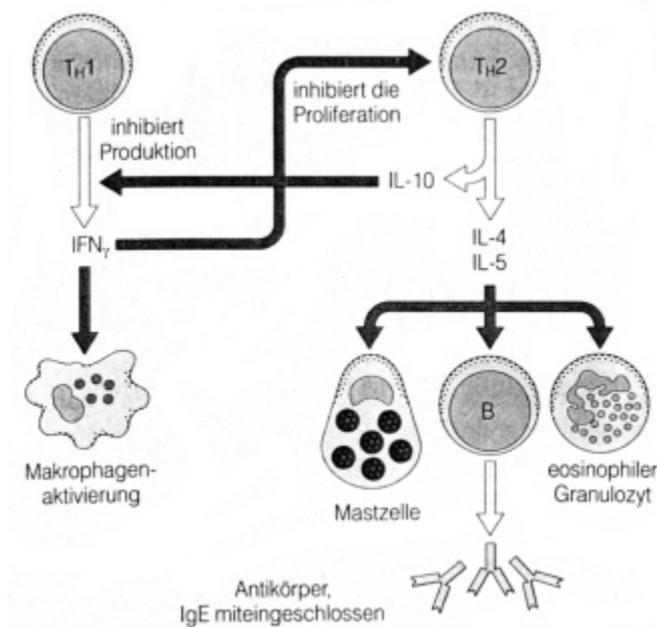


Abbildung 3: Selektion von Effektormechanismen durch Th1- und Th2-Zellen (Ivan M. Roitt)

Abbildung 4: T-Zell-Suppression der Immunreaktivität (Ivan M. Roitt)

3.2 Zytotoxische T-Lymphozyten (ZTL)

Nach Aktivierung der T-Helferzellen kommt es unter Zytokineinfluss zur Proliferation und Differenzierung der ZTL (18, S. 4053 sowie 63, S. 406). Die Unterstützung durch Th ist notwendig, da naive ZTL zwar durch das Antigen und die APZ direkt aktiviert werden können, die produzierte IL-2-Menge aber zehnfach kleiner ist als bei CD4⁺Zellen (80, S. 699). Für die ZTL-Vorstufen gibt es zwei Signale: Stimulation des TZR, wodurch die Empfänglichkeit für Zytokine anderer Zellen steigt sowie die Stimulation durch aktivierte Th mit Folge der IL-2-, IL-4-, IL-6- und IL-10-Produktion (19, S. 395). Die Induktion einer zytotoxischen T-Zell-Antwort erfordert in der Regel Interaktionen zwischen einer antigenpräsentierenden Zelle, einer ZTL-Vorläuferzelle und einer T-Helferzelle.

Zytotoxische oder auch zytolytische T-Lymphozyten werden etwa 4-9 Tage nach Infektionsbeginn gebildet (113, S. 151) als Antwort auf antigene allogene Oberflächen-MHC-Determinanten und sind wichtig bei intrazellulären Infektionen (z.B. virale Infekte, obligat intrazelluläre Bakterien wie *Listeria monocytogenes*), aber auch beteiligt an der akuten Transplantat-Abstoßung sowie an der Abstoßung von neoplastischen Zellen (2, S. 328). Prä-ZTL benutzen als Proliferationssignal kurze Peptide in Verbindung mit MHC Klasse I, aber auch allogene Peptide, die durch Selbst-MHC oder Allogen-MHC präsentiert werden (80, S. 966). Nach Stimulation durch aktivierte T-Helferzellen (u.a. durch IL-2, IL-4, IL-6 und IL-10) und somit auch Stimulation des T-Zell-Rezeptors der ZTL kommt es zur Blastentransformation, was die Voraussetzung für die Antigen-spezifische Lyse ist.

Der Vorgang der Zytolyse ist wie folgt (2, S. 320-321): Antigenerkennung und Zellkontakt, Aktivierung der ZTL, „lethal hit“ an die Zielzelle, Ablösung der ZTL. Die zytotoxischen T-Zellen selber werden bei der Lyse nicht

geschädigt. Für diesen „Killvorgang“ werden zwei Mechanismen diskutiert, die unabhängig voneinander vorkommen können:

1) Zytolytische Granula. Diese werden von den ZTL nach deren Aktivierung mittels Signalwege (s. Punkt 4 über den T-Zell-Rezeptor) freigesetzt und bewirken die Lyse der erkannten Zielzelle. Der Inhalt solcher Granula besteht aus einer Reihe von Serinesterasen, aber auch aus Proteoglykanen, Proteintoxinen und besonders aus Perforin. Dieses bildet in Kalzium-haltigem Milieu polymere Kanäle in der Zielzell- (oder auch Targetzell-) Membran, die zu Ionenverschiebungen und osmotischer Lyse der Zielzellen führen.

2) Apoptose. Zytolytische T-Zellen können ihre Zielzellen dazu veranlassen, eine Art „Suizid“ zu begehen. Dieser Vorgang, auch bekannt unter „Nukleäre Dissoziation“, führt zur DNS-Fragmentation und damit zum Zelltod der betroffenen Targetzellen. Beteiligt an diesem Vorgang sind bestimmte Endonukleasen, aber auch sogenannte Granuzyme, eine Untergruppe von Serinproteasen, die von ZTL freigesetzt werden (12, S. 105).

3.3 T-Suppressorzellen (Ts)

Immer noch umstritten ist die Existenz der T-Suppressorzellen. Es handelt sich wohl um Zellen mit supprimierendem Einfluß auf die Ausbildung und den Ablauf der Immunabwehr; sie sind also negativ modulierend und verhindern ein Überschießen der Antikörper-Produktion (14, S. 131 und 93, S. 132).

Man nimmt an, daß Ts die Aktivierungsphase der Immunantwort unterdrücken: Antigene werden in Abwesenheit vom MHC erkannt, das Wachstum und die Differenzierung der Ts sind aber weiterhin von CD4+T-Zellen abhängig. Möglicherweise sind Ts aber gar keine einzelne Zellpopulation, sondern Lymphozyten, die die Immunantwort auf verschiedene Arten unterdrücken (2, S. 261).

Suppressorzellen können auch zytotoxisch wirken über direkten Zellkontakt oder über Zytokine (TNF, LT). Sie produzieren (ähnlich Th2) IL-4 und IL-10, erkennen aber andere antigenen Determinanten als T-Helferzellen, wobei der genetische Hintergrund dafür noch nicht klar ist.

Ts sind hochempfindlich gegenüber Strahlen und Cyclophosphamid und werden aktiviert durch eine sehr hohe oder sehr niedrige Antigendosis, durch Antigene, die sehr lange in der Zirkulation verbleiben und durch wiederholte Gabe von Antigen (chronische Infektionen; 113, S. 174!).

W. Paul (80, S. 750-752) beschreibt die Kaskade der Ts-Suppression folgendermassen: Sie beginnt mit den Ts1-Zellen; diese verhalten sich als T-Suppressor-Induktorzellen (und haben CD4+!), sind antigenspezifisch und unterscheiden sich von Th nur durch ihre Sekretion von TSF1 (T-suppressor-soluble factor 1), produzieren ebenfalls IL-2 und IL-4. Sie aktivieren Ts2 über den antigenspezifischen TSF1. Ts2 sind antigenunspezifische, anti-idiotypische CD4+, manchmal auch CD8+, die supprimieren oder Th töten können. Über den TSF2 (dieser braucht Makrophagen!) werden Ts3 aktiviert, die CD4+ oder CD8+ haben können, d.h. deren Suppression ist nicht durch den MHC restringiert. Diese Ts3-Zellen sind die eigentlichen Effektorzellen der Suppression.

Interessanterweise werden CD4+T-Zell-Klone anerg, wenn man sie CD8+Ts-Zellen vorlegt, und sie bleiben auch unfähig, auf Antigene und APZ für mindestens 10 Tage zu antworten, auch wenn sie weiter mit Hilfe von IL-2 proliferieren (80, S. 753).

Die effizientesten APZ, die Ts induzieren, sind Makrophagen, die Hilfe von IFN- γ und TGF- β erhalten.

4 Der T-Zell-Rezeptor (TZR)

Zytotoxische Lymphozyten, wie auch alle anderen T-Lymphozyten, besitzen zur Antigenerkennung einen T-Zell-Rezeptor, der MHC-Moleküle und die von ihnen präsentierten Peptidantigene als Einheit erkennen kann. Mit Hilfe von monoklonalen Antikörpern (mAk), T-Zell-Klonen und T-Zell-Hybridom-Techniken, die erst seit Anfang der 80er Jahre zur Verfügung stehen, konnte zwischen 1982 und 1985 die Struktur des T-Zell-Rezeptors aufgeklärt werden (80, S. 10). Hierbei wurde davon ausgegangen, daß der TZR eine für jeden Klon spezifische Antigenbindungsstelle besitzt (98, S. 361).

Beim TZR handelt es sich um eine Struktur an der äußeren Membran der T-Lymphozyten, die für die Bindung von Antigen determinanten verantwortlich ist. Die meisten T-Zellen exprimieren einen TZR aus α - und β -Ketten (MG 40 000-50 000), nur eine kleine Gruppe von TZR besteht aus γ - und δ -Ketten (typischerweise CD4+, nur sehr wenig CD8+). Durch die vierfache Kodierung besteht eine duale Spezifität für Antigene und MHC-Moleküle (58, S. 85). Die Vielfalt der Antigen-Erkennung kommt von der variablen Region der α - und β -Ketten. A- und δ -Kette werden durch Chromosom 14, β - und γ -Kette durch Chromosom 7 und der CD3-Komplex (s.u.) durch Chromosom 11 genetisch festgelegt.

Der TZR gehört aufgrund von Strukturgleichheiten wie u.a. MHC-Molekülen und Immunglobulinen zur Immunglobulin-Supergenfamilie. So werden die unterschiedlichen Ketten (α , β , γ , δ) auch aus konstanten, variablen und hypervariablen Regionen gebildet- analog dem Immunglobulinaufbau-, so dass eine Vielfalt von verschiedensten Antigenen erkannt werden kann (80, S. 383).

Der TZR hat zwei Funktionen bei der Antigen-induzierten Aktivierung der T-Zellen: Bindung spezifischer Antigene in Verbindung mit dem MHC-Komplex und Umwandlung dieser Bindung in Signaltransduktion.

Auf der Zelloberfläche ist der TZR sowohl räumlich als auch funktionell mit dem CD3-Komplex nicht-kovalent assoziiert. Dieser setzt sich aus je einer γ - (MG 21 000), δ - (MG 28 000), ϵ - (MG 26 000), ζ - (MG 32 000) und η - (MG 21 000) Kette zusammen. Seine Hauptfunktion liegt in der transmembranalen Signalübermittlung in das Zellinnere nach Bindung des TZR an MHC-Peptid-Komplexe, zumal die α - und β -Ketten des TZR nur kurze zytoplasmatische Domänen besitzen und dazu nicht fähig sind. Die CD3-Komplex-Ketten übermitteln Signale nach der Interaktion mit APZ, es kommt zur Expression von Oberflächenmolekülen, zur Aktivierung von B-

Lymphozyten und zur Sekretion von Lymphokinen. Auch die T-Zellaktivierung hängt von der Interaktion TZR-CD3 mit den Liganden ab (50, S. 553 sowie 107, S. 317).

Mehrere intrazelluläre Signalwege sind inzwischen identifiziert, die zur Aktivierung zytotoxischer T-Lymphozyten führen können (80, S. 475). Hierzu zählt u.a. die Aktivierung mehrerer Tyrosinkinassen, wodurch es zur Phosphorylierung der Phospholipase C (PLC) kommt. Die Folge ist eine Spaltung von Phosphatidylinositol-4,5-Bisphosphat (PIP_2) und damit Aktivierung der second messenger 1,4,5- IP_3 (1,4,5-Inositoltriphosphat) und 1,2-Diacylglycerol. Durch IP_3 kommt es zum Einstrom von Kalzium aus den Speichern des Endoplasmatischen Retikulums (ER) ins Zytoplasma. Die Kalziumkonzentration wird auch durch den Einstrom aus dem Extrazellulärraum erhöht; Kalzium-Kalmodulin-Komplexe führen zur Aktivierung zahlreicher Enzyme. Das zweite Spaltprodukt DAG hat die Aktivierung der Proteinkinase C und deren Translokation ins Zytoplasma zur Folge.

Die intrazelluläre Kalzium-Mobilisation ist ein relativ spätes Ereignis, wenn man die TZR-Bindung betrachtet, nachdem sie aus der PLC-Phosphorylierung resultiert, der sich der Abbau des Phosphoinositols, die Freisetzung von Kalzium aus intrazellulären Speichern und die Öffnung von Kalziumkanälen der Plasmamembran anschließen (118, S. 1815).

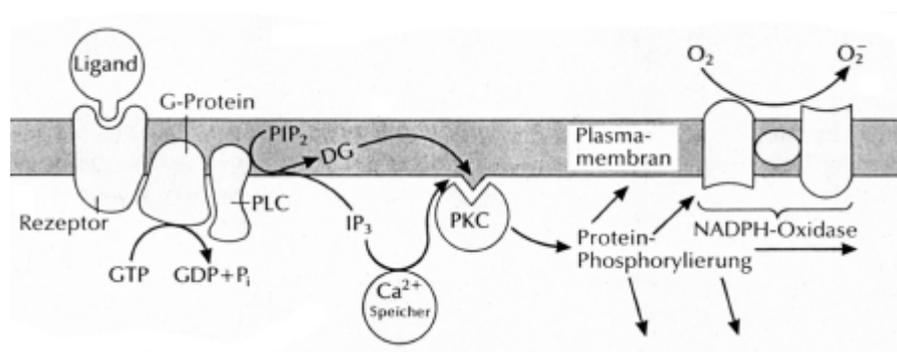


Abbildung 5: Aktivierung über den TZR (Jan Klein)

Die Erhöhung des zytosolischen Kalziums in den Zielzellen nach Angriff der ZTL z.B. bewirkt eine Aktivierung von Endonukleasen, Proteasen und ATPasen; es kommt zur DNS-Fragmentierung über Ca^{2+} -abhängige Topoisomerasen. Das Kalzium verursacht Schäden an den Mitochondrien, wodurch die ATP-Produktion der Zellen sinkt; die Na^+/K^+ -ATPase wird gehemmt, es kommt zu Schäden an der Plasmamembran und somit zum Zelltod.

5 Antigenprozessierung und -präsentation

Während B-Lymphozyten Peptide, Proteine, Nukleinsäuren, Polysaccharide und Lipide verarbeiten, können T-Lymphozyten Antigen nicht in freier, löslicher Form erkennen, sondern nur Peptide, die an MHC-Moleküle gebunden sind (= MHC-Restriktion). Viele Antigene, v.a. Bakterienbestandteile und Proteine, sind zu groß für die direkte Bindung an MHC-Moleküle und müssen daher von den Antigen-präsentierenden Zellen erst umgeformt werden.

5.1 Antigenpräsentierende Zellen (APZ)

APZ stellen ein wesentliches Glied des wahrnehmenden Armes des lokalen Immunsystems dar und können mononukleäre Phagozyten (Monozyten bzw. Makrophagen in Blut und Gewebe), Langerhanszellen (Haut), interdigitierende Zellen (Thymus, Milz, Lymphknoten), follikuläre dendritische Zellen (Lymphknoten, Milz) oder auch B-Lymphozyten sein. Das Ausmaß dieser Zellpopulationen ist in verschiedenen Organen erheblichen Schwankungen unterworfen.

5.2 Zwei Wege der Antigenpräsentation

Man unterscheidet den exogenen vom endogenen Weg der Antigen-Präsentation. In den meisten Fällen mündet der exogene Weg in der Präsentation von Peptiden durch MHC Klasse II-Moleküle, während der endogene Weg die Beladung von MHC Klasse I-Molekülen zum Ziel hat.

Der exogene Weg beginnt mit der Bindung des Antigens an die Zelloberfläche von APZ, gefolgt von Endozytose und Internalisierung des Antigens. Der nächste Schritt besteht im Abbau durch Lysosomen und Proteasen (2, S. 155).

Auf diesem Weg entstandene Antigenbruchstücke rezirkulieren zur Oberfläche und binden dort an MHC Klasse II-Moleküle. Diese Peptid-MHC-Komplexe werden anschließend den Th-Lymphozyten präsentiert, wodurch es zur Aktivierung von T-Induktorzellen kommt; die Folge ist die Ausprägung von IL-1-Rezeptoren. Besetzt nun IL-1 diese Rezeptoren, werden die T-Lymphozyten zur Synthese und Freisetzung von IL-2 und zur Expression von IL-2-Rezeptoren angeregt; durch den Anstieg der Protein- und DNS-Synthese wird die Mitochondrien- oder Blastogenese in Gang gebracht (58, S. 85).

Beim endogenen Weg der Antigen-Präsentation werden in der Zelle Proteine als Peptidfragmente an MHC Klasse I-Moleküle gebunden. Diesen Weg beschreiten nicht nur „Selbstproteine“, sondern auch Proteine von intrazellulären Erregern (z.B. Viren, Parasiten oder Bakterien wie *L. monocytogenes*).

Über das ER und den Golgi-Apparat der Zelle werden die prozessierten oder synthetisierten Peptidantigene mit MHC-Klasse I-Molekülen kombiniert. Diese Komplexe werden anschließend mittels Vesikeln an die Zelloberfläche transportiert und dort exprimiert.

Die endogen entstandenen Peptid-MHC-Komplexe werden von zytotoxischen T-Lymphozyten erkannt, wodurch es zur Aktivierung der ZTL kommt.

5.3 Makrophagen

Makrophagen sind große phagozytierende Zellen, die im Knochenmark über den Weg Stammzellen, Monoblasten (Blut) und Monozyten (im Gewebe) entstehen; sie zirkulieren ca. einen Tag im Blut und gehen dann ins Gewebe über (2, S. 33). Alveolarmakrophagen bilden zusammen mit den Monozyten im Blut, den Histozyten im Gewebe, den KUPFFER-Sternzellen in der Leber, den Osteoklasten im Knochen, den Mikroglia im ZNS, den Langerhanszellen auf der Haut und den dendritischen Zellen das sogenannte „mononukleäre-phagozytäre System“ (MPS), auch genannt „retikulo-histozytäres System“ (RHS) oder „retikulo-endotheliales System“ (RES).

Makrophagen besitzen eine Vielzahl von wichtigen Aufgaben im menschlichen Körper (80, S. 111-112), z.B. Phago- und Pinozytose, Migration, Zytotoxizität, Kooperation mit Lymphozyten, Sekretion von biologisch aktiven Substanzen, Abwehr von Virusinfektionen, Antigenpräsentation, T-Zellaktivierung, Granulombildung und Beteiligung an der verzögerten Hypersensibilität. Die Regulation dieser vielseitigen Zellen erfolgt über Faktoren wie der Makrophagen-aktivierende Faktor- ein Lymphokin aus stimulierten Lymphozyten-, der Makrophagen-Aggregationsfaktor, der Makrophagen-chemotaktische Faktor, der Makrophagen-zytotoxische Faktor und der Makrophagen-inhibitorische Faktor (69, S. 6170).

Zusätzlich exprimieren Makrophagen eine Reihe von Oberflächenrezeptoren für Proteine, Toxine, Zytokine, Polysaccharide und Lipide. Sezernierte Produkte der Phagozyten sind vor allem Arachidonsäurederivate (Leukotriene oder Prostaglandine, die die Mitogenese von Lymphozyten regulieren), Wachstumsfaktoren, Enzyme (u.a. Elastase, Proteasen, lysosomale Enzyme), Zytokine, Komplementfaktoren und Proteine wie α 2-Makroglobulin und Transferrin (80, S. 111).

Als APZ präsentieren Makrophagen den T-Lymphozyten Peptidfragmente, sie werden durch die aktivierten T-Zellen aber auch selber aktiviert (besonders über IL-1, das von aktivierten Th freigesetzt wird). Die negative Rückkopplung erfolgt über IL-10, TGF- β und PGE₂. Weniger als 15 % der ruhenden Makrophagen tragen an ihrer Oberfläche MHC-Antigene der Klasse II. Sie sind nur in beschränktem Maße fähig, als APZ zu wirken. Makrophagen werden durch CD4+-T-Helferzellen und die von ihnen sezernierten Lymphokine, insbesondere IFN- γ , induziert. Voraussetzung ist die Bindung spezifischer Antikörper sowie die MHC-Restriktion.

6 An der Immunabwehr beteiligte Lymphokine (Zytokine)

Lymphokine sind Mediatoren der zellvermittelten Immunität- lösliche Faktoren, die nach der Aktivierung von Lymphozyten freigesetzt werden und die Abwehrleistung verstärken, indem sie so unterschiedliche Zellen wie Lymphozyten, Makrophagen, NK-Zellen, Granulozyten und Wachstumsfaktoren (= Pleiotropismus) aktivieren, sich aber auch gegenseitig beeinflussen (80, S. 562). Während der Immunantwort (Effektorphase) gebildet, wirken sie nur unspezifisch und für einen kurzen Zeitraum.

Sie können auf Nachbarzellen wirken (= parakrin), auf die gleiche Zelle (= autokrin) oder, Hormonen ähnlich, über die Zirkulation (= endokrin).

6.1 Lymphocyte Transforming Factor (LTF)

LTF ist ein Lymphokin, das aus stimulierten Lymphozyten freigesetzt wird und beiträgt zu deren Blastentransformation und Proliferation.

6.2 Lymphotoxin (LT)

Stimulierte Lymphozyten sezernieren diesen Faktor (ursprünglich TNF- β genannt) zusammen mit IFN- γ ; er wirkt zytolytisch auf andere Zellen, kann aber auch Zellen wie NK-Zellen und neutrophile Granulozyten aktivieren. LT wird besonders durch Th1 und ZTL produziert und kann B-Zellen während ihrer Antigen-Präsentation an Th1-Zellen töten, obwohl unter anderen Umständen LT auch als Wachstumsfaktor für B-Zellen agieren kann (80, S. 566).

6.3 Interferone

Es handelt sich hier um Zytokine, die als Schutz gegen Viren, aber auch zytostatisch und immunsuppressiv wirken können. Besonders Makrophagen und Lymphozyten, aber auch viele andere Zellen sind zur Interferonbildung fähig; diese werden freigesetzt bei zellulären Immunreaktionen, haften an Rezeptoren auf der Oberfläche von infizierten Zellen und stören damit u.a. die Transkription der viralen DNS (2, S. 295).

Als Mediatoren der natürlichen Immunität gelten IFN- α und IFN- β . IFN- α wird von Makrophagen bzw. Monozyten gebildet, steigert die Aktivität von NK-Zellen, fördert die Generierung von ZTL und die Expression

von MHC Klasse I-Molekülen. IFN- β entsteht aus Fibroblasten, wirkt antiviral, antiproliferativ und fördert ebenfalls die Expression von MHC Klasse I-Molekülen.

IFN- γ stimuliert die Antikörper-vermittelte Opsonierung und wirkt mit bei der immunvermittelten Entzündung (2, S. 309). Es stammt aus T-Lymphozyten und NK-Zellen und stimuliert Makrophagen (die antimikrobielle und tumorizide Aktivität ist dadurch erhöht), aber auch besonders Th1-Zellen. IFN- γ fördert im Gegensatz zu IFN- α und IFN- β die Expression beider MHC-Klassen: Klasse I auf Endothelzellen und Fibroblasten, Klasse II auf Makrophagen. Daneben führt IFN- γ zu einer verstärkten Tumor-Nekrose-Faktor- (TNF-) und Lymphotoxin-(LT-) Aktivität.

6.4 Interleukine (IL)

Interleukine sind Antigen-unspezifisch wirksame Kommunikationssignale zwischen Leukozyten (daher der Name!), die zur Differenzierung und Proliferation von T-Lymphozyten einen großen Teil beitragen. Sie werden während der Immunantwort gebildet und wirken kurz und selbstlimitierend. Sie regulieren immunologische und entzündliche Reaktionen, wirken auf unterschiedliche Zellen und beeinflussen sich gegenseitig. Als interzelluläre Messenger fördern sie Aktivitäten, die auf die Eliminierung eingedrungener Parasiten und auf die Reparatur von zerstörtem Gewebe abzielen. Die wichtigsten Interleukine sind hier kurz beschrieben.

6.4.1 Interleukin-1

Es handelt sich um ein Aktivierungsprodukt von Makrophagen/Monozyten, dendritischen Zellen, NK-Zellen, Endothelzellen, Epithelzellen, Fibroblasten und Keratinozyten, *nicht* von Lymphozyten (2, S. 291).

Als ein endogenes Pyrogen mit proentzündlicher Aktivität bildet IL-1 ein essentielles Signal für T-Zell-abhängige Immunreaktionen- sezerniert von Makrophagen im Prozeß der Antigen-Präsentation, aber auch durch andere Stimuli (Phagozytose, Interferone, Lektine). IL-1 induziert die IL-2-Produktion und die Expression des IL-2-Rezeptors und fördert somit die Generierung von T-Helferzellen, jedoch auch die Differenzierung von B-Lymphozyten (80, S. 801). Es stimuliert das Wachstum von Fibroblasten, Synovialzellen und Endothelzellen sowie die Freisetzung von Prostaglandin E₂.

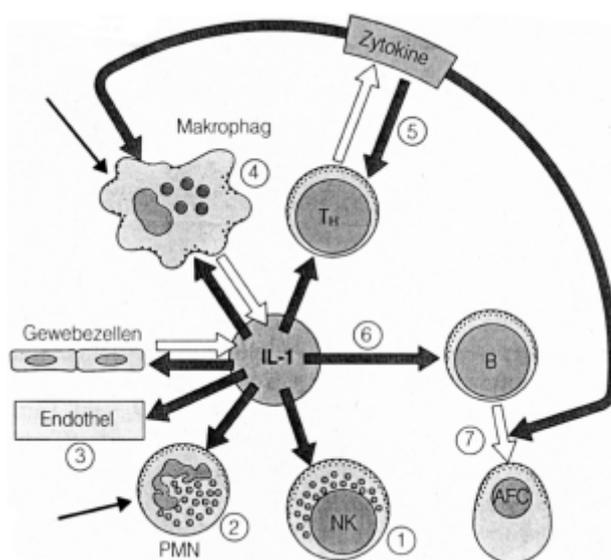


Abbildung 6: Wirkung von IL-1 auf Zellen des Immunsystems (Ivan M. Roitt)

- 1: NK-Zell-zytotoxische Aktivität steigt
- 2: PMN werden aktiviert und wandern zum Ort der IL-1-Produktion
- 3: im Endothel wird die Permeabilität erhöht
- 4: in Makrophagen steigen die PG-Produktion und die zytotoxische Aktivität
- 5: Th-Proliferation, IL-2-Rezeptor-Expression und Zytokinproduktion gefördert
- 6: B-Zell-Proliferation reguliert

6.4.2 Interleukin-2

Früher T-Cell Growth Factor (TCGF; 80, S. 764) genannt, wird IL-2 von aktivierten T-Zellen (hauptsächlich T-Helferzellen, weniger ZTL) als ein Proliferationssignal (d.h. ein Signal für den Übergang der Zellen aus der G₁-Phase in die S-Phase des Zellzyklus) sezerniert. Gleichzeitig erfolgt auch eine vermehrte Expression des Rezeptors für IL-2, eine Membranstruktur der aktivierten T-Lymphozyten, exprimiert nach Eintritt der T-Lymphozyten in die G₁-Phase des Zellzyklus. IL-2 fördert die weitere Aktivierung von T-Zellen, aber auch von B-Zellen (Antikörperproduktion), von NK-Zellen (IFN- γ -Produktion) und von Makrophagen (IL-1-Sekretion).

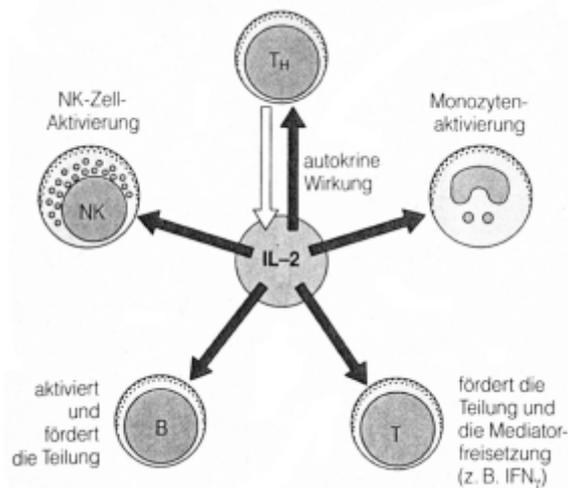


Abbildung 7: Wirkung von IL-2 (Ivan M. Roitt)

6.4.3 Interleukine-3 und -5

Sie werden von aktivierten Lymphozyten sezerniert, fördern die Differenzierung von B-Zellen und haben Anteil an der Entstehung einer Eosinophilie (80, S. 764).

6.4.4 Interleukin-4

Hier handelt es sich um einen Faktor, der vor allem von aktivierten CD4+T-Zellen, weniger von CD8+T-Zellen und Mastzellen gebildet wird. IL-4 fördert die B-Lymphozyten (Mediator der IgE-vermittelten allergischen Reaktion), ist ein kurzzeitiger Wachstumsfaktor für T-Helferzellen (fördert hier besonders Th2), für ZTL (Expression der Klasse I-MHC-Moleküle gefördert), für fötale Thymozyten, Mastzellen und für hämatopoetische Vorläuferzellen und hemmt die Aktivierung der Makrophagen (2, S. 290).

6.4.5 Interleukin-6

Makrophagen bzw. Monozyten, aber auch T-Lymphozyten, Fibroblasten, Endothelzellen und bestimmte Tumorzellen bilden dieses Interleukin; er wurde ursprünglich der „B-cell differentiation factor“ genannt. IL-6 ist ein Kostimulator für B-Lymphozyten (Sekretion von IgM steigt) und zytotoxische T-Lymphozyten. Auf Fibroblasten kommt es zu einer Erhöhung der Expression von Klasse I-MHC. Die Freisetzung von IL-1 und TNF aus Makrophagen wird gehemmt (2, S. 29 und 80, S. 802).

6.4.6 Interleukin-10

Dieses Interleukin entstammt T- und B-Lymphozyten, Makrophagen/Monozyten und Mastzellen. Es wirkt stimulierend auf die MHC Klasse II-Expression auf B-Lymphozyten, hemmend jedoch auf die MHC Klasse II-Expression auf Makrophagen (80, S. 778).

Durch die Hemmung der Zytokinproduktion von Th1, NK-Zellen und Makrophagen entsteht insgesamt eine eher immunsuppressive Wirkung.

6.4.7 Interleukin-12

Es handelt sich hier um ein Produkt der Makrophagen, das NK-Zellen aktiviert und T-Lymphozyten zu Proliferation und Differenzierung anregt. Es wirkt besonders stimulierend auf die Th1-Zell-Produktion und damit auch auf die IFN- γ -Produktion (2, S. 309).

6.5 Tumornekrosefaktor (TNF)

Der TNF ist ein Protein, das in bestimmten Tumoren starke hämorrhagische Nekrosen verursacht, ohne das Normalgewebe zu schädigen. Er wird von Makrophagen/Monozyten und T-Lymphozyten (besonders durch Th1, ZTL) gebildet und ist physiologisch beteiligt an der Blutgerinnung, aber auch an Entzündung, Fieber und Kachexie sowie als Mediator gegen gramnegative Bakterien (104, S. 196).

Über die Aktivierung der Phospholipase C, DAG und Proteinkinase C wird die Proliferation von T-Lymphozyten, die Expression von IL-2-Rezeptoren und die IFN- γ -Produktion gefördert.

6.6 Transforming Growth Factor (TGF)

Dieser Faktor wird von Makrophagen/Monozyten und T-Zellen freigesetzt und wirkt immunsuppressiv. Ursache ist die Hemmung der T-Zell-Proliferation, der NK-Zellen und der Makrophagen. Zusätzlich führt der TGF zu einer verminderten Ausschüttung von IL-1, IL-6 und TNF (2, S. 296).

II EIGENE FRAGESTELLUNG

Ausgangspunkt dieser Arbeit war die Frage, ob menschliche Lymphozyten durch Veränderung des externen Milieus beeinflussbar sind. Von großem Interesse war hier, ob und wie Substanzen, die bisher auf völlig anderen Gebieten als der Immunologie verwendet wurden, eine Auswirkung auf das menschliche Immunsystem haben könnten und was in den behandelten Zellen im Gegensatz zu den unbehandelten geschieht.

Dazu wurden zwei Testsysteme (MLC und CML in Modifikation) verwendet, die eine Aussage über die Aktivität und die summarische Vermehrung der gepoolten Lymphozyten zulassen, nicht jedoch Lymphozyten in ihren Subtypen getrennt voneinander messen.

III MATERIALIEN UND METHODEN

1 Medien, Zusätze und Reagenzien

1.1 Zellkulturmedium

Als Zellkulturmedium wurde RPMI 1640 (Firma PAA Laboratories GmbH, steril filtriert, 500 ml) verwendet, das L-Glutamin enthält und Endotoxin-getestet ist. Diesem Medium wurden 2,5 ml Pyruvat (Fa. Biochrom KG, geliefert als Natrium-Pyruvat, 100 ml), 2,5 ml L-Glutamin (ebenfalls Firma Biochrom KG, 100 ml) und 5 ml nicht-essentielle Aminosäuren (auch Firma Biochrom KG, 100 ml) sowie 10% FCS (s.u.) zugesetzt wurden. Das Medium wurde bei 4°C gelagert.

1.2 Fetales Kälberserum (FCS)

Fötale Kälberserum, auf Mykoplasmenfreiheit und gute Wachstumsbedingungen für Lymphozyten getestet, wurde von der Firma Biochrom KG bezogen. Vor Gebrauch wurde das bei -20°C gelagerte Serum 20 Minuten im Wasserbad bei 56°C hitzeinaktiviert, anschließend steril filtriert und dann bei 4°C aufbewahrt.

1.3 Phosphatgepufferte Salzlösung (PBS)

Phosphatgepufferte Salzlösung wurde von der Firma Biochrom KG bezogen. Als Zellwaschlösung verwendetem PBS- aufbewahrt bei 4°C- wurden 10% FCS zugefügt.

1.4 Lektine

Lektine sind Proteine pflanzlicher oder tierischer Herkunft, die mit bestimmten Zuckerstrukturen spezifisch reagieren. Daneben können sie Zellen agglutinieren und zum Wachstum stimulieren, d.h. sie agieren als sogenannte Mitogene (58, S. 301).

Bei den hier verwendeten Lektinen handelt es sich um Concanavalin A und Phytohämagglutinin, die selektive T-Zell-Mitogene sind. Sie binden TZR-Ketten und fördern so die Expression des T-Zell-Rezeptors. Daneben können sie polyklonal aktivierte ZTL innerhalb von 24 Stunden generieren, was auch als „lectin-dependent cellular cytotoxicity“ (LDCC) beschrieben ist. Mitogene Lektine senden zwei Signale aus: die lektin-induzierte Aktivierung und die ZTL-Zielzellen-Konjugation, d.h. eine Behandlung der Zielzellen mit Lektinen führt zu einer effektiven Zielzell-Lyse durch ZTL.

1.4.1 Concanavalin A (Con A)

Con A ist ein Lektin, das der Schwertbohne *Canavalia ensiformis* entstammt. Es handelt sich um ein globuläres Protein, das im Gegensatz zu anderen Lektinen keine Kohlehydrate enthält. Verwendet wird Con A bei der Reinigung von Immunglobulinen, von Blutgruppensubstanzen, von Enzymen und Hormonen. Als Mitogen wirkt Con A stimulierend auf Lymphozyten, dabei besonders auf T-Suppressorzellen. Die weitere Wirkung ist eine Steigerung der IgM-Synthese sowie auch- eher unerwünscht- die Stimulation der Migration von Tumorzellen.

Con A wurde von der Firma SIGMA als 170 mg-Pulver (Typ III Con A) bezogen und bei 4°C aufbewahrt. Um auf die verwendete Konzentration von 10µg Con A pro Milliliter zu kommen, wurde 1 mg Con A abgewogen und in 10 ml RPMI-Medium aufgelöst. Diese Lösung wurde mittels eines sterilen Spritzenstempels durch ein steriles Sieb gedrückt. Anschließend wurden 5 ml dieses sterilen Filtrates in 45 ml Medium gegeben, um der vorgeschriebenen Konzentration zu entsprechen.

1.4.2 Phytohämagglutinin (PHA)

PHA ist ein globulinähnlicher, aus Pflanzen extrahierbarer Eiweißkörper. Es entstammt der Gartenbohne *Phaseolus vulgaris*, wirkt als Lektin agglutinierend und als Phytomitogen besonders für T-Lymphozyten Mitose-stimulierend (8, S. 507). Von Hingford und Nowell wurde die blastoide Transformation kleiner Lymphozyten bereits 1959 bzw. 1960 nachgewiesen.

PHA wurde von der Firma SIGMA als 25 mg-Pulver bezogen. Die in den Versuchen verwendete Konzentration war 1µg/ml; um diese zu erreichen, wurde 1 mg PHA abgewogen und in 10 ml RPMI-Medium gelöst. Nach steriler Filtration dieser neugewonnenen Lösung wurden 0,5 ml daraus in 50 ml Medium gegeben, was eine Konzentration von 1µg/ml zur Folge hatte.

1.5 Mitomycin C

Mitomycin C wurde für die MLC-Testreihe verwendet. Es handelt sich um ein Zytostatikum aus der Gruppe der Antibiotika und wird aus *Streptomyces caespitosus* gewonnen. Durch intrazelluläre Reduktasen aktiviert, hemmt es die DNS-Synthese über DNS-Quervernetzungen (dadurch Verhinderung der Trennung während der Replikation). Es wirkt besonders in der späten G1-Phase und der frühen S-Phase des Zellzyklus. Im MLC-

Versuch wird Mitomycin C bei 37°C mit der Zellsuspension für 20 Minuten inkubiert, was für die Zellen zur Folge hat, daß sie nicht mehr auf Stimuli reagieren können, wohl aber selber die unbehandelten Lymphozytenpopulation stimulieren.

Mitomycin C wurde von der Firma SIGMA als 2 mg-Pulver bezogen. Um eine gewünschte Konzentration von 0,44 mg/ml zu erreichen, wurde dieses Pulver in 4,5 ml destilliertem Wasser gelöst und dann bei 4°C aufbewahrt.

Von dieser Mitomycin C-Lösung wurden jeweils 100 µl mit 1 ml Zellsuspension für 20 Minuten im Brutschrank (37°C, 5% CO₂, 95% O₂, 100% Luftfeuchtigkeit) inkubiert und die Zellsuspension anschließend dreimal mit RPMI 1640 ausgewaschen.

2 **Verwendete Testsubstanzen**

2.1 **β-Adrenozeptor-Blocker Propranolol**

2.1.1 **Pharmakologische Daten**

Es handelt sich hier um eine Substanz, die unselektiv β₁- und β₂-Rezeptoren für Katecholamine blockiert und keine intrinsische Aktivität besitzt, also ein reiner Antagonist ist. Die Wirkung von β-Sympathomimetika und β-sympathomimetische Wirkungen endogener Katecholamine an allen Organen mit adrenergen Betarezeptoren wird demnach gehemmt. Propranolol ist der älteste klinisch gebrauchte β-Blocker und gehört zu den Phenoxypropanolaminen. Es wird aufgrund seiner ausgeprägten Lipophilie komplett metabolisiert (daher bei Leberinsuffizienz verzögerte Elimination), hat eine Plasma-Eiweiß-Bindung von 95% und eine Bioverfügbarkeit von 35%.

2.1.2 **Molekulare Wirkung**

β-Rezeptoren werden durch Transmitter erregt, was eine Bindung der sogenannten G-(guaninnucleotidbindend) Proteine an diese Rezeptoren zur Folge hat; die G-Proteine besitzen drei Untereinheiten (α, β und γ). An G-Proteine gebundenes GDP wird durch die Aktivierung in GTP getauscht, die G-Proteine zerfallen in eine α-Untereinheit und eine β/γ-Untereinheit. Die α-Untereinheit bindet nun an das membranständige Enzym Adenylatzyklase (AC); anschließend kommt es zur Reassoziierung der α-Untereinheit mit β und γ.

Die AC katalysiert die Umwandlung von ATP zu cAMP, wodurch die Proteinkinase C aktiviert wird, und es kommt zu einer Reihe von Phosphorylierungen mit der letztendlichen Folge des Kalziumeinstromes in die Zelle, was zum Anstieg der zytosolischen Ca²⁺-Konzentration führt. Die Konsequenz ist eine positiv chronotrope, inotrope und dromotrope Wirkung am Herzen.

Diese Kaskade wird durch β-Blocker gehemmt, was die nachfolgenden therapeutischen Konsequenzen hat.

2.1.3 **Anwendung und unerwünschte Wirkungen**

Propranolol wirkt antiarrhythmisch durch Blockade der durch Ca²⁺-vermittelten arrhythmogenen Katecholaminwirkung (als Klasse II-Antiarrhythmikum der Vaughn-Williams-Klassifikation) und wird daher bei ventrikulären Tachykardien eingesetzt. In hohen Konzentrationen kann es sogar spannungsabhängige Natrium-Kanäle blockieren. Desweiteren wirkt dieser β-Blocker über die oben beschriebenen Mechanismen negativ chronotrop, inotrop und dromotrop, antianginös an den Koronargefäßen, antihypertensiv (Abnahme des HZV über Senkung der Herzfrequenz und -kontraktilität, Verminderung der Reninsekretion der Niere, Senkung der Aktionspotentialfrequenz im Sympathikus), beim hyperkinetischen Herzsyndrom, bei Angststörungen, bei Hyperthyreose (Dejodierung gehemmt) und als Migräneprophylaxe.

Unerwünschte Wirkungen der β-Blocker allgemein sind Bradykardie, AV-Block, Verstärkung einer bestehenden Herzinsuffizienz, Kältegefühl und Ischämie in den Extremitäten, Bronchokonstriktion, Müdigkeit und in seltenen Fällen Thrombozytopenien, Purpura und Ohrensausen.

Für die Testreihen wurde Propranolol-Hydrochlorid als 100 mg-Pulver von der Firma SIGMA bezogen. Dieses wurde abgewogen, in RPMI 1640-Medium gelöst und steril filtriert. Die erwünschte Konzentration wurde nach der Formel

$$\text{FW der Substanz} \cdot \text{Volumen des Mediums für die Verdünnung} \cdot \text{erwünschte Konzentration}$$

errechnet. FW von Propranolol beträgt 295,8. Verwendet wurden die Konzentrationen 10⁻⁵ M, 10⁻⁷ M, 10⁻¹⁰ M und 10⁻¹² M.

2.2 Kalzium-Kanal-Blocker

2.2.1 Molekulare Wirkungen

Inzwischen sind vier Typen von Ca^{2+} -Kanälen genauer erforscht: L-, N-, P- und T-Typ. Kalzium-Blocker binden an verschiedene Domänen des L-Typs, der die größte Einzelkanalleitfähigkeit der spannungsabhängigen Kalzium-Kanäle besitzt. Es sind drei Zustände der Kalzium-Kanäle beschrieben: Ruhe R, offen O und inaktiv I. Ca^{2+} -Antagonisten vom Dihydropyridin-Typ (s.u.) binden mit hoher Affinität an den inaktiven (geschlossenen!) Kanal, während Kalzium-Antagonisten vom Benzothiazepin-Typ (s.u.) sowohl an O- wie auch an I-Stadien der Kanäle binden können.

2.2.2 Allgemeine Anwendung

Kalzium-Kanal-Blocker führen über Hemmung des Kalziueinstromes aus dem Extrazellulärraum während des Aktionspotentials an Herz und glatter Muskulatur zur Dilatation größerer Koronargefäße, zur Beseitigung von Gefäßspasmen, zur Senkung der Wandspannung, zur Verlängerung der Diastole, zur Senkung der Kontraktilität und der Herzfrequenz, sie wirken aber auch antiarrhythmisch (Klasse IV nach Vaughn-Williams).

2.2.3 Nifedipin

Hier handelt es sich um einen Kalzium-Kanal-Blocker vom Dihydropyridin-Typ, Gruppe II der WHO-Klassifikation. Nifedipin ist der stärkste Vasodilatator der Ca^{2+} -Antagonisten, wirkt glattnuskulär erschlaffend (Arterien und Arteriolen) und dilatierend. Diese Substanz wird daher eingesetzt, um akute Angina pectoris-Anfälle zu kupieren, aber auch gegen vasospastische und Raynaud-Anfälle, hypertensive Krisen und Ösophagusspasmen.

Als Nebenwirkungen sind Schwindel, Kopfschmerzen, Knöchelödeme, Flush, Müdigkeit, Purpura, Dermatitisen und in seltenen Fällen eine Agranulozytose festgestellt worden.

2.2.4 Nicardipin

Aus derselben Gruppe (WHO Gruppe II) wie Nifedipin stammend gilt Nicardipin als ein Kalzium-Kanal-Blocker der zweiten Generation und hat eine größere Affinität zu Kalzium-Kanälen der glatten Muskulatur als zu denen des Myokards. Es wirkt zusätzlich auch als Antianginosum sowie bei chronisch stabilen AP-Beschwerden und hat als weitere Nebenwirkungen Benommenheit, Muskelschwäche sowie Erbrechen und Obstipation.

2.2.5 Diltiazem

Dieser Kalzium-Kanal-Blocker stammt aus der Gruppe der Benzothiazepine (Gruppe III der WHO-Klassifikation) und wirkt negativ chronotrop, inotrop, dromotrop, antihypertensiv sowie antiarrhythmisch bei supraventrikulärer Tachykardie, bei Vorhofflattern und Vorhofflimmern, dazu antianginös u.a. bei der Prinzmetal-Angina pectoris.

Als Nebenwirkungen wurden hier beobachtet: Eosinophilie, Schwäche, Erbrechen, Lymphadenopathie.

2.2.6 Cinnarizin

Cinnarizin zählt zu den sogenannten unselektiven Kalzium-Kanal-Blockern (Gruppe IV der WHO-Klassifikation), ist aber eigentlich ein Antihistaminikum aus der Piperazingruppe. Es gilt als ein Arzneimittel mit einem klinischen Stellenwert, der noch umstritten ist. Experimentell wurde eine Hemmung der Kalzium-induzierten Gefäßkontraktion festgestellt, so dass Cinnarizin seine Anwendung bei zerebraler Mangeldurchblutung, bei peripheren Durchblutungsstörungen und bei vestibulären Beschwerden gefunden hat (75, S. 535). Neuere Forschungen ergaben, daß Cinnarizin auch ein sogenannter Kalzium-Überladungsblocker ist, der die bei Sauerstoffmangel auftretende Kalziumüberladung der Zelle hemmen soll.

Alle vier Ca^{2+} -Kanal-Blocker wurden von der Firma SIGMA bezogen und nach demselben Verfahren wie Propranolol abgewogen, steril filtriert und auf verschiedene Konzentrationen eingestellt. FW von Nifedipin (1 g-Pulver, lichtgeschützt aufbewahrt) beträgt 346,3, von Nicardipin (geliefert als 1 g-Pulver, lichtgeschützt aufbewahrt) 516,0, von Diltiazem (1g-Pulver) 451,0 und von Cinnarizin (10g-Pulver) 368,5.

2.3 Organische Nitrate

Diese Substanzen haben ihre Hauptwirkung in der Erschlaffung der glatten Muskulatur. Das beruht auf der durch G-Proteine vermittelten Aktivierung der zytoplasmatischen Guanylatzyklase (GC) durch S-Nitrosothiole. Die instabilen S-Nitrosothiole entstehen durch reduktive Abspaltung von NO aus Nitraten, welches sich mit SH-Gruppen verbindet. Durch die Katalyse von GC entstandenes cGMP aktiviert die membrangebundene Phosphokinase G, wodurch die in der Membran gelegene ATPase nach Phosphorylierung aktiviert wird. Die Folge ist, daß Kalzium aus dem Zellinneren nach außen gepumpt wird, die zytosolische Kalziumkonzentration sinkt und somit eine Erschlaffung der glatten Muskulatur einsetzt. NO stimuliert auch die GC in Thrombozyten, wodurch die Aggregation und Adhäsion dieser Zellen gehemmt wird. Makrophagen können ebenfalls durch bestimmte Zytokine zur Expression von NO-Synthase stimuliert werden, was einen Teil ihrer Zytotoxizität ausmacht (65, S. 228).

Organische Nitroverbindungen werden hepatisch metabolisiert, aber auch in Erythrozyten über Glutathion denitriert und als Mono- oder Dinitrate über die Niere eliminiert. Die Bioverfügbarkeit schwankt stark wegen des großen „first pass“-Effektes.

Ein großes Problem bei der Therapie mit Nitraten ergibt sich aus der beobachteten Toleranzentwicklung, die ihre Ursache in der raschen Erschöpfung im Gehalt an zytosolischen SH-Gruppen hat. Deshalb hat es sich als sinnvoll erwiesen, regelmäßige Pausen in der Therapie einzulegen.

2.3.1 ISDN (Isosorbiddinitrat)

ISDN ist ein Nitrat, für das die oben genannten Wirkungen gelten. Es erweitert die großen Koronargefäße, aber auch die venösen Kapazitätsgefäße und ist daher als Vorlastsenker geeignet für die Kupierung eines AP-Anfalles, für die Therapie der akuten und chronischen Herzinsuffizienz, des Lungenödems, aber auch als Anfallsprophylaxe. Die Wirkung tritt nach etwa 5 Minuten ein und hält ca. 1-2 Stunden an. ISDN wird in der Leber zu IS-5-Mononitrat und IS-2-Mononitrat abgebaut.

Als unerwünschte Wirkungen wurden Kopfschmerzen, Schwindel und manchmal eine Methämoglobin-Bildung beobachtet.

2.3.2 Molsidomin

Molsidomin ist ein NO-Donator, der für eher die Intervalltherapie geeignet ist. In der Leber wird der Metabolit Linsidomin (SIN-1) gebildet; dieser zerfällt in das labile N-Nitrosoaminoacetonitril (SIN-1A). SIN-1A setzt ohne Vermittlung von SH-Gruppen NO frei, welches nicht-enzymatisch metabolisiert wird. Aus diesem Grund wird bei der Therapie mit Molsidomin keine Toleranz beobachtet.

Molsidomin besitzt wenig Selektivität für den venösen Teil der Zirkulation; da es die kardiale Nachlast senkt, wird es für die Angina pectoris-Behandlung bei gleichzeitiger Linksherzinsuffizienz angewendet. Es hemmt außerdem die Thrombozytenaggregation.

Die beiden in den Versuchen verwendeten Nitro-Verbindungen wurden von der Firma SIGMA bezogen (ISDN als 1mg-Pulver, FW 622,8, Molsidomin 1 mg-Pulver, FW 242,2), wie Propranolol abgewogen, in RPMI 1640-Medium gelöst, steril filtriert und auf die gewünschten Konzentrationen mit Hilfe der oben beschriebenen Formel eingestellt.

3 Zellgewinnung

3.1 Abtrennung von Lymphozyten aus dem Vollblut

Die verwendeten Vollblutproben wurden aus dem Chirurgischen Blutlabor des Klinikums Rechts der Isar als buffy-coats bezogen.

Um die gewünschten Lymphozyten aus dem Vollblut zu gewinnen, wurde das ACCUSPIN™ SYSTEM-HISTOPAQUE^R-1077 (Firma SIGMA) verwendet. Dieses System basiert auf einem Verfahren, das erstmals im Jahre 1968 beschrieben wurde. Das Trennmedium HISTOPAQUE^R-1077 (aseptisch abgefüllt) ist eine wässrige Lösung aus einem Polysaccharid mit hohem Molekulargewicht und Natriumdiatrizoat, einer nichtionogenen Jodverbindung.

Die ACCUSPIN™-Röhrchen sind mit zwei Kammern versehen, die durch eine poröse Trennschicht („Fritte“) aus Niederdruckpolyethylen gegeneinander abgegrenzt werden. Die untere Kammer enthält HISTOPAQUE^R-1077, das die Zugabe von Vollblut mit Gerinnungshemmer ermöglicht, ohne daß sich das Blut mit dem Trennmedium mischt. Beim Zentrifugieren tritt das Blut durch die „Fritte“ und kommt so mit HISTOPAQUE^R-1077 in Kontakt.

Jene Zellelemente mit höherer Dichte verdrängen eine bestimmte Menge HISTOPAQUE^R-1077 in den Bereich über der „Fritte“, wodurch eine klare Trennung der Blutkomponenten erfolgt. Es kommt zu einem Anhäufen der Erythrozyten und einer leichten Erhöhung des osmotischen Druckes der Granulozyten. Dadurch steigt ihre Sedimentationsgeschwindigkeit, und sie setzen sich schließlich in Form von Pellets am Boden des ACCUSPIN™-Röhrchens ab. Lymphozyten und andere mononukleäre Zellen, d.h. Monozyten, verbleiben in der Plasma-HISTOPAQUE^R-1077-Interphase. Diese dichte Schicht mononukleärer Zellen kann nun mit Hilfe einer Pipette entnommen werden. Eine Erythrozytenkontamination wird aufgrund der Trennschicht zwischen den beiden Kammern vermieden. 3,0 bis 6,0 ml frisches Vollblut wird in die obere Kammer des bereits gefüllten ACCUSPIN™SYSTEM HISTOPAQUE^R-1077-Röhrchens gegeben. Diese werden 15 Minuten bei 800 x g unter Beibehaltung von 18-26°C zentrifugiert. Nach dem Zentrifugieren wird die Plasmaschicht bis einschließlich 0,5 cm der undurchsichtigen Interphase (mononukleäre Zellen) mit einer Pasteurpipette abpipettiert und verworfen. Die mononukleäre Schicht wird nun mit einer weiteren Pasteurpipette vorsichtig entnommen und in ein sauberes Zentrifugenröhrchen gegeben. Diese Schicht wird mit PBS ausgewaschen, und die Zellen werden anschließend durch vorsichtiges Aspirieren mit einer Pipette resuspendiert. Nun erfolgt eine erneute Zentrifugation bei 250 x g. Der letzte Schritt wird zweimal wiederholt, der Bodensatz dabei jeweils mit 5 ml PBS resuspendiert. Nach der letzten Zentrifugation erfolgt die Resuspension mit dem Zellmedium RPMI 1640. Nach Anfärben der Zellen mit Trypan-Blau, wobei 50 µl Zellsuspension mit 50 µl Farbstoff zu

vermischen sind, werden sie mit Hilfe von Neubauer-Zählkammern auf Objektträgern unter dem Mikroskop gezählt. Um eine ausreichende Anzahl von Lymphozyten zu erhalten, sollte die Zellzahl zwischen $1,0$ und $2,0 \times 10^7$ Zellen/ml betragen.

3.2 Einfrieren der Lymphozyten

Nach Herstellung der Lymphozytensuspensionen wird ein großer Teil der Zellen als Vorrat eingefroren. Dazu muß eine Gefrierlösung hergestellt werden. Diese besteht aus 40 ml FCS, 12,5 ml DMSO und 10 ml RPMI 1640. Diese Lösung und die Lymphozytensuspension werden 1 ml : 1 ml in kleine Eppendorf-Gefäße gegeben und bei -20°C im Gefrierschrank aufgehoben.

DMSO bedeutet Dimethylsulfoxid und wurde als 500ml-Lösung von der Firma Merck^R bezogen.

3.3 Auftauen der Zellsuspensionen

Um mit den Lymphozytensuspensionen arbeiten zu können, müssen diese vorher aufgetaut werden. Die kleinen Gefäße werden aus dem Gefrierschrank genommen und mit Körperwärme (in den Händen) aufgetaut. Ist der Inhalt wieder flüssig, wird die Zellsuspension in Zentrifugenröhrchen (Firma Falcon^R) gegeben und mit 30 ml RPMI-Medium aufgefüllt. Dieser Schritt muß möglichst schnell gehen, da die Gefrierlösung für aufgetaute mononukleäre Zellen toxisch ist!

Es folgt eine Zentrifugation nach Programm 17 der Hettich-Zentrifuge ($400 \times g$, Bremse 5, 5 Minuten lang). Anschließend wird die Zell-Lösung bis kurz über der sichtbaren Zellschicht abgesaugt; die Zellen werden erneut in 30 ml Medium mit Hilfe einer Transfer-Pipette resuspendiert und ein weiteres Mal zentrifugiert. Dieser Vorgang wird noch zweimal wiederholt, dann folgt die Zählung der Zellen mittels Neubauer-Zählkammer (Firma Marienfeld), wobei 100 gezählte Zellen einer Konzentration von $2,0 \times 10^6$ Zellen entsprechen. Diese auf die erforderliche Anzahl eingestellten Zellen können jetzt in die Versuche eingebaut werden.

4 Testverfahren

Es wurden zwei verschiedene Tests verwendet und diese jeweils parallel angesetzt. Die Messung der Ergebnisse erfolgte mit dem ELISA-Test.

4.1 ELISA (enzyme-linked immunosorbent assay)

Methoden zum Nachweis von Antigenen und Antikörpern unter der Verwendung radioaktiver Marker können ersetzt werden durch Methoden, bei denen man statt der Isotope bestimmte Enzyme verwendet. Obwohl es sich jetzt bei dem Marker um ein vollständiges Protein handelt, ist das Funktionsprinzip sehr ähnlich. Man koppelt den jeweils unmarkierten Partner der Antigen-Antikörper-Reaktion an einen festen Träger. Der Enzymmarker wird entweder mit dem löslichen Reaktionspartner oder einem zweiten Antikörper verbunden. Zu den häufig eingesetzten Enzymen gehören die β -Galaktosidase, die alkalische Phosphatase und die Meerrettich-Peroxidase. Die Konzentration des in den Immunkomplex eingebundenen Enzyms ergibt sich aus der Menge seines Substrates. Weiterhin kann man noch einen Indikator einschalten, der seine Farbe ändert, wenn das Enzym mit dem Substrat reagiert. Dafür verwendet man besondere Kombinationen aus Enzym, Substrat und Indikator, die durch einen leicht zu messenden Farbumschlag charakterisiert sind.

Der ELISA-Test ist die bekannteste und weitverbreiteste derartige Nachweismethode. Dabei kann man das Enzym entweder an die Antigenmoleküle oder an die Antikörper koppeln (58, S. 321).

In beiden Fällen ist das mit dem Träger verbundene Reagens nicht markiert. Aus solchen ELISA-Tests kann man auf zwei Arten quantitative Aussagen gewinnen: indem man erstens freies Antigen oder einen Antikörper mit dem enzymgebundenen Antigen oder Antikörper um die Bindungsstellen des an den festen Träger gekoppelten Reaktionspartners konkurrieren läßt oder zweitens die zu bestimmende, mit dem festen Träger verbundene Probe nacheinander mit dem enzymbeladenden Antiserum versetzt, so daß ein Farbumschlag eintritt.

Die Vorzüge dieser ELISA-Tests liegen in ihrer hohen Sensitivität, ihrer einfachen Technik, der relativ hohen Versuchsgeschwindigkeit und der Verwendbarkeit der im Vergleich zu den Isotopen preiswerteren, stabileren und vor allem nicht mit Strahlenrisiken aufwartenden Enzyme.

4.2 Die gemischte Lymphozytenkultur- **MLC** (mixed lymphocyte culture) bzw. **MLR** (mixed lymphocyte reaction)

4.2.1 Der MLC-Ansatz allgemein

Bei dem von Bach und Hirschhorn 1964 eingeführten Test MLC handelt es sich um ein in vitro-Modell der Erkennung fremder MHC-Genprodukte durch T-Lymphozyten, das seine Anwendung bei der Identifizierung neuer HLA-Klasse II-Allele und -Loci, aber auch bei Tests für Transplantationen zwischen Spender und Empfänger gefunden hat (5, S. 315 sowie 61, S. 693 und 109, S. 332).

Basis ist die Kokultivierung zweier Lymphozytensuspensionen, die auf zwei verschiedene Arten durchgeführt werden kann:

1) Zweiweg-Kokultivierung: Hier werden zwei Lymphozytensuspensionen (Spender und Empfänger) unbehandelt gemischt; sie stimulieren sich gegenseitig und reagieren beide mit Erhöhung der Protein-, RNS- und DNS-Synthese und der Vergrößerung zu Lymphoblasten (= Blastentransformation).

2) Einweg-Kokultivierung: Hier ist die Lymphozytensuspension der Person B vorbehandelt durch Röntgen-Bestrahlung oder durch Mitomycin C inaktiviert. Dieses Zytostatikum aus der Reihe der Antibiotika bewirkt, daß die Lymphozyten der Person B den Zellzyklus nur bis zur S-Phase durchlaufen und sich nicht mehr teilen können. Auf diese Weise inaktiviert wirken sie als Stimulatorzellen für die unbehandelten Zellen der Person A. Die Aktivierung der einen (one-way) oder beider Zellpopulationen wird normalerweise gemessen durch den Einbau von ^3H -Thymidin in neusynthetisierte DNS als proliferative Antwort = allogener MLC (2, S. 410 sowie 113, S. 130).

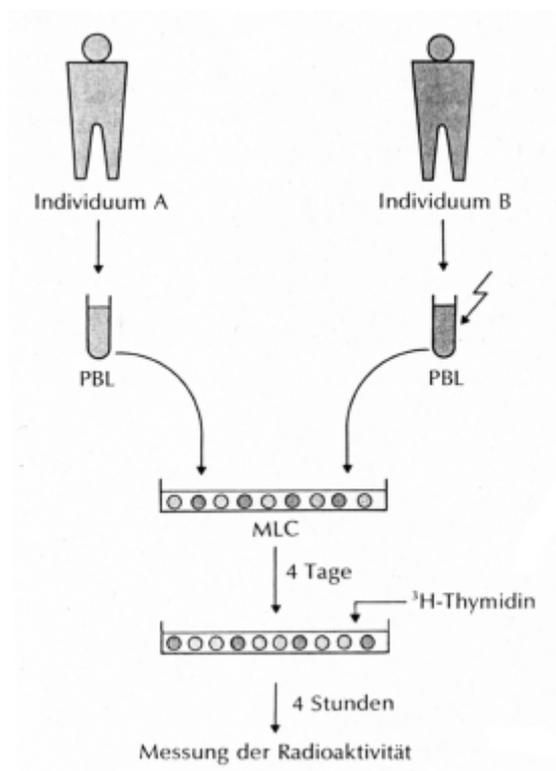


Abbildung 8: Die Messung der gemischten Lymphozytenkultur (Jan Klein)

Da in diesen Versuchsreihen nicht mit Radioaktivität gearbeitet wurde, kam stattdessen der WST-1-Proliferationstest (s.u.) zum Einsatz.

4.2.2 Der MLC-Ansatz im Labor

Tag 0 des Versuchsansatzes: Es werden Proben einer Person A aufgetaut und auf eine Zellzahl von $2,0 \times 10^6$ Zellen/ml eingestellt. Mit Hilfe der Waage werden 1 mg Con A (für eine Konzentration von $10\mu\text{g/ml}$), 1 mg PHA (für eine Konzentration von $1\mu\text{g/ml}$) und die erforderlichen Testsubstanzen nach der oben beschriebenen Formel abgewogen und als gebrauchsfertige Lösungen (in RPMI 1640) hergestellt. In die Vertiefungen („wells“) einer 24-well-Kulturplatte (Firma costar corporation, mit Abdeckplatte, Gewebekultur-behandelt, steril, nicht-pyrogen) wird nun je 1,0 ml der Zellsuspension mit 2×10^6 Zellen/ml von der Person A pipettiert (=Responderzellen). Hierzu wird ein weiterer Milliliter gegeben, der sich unterschiedlich zusammensetzt: 0,5 ml Con A- oder PHA-Lösung, für den Referenzwert RPMI 1640-Medium, dazu 0,5 ml Testsubstanzlösung in unterschiedlicher Kombination und Konzentration, für den Referenzwert 0,5 ml RPMI 1640-Medium. Dieses Gemisch wird nun in der 24-well-Kulturplatte im Inkubator (37°C , 5% CO_2 : 95% Luftgemisch, Luftfeuchtigkeit 100%) für 48 Stunden koinkubiert.

Am Tag 2 des Versuchsansatzes werden die Zellsuspensionen aus den wells in Zentrifugenröhrchen pipettiert, mit RPMI 1640 dreimal ausgewaschen (Zentrifuge Programm 17: $400 \times g$, Bremse 5, für 5 Minuten) und nun auf die Zellzahl $1,0 \times 10^6$ Zellen/ml eingestellt. Zusätzlich werden an diesem Tag Zellen der Person B aufgetaut und auf eine Zellzahl von $2,0 \times 10^6$ Zellen/ml eingestellt. Diese Zellsuspension wird anschließend für 20 Minuten im Brutschrank (37°C , 5% CO_2 : 95% Luft-Gemisch, 100% Luftfeuchtigkeit) mit Mitomycin C (je $100\mu\text{l}$ Mitomycin und 1,0 ml Zellsuspension der Person B) inaktiviert und danach dreimal ausgewaschen. Es erfolgt eine erneute Zählung der Zellen der Person B unter dem Mikroskop mit Einstellung auf $1,0 \times 10^6$ Zellen/ml.

Nun wird eine 96-well-Platte (Mikrotiterplatte der Firma Greiner Labortechnik, mit Abdeckplatte, steril, Gewebekultur-behandelt, nicht-pyrogen) mit den fertigen Zellsuspensionen gefüllt: In je drei Parallelen wird die Zellsuspension A (100µl) mit der Zellsuspension B (100µl) gemischt. Dabei gibt es unterschiedliche Kombinationen: Zellen der Person A mit bzw. ohne Lektine, sowie mit bzw. ohne Testsubstanzen, jeweils 1:1 vermischt mit Zellen der Person B, aber auch als weitere Referenzwerte Zellen der Person A (100µl) nur mit Medium (100µl) und Zellen der Person B (100µl) mit 100µl Medium. Diese so beschickte 96-well-Platte wird in den Brutschrank gegeben; es erfolgt eine fünftägige Inkubation der Zellgemische.

Wichtig ist, daß die Wassersättigung im Inkubator in regelmäßigen Abständen kontrolliert wird, damit das Milieu für die Bebrütung während der Inkubationszeit optimal bleibt!

4.2.3 Messung des MLC-Ansatzes

Nach fünftägiger Inkubation erfolgt die Messung des MLC-Ansatzes mit Hilfe des WST-1-Proliferationstestes. Hierbei handelt es sich um eine nicht-radioaktive, kolorimetrische Alternative zur ^3H -Thymidin-Messung, die auf der Spaltung des Tetrazoliumsalses WST-1 durch die mitochondriale Succinat-Tetrazolium-Reduktase in Formazan (Farbumschlag von hellrot zu dunkelrot) beruht. Verwendet wurde der WST-1-Test der Firma Boehringer Mannheim, der als fertige Lösung geliefert und einfach in kleine Portionen unterteilt werden kann. Die beste Lagerung ist lichtgeschützt auf trockenem Eis bei einer Temperatur von -20°C .

Von dieser Reagenz werden nun jeweils 20µl pro Vertiefung in die 96-well-Platte pipettiert, wobei noch ein sogenannter „blank“-Wert, d.h. eine Hintergrundkontrolle ohne Zellen (nur RPMI 1640-Medium), hinzugefügt wird. Die Mikrotiter-Platte wird nun ein weiteres Mal inkubiert (37°C , 5% CO_2 , 100% Luftfeuchtigkeit), dieses Mal für zwei Stunden.

Anschließend erfolgt die Aktivitätsmessung im ELISA-Test bei einer Wellenlänge von 450 nm und einer Referenzwellenlänge von über 600 nm. Nach Erhalten des Ausdruckes und Speicherung der Messung im angeschlossenen Computer (Apple Power Macintosh) kann die Kulturplatte fachgerecht entsorgt werden.

4.2.4 Die durchgeführten Versuche im Einzelnen

4.2.4.1 MLC mit Testsubstanzen, **ohne** Lektine

4.2.4.1.1 *Vergleich zweier Testsubstanzen*

4.2.4.1.1.1 Propranolol und Molsidomin

Die Zellen der Person A werden am Tag 0 des Versuchsansatzes wie oben beschrieben aufgetaut und auf eine Konzentration von $2,0 \times 10^6$ Zellen/ml eingestellt. Die Testsubstanz Propranolol wird abgewogen und mit Hilfe der oben angegebenen Formel durch Verdünnung im Medium auf eine Konzentration von 10^{-7} M gebracht. Genauso wird mit der zweiten Testsubstanz Molsidomin verfahren. Nun wird ein Teil der Zellsuspension der Person A mit Propranolol, ein Teil mit Molsidomin und ein Teil ohne Testsubstanzen im Brutschrank für 48 Stunden inkubiert.

Am Tag 2 des Versuchsansatzes werden Zellen einer Person B aufgetaut, ebenfalls auf eine Konzentration von $2,0 \times 10^6$ Zellen/ml eingestellt, nach dem oben beschriebenen Verfahren mit Mitomycin C inaktiviert und anschließend auf eine Zahl von $1,0 \times 10^6$ Zellen/ml gebracht. Am selben Tag werden die inkubierten Zellen der Person A dreimal mit RPMI 1640 ausgewaschen und wie die Zellen der Person B auf eine Zahl von $1,0 \times 10^6$ Zellen/ml eingestellt. Die beiden Zellsuspensionen werden nun in einer 96-well-Kulturplatte für fünf Tage koinkubiert; an Tag 5 folgt die Beschickung der 96-well-Platte mit WST-1 und die Proliferationsmessung mit dem ELISA-Test.

4.2.4.1.1.2 ISDN und Cinnarizin

Das Verfahren ist hier genauso wie unter 4.2.4.1.1.1. beschrieben; Unterschiede bestehen in der Auswahl der zu vergleichenden Substanzen (hier ISDN und Cinnarizin) sowie in der Konzentration- hier 10^{-12} M.

4.2.4.1.1.3 Propranolol, ISDN, Molsidomin und Cinnarizin in einem Testansatz

Dieses Mal werden vier Einzelsubstanzen in zwei unterschiedlichen Konzentrationen (10^{-7} M, 10^{-12} M) in ihrer Wirkung auf PBL (periphere Blut-Lymphozyten) miteinander verglichen.

4.2.4.1.2 *Vergleich von **Zweier**-Kombinationen der Testsubstanzen*

4.2.4.1.2.1 Nicardipin/Propranolol in drei Konzentrationen (10^{-7} M, 10^{-10} M und 10^{-12} M)

Die Testsubstanzen werden wieder abgewogen und auf eine gemeinsame Konzentration eingestellt, d.h. die Zweier-Kombination der Testsubstanzen hat nun eine Konzentration von 10^{-7} M, 10^{-10} M bzw. 10^{-12} M. Die Koinkubation mit Zellen der Person A, die anschließende Gabe zu Zellen der Person B, die gemeinsame Inkubation der Zellsuspensionen und die Messung verlaufen nach dem vorgegebenen Schema.

4.2.4.1.2.2 Nifedipin/Propranolol in drei Konzentrationen (10^{-7} M, 10^{-10} M und 10^{-12} M)

Siehe unter 4.2.4.1.2.1., hier Nicardipin gegen Nifedipin ausgetauscht.

4.2.4.1.2.3 Nicardipin/Nifedipin, Nicardipin/Propranolol und Nifedipin/Propranolol im Vergleich

Die Testsubstanzen werden abgewogen und durch Verdünnung im RPMI-Medium auf eine Konzentration der Substanz-Kombination von 10^{-7} M bzw. 10^{-12} M eingestellt.

4.2.4.1.2.4 Nifedipin/Propranolol verglichen mit Nifedipin/ISDN, mit Nifedipin/Molsidomin und Nifedipin/Cinnarizin

Die Konzentrationen der Testsubstanzkombinationen betragen hier 10^{-7} M bzw. 10^{-12} M.

4.2.4.1.2.5 Molsidomin in Kombination mit Propranolol, Nifedipin oder Cinnarizin

Die drei Kombinationen von Testsubstanzen werden auf die Konzentrationen 10^{-7} M und 10^{-12} M eingestellt.

4.2.4.1.3 *Vergleich von Dreier-Kombinationen der Testsubstanzen*

4.2.4.1.3.1 Nicardipin/ISDN/Cinnarizin im Vergleich mit Nifedipin/ISDN/Cinnarizin und Molsidomin/ISDN/Cinnarizin

Hier werden die Substanzkombinationen auf eine jeweilige Konzentration von 10^{-5} M eingestellt, mit PBL der Person A für 48 Stunden vorinkubiert und dann mit PBL der Person B gemischt.

4.2.4.1.3.2 Nifedipin/Propranolol/Cinnarizin, ISDN/Propranolol/Cinnarizin und Diltiazem/Propranolol/Cinnarizin

Die Zellen der Person A werden mit den Substanzkombinationen (Konzentration 10^{-5} M) für 48 Stunden vorinkubiert, anschließend mit Zellen der Person B gemischt und mit diesen für fünf Tage bebrütet.

4.2.4.2 MLC mit Testsubstanzen, zusätzlich **Con A**

4.2.4.2.1 *Vergleich zweier Testsubstanzen*

4.2.4.2.1.1 Propranolol und Molsidomin

Die beiden Testsubstanzen wie auch das mitogene Lektin Con A werden abgewogen, mit Medium verdünnt und auf die erwünschte Konzentration eingestellt. Diese beträgt für die beiden Testsubstanzen 10^{-7} M und für Con A 10µg/ml. Es erfolgt eine 48stündige Koinkubation von PBL der Person A mit Propranolol oder Molsidomin, dazu das mitogene Lektin; für den Referenzwert wird Con A weggelassen. Nach gründlichem Auswaschen der Substanzen werden die PBL der Person A für fünf Tage mit den inaktivierten PBL der Person B inkubiert. Am Tag 5 des Versuchsansatzes erfolgt die Messung mit dem ELISA-Test.

4.2.4.2.1.2 ISDN und Cinnarizin

Hier beträgt die Konzentration der beiden Testsubstanzen jeweils 10^{-12} M.

4.2.4.2.1.3 Vergleich von Propranolol, ISDN, Molsidomin und Cinnarizin in einem Testansatz

Die vier Testsubstanzen werden abgewogen und auf eine Konzentration von 10^{-7} M bzw. 10^{-12} M eingestellt (Con A auf 10µg/ml) und in ihrer Wirkung unter zusätzlichem Einfluß eines mitogenen Lektins miteinander verglichen.

4.2.4.2.2 *Vergleich von Zweier-Kombinationen der Testsubstanzen bei zusätzlicher Vorinkubation durch **Con A***

4.2.4.2.2.1 Nicardipin/Propranolol verglichen mit Nifedipin/Propranolol

Die Substanzkombinationen werden auf eine Konzentration von 10^{-7} M bzw. 10^{-12} M eingestellt, Con A auf 10µg/ml. Nach Vorinkubation (48 Stunden) mit diesen Substanzen und dem mitogenen Lektin werden die PBL der Person A mit den PBL der Person B gemischt und diese Zellsuspensionen für fünf Tage bebrütet.

4.2.4.2.2.2 Nicardipin/Nifedipin, Nicardipin/Propranolol und Nifedipin/Propranolol im Vergleich

Das Verfahren läuft wie bereits beschrieben; die Konzentration der Substanzkombinationen beträgt 10^{-7} M bzw. 10^{-12} M.

4.2.4.2.2.3 Nifedipin/Propranolol, Nifedipin/ISDN, Nifedipin/Molsidomin und Nifedipin/Cinnarizin
PBL einer Person werden mit den Testsubstanzkombinationen (Konzentration 10^{-7} M bzw. 10^{-12} M) und Con A (Konzentration $10\mu\text{g/ml}$) für 48 Stunden vorinkubiert und anschließend mit den PBL einer Person B für fünf Tage bebrütet.

4.2.4.2.2.4 Molsidomin in Kombination mit Propranolol, Nifedipin oder Cinnarizin
Es handelt sich wieder um einen Vergleich der Wirkung von drei Substanzkombinationen in Verbindung mit dem mitogenen Lektin Con A. Die Konzentration der Kombinationen beträgt 10^{-7} M bzw. 10^{-12} M.

4.2.4.3 MLC mit Testsubstanzen, zusätzlich **PHA**

4.2.4.3.1 *Vergleich zweier Testsubstanzen*

4.2.4.3.1.1 Propranolol und Molsidomin

Siehe unter 4.2.4.2.1.1.; anstelle von Con A wird hier das mitogene Lektin PHA in einer Konzentration von $1\mu\text{g/ml}$ verwendet. Die Konzentration der Testsubstanzen beträgt 10^{-7} M.

4.2.4.3.1.2 ISDN und Cinnarizin

Die Testsubstanzen Isosorbiddinitrat und Cinnarizin sind auf 10^{-12} M eingestellt, anstelle von Con A kommt hier nun PHA in einer Konzentration von $1\mu\text{g/ml}$ zum Einsatz.

4.2.4.3.1.3 Propranolol, ISDN, Molsidomin und Cinnarizin in einem Testansatz

Die Testsubstanzen werden auf eine Konzentration von 10^{-7} M bzw. 10^{-12} M eingestellt, PHA auf $1\mu\text{g/ml}$.

4.2.4.3.2 *Vergleich von **Zweier**-Kombinationen der Testsubstanzen bei zusätzlicher Vorinkubation durch **PHA***

4.2.4.3.2.1 Nicardipin/Propranolol verglichen mit Nifedipin/Propranolol

Siehe unter 4.2.4.2.2.1.; anstelle von Con A hier das mitogene Lektin PHA (Konzentration $1\mu\text{g/ml}$).

4.2.4.3.2.2 Nicardipin/Nifedipin, Nicardipin/Propranolol und Nifedipin/Propranolol im Vergleich

Nach 48-stündiger Inkubation mit den Testsubstanzkombinationen (Konzentration jeweils 10^{-7} M bzw. 10^{-12} M) und dem mitogenen Lektin PHA (Konzentration $1\mu\text{g/ml}$) werden die PBL einer Person A mit den PBL einer Person B gemischt.

4.2.4.3.2.3 Nifedipin/Propranolol verglichen mit Nifedipin/ISDN, Nifedipin/Molsidomin und Nifedipin/Cinnarizin

Die Konzentrationen der Testsubstanzkombinationen sind 10^{-7} M bzw. 10^{-12} M, das Verfahren wie oben beschrieben.

4.2.4.3.2.4 Molsidomin in Kombination mit Propranolol, Nifedipin oder Cinnarizin

Bei zusätzlicher Vorinkubation mit PHA (Konzentration $1\mu\text{g/ml}$) haben diese drei Testsubstanzkombinationen (Konzentration 10^{-7} M bzw. 10^{-12} M) unterschiedliche Wirkungen auf PBL.

4.2.4.4 MLC mit Testsubstanzen, **mit** oder **ohne** Lektine im Vergleich

4.2.4.4.1 *Vergleich von Propranolol, ISDN, Molsidomin und Cinnarizin in einem Testansatz*

Die vier Testsubstanzen (Konzentration 10^{-7} M) werden wieder abgewogen, dazu Con A (Konzentration $10\mu\text{g/ml}$) und PHA (Konzentration $1\mu\text{g/ml}$). Es erfolgt eine 48stündige Vorinkubation der PBL einer Person A mit den Testsubstanzen und mit bzw. ohne die mitogenen Lektine. Nach dem gründlichen Auswaschen schließt sich die Inkubation mit den inaktivierten PBL einer Person B für fünf Tage an.

4.2.4.4.2 *Vergleich von **Zweier**kombinationen der Testsubstanzen*

4.2.4.4.2.1 Nicardipin/Nifedipin verglichen mit Nicardipin/Propranolol

Die Konzentration dieser Testsubstanzkombinationen beträgt jeweils 10^{-7} M. Weiteres Verfahren siehe unter 4.2.4.4.1.

4.2.4.4.2.2 Nifedipin/Nicardipin und Nifedipin/Cinnarizin

Nifedipin wird mit Nicardipin und Cinnarizin kombiniert (Konzentration der Kombination jeweils 10^{-7} M) und zu den PBL der Person A hinzugefügt. Desweiteren wird die Zellsuspension durch Con A (Konzentration $10\mu\text{g/ml}$) oder PHA (Konzentration $1\mu\text{g/ml}$) ergänzt. Um einen Referenzwert zu erhalten, läßt man die Lektine bei einem Teil der PBL weg.

4.2.4.4.2.3 Cinnarizin kombiniert mit Propranolol oder Nifedipin

Die beiden Testsubstanzkombinationen werden auf 10^{-7} M konzentriert; für den weiteren Testverlauf siehe oben.

4.2.4.4.2.4 Propranolol und Cinnarizin

Diese Testsubstanzkombination wird in Konzentrationen von 10^{-7} M, 10^{-10} M und 10^{-12} M hergestellt und ihre Wirkung hinsichtlich PBL-Stimulation beobachtet.

4.2.4.4.2.5 Propranolol kombiniert mit Diltiazem und Cinnarizin

Die drei Testsubstanzen werden abgewogen und miteinander auf 10^{-7} M konzentriert. Dazu werden die Lektine Con A (Konzentration $10\mu\text{g/ml}$) und PHA (Konzentration $1\mu\text{g/ml}$) gegeben bzw. für den Referenzwert diese weggelassen.

4.2.4.4.2.6 Nifedipin/Propranolol, Nifedipin/ISDN, Nifedipin/Molsidomin und Nifedipin/Cinnarizin

Die Konzentration der vier Testsubstanzkombinationen ist 10^{-7} M.

4.2.4.4.2.7 Propranolol/Molsidomin und Propranolol/Cinnarizin

PBL der Person A, mit bzw. ohne Vorinkubation durch Lektine, werden mit den Testsubstanzen (Konzentration der Kombinationen 10^{-7} M) behandelt und anschließend mit PBL der Person B gemischt.

4.2.4.4.2.8 Molsidomin/Nifedipin verglichen mit Molsidomin/Cinnarizin

Hier beträgt die Konzentration der beiden Testsubstanzkombinationen 10^{-12} M; der weitere Testverlauf ist oben beschrieben.

4.3 Die zellvermittelte Zytotoxizität- **CML** (cell-mediated lympholysis, *modifiziert*)

4.3.1 Der klassische CML-Test

Hier handelt es sich um einen immunologischen Test zum Nachweis von zytotoxischen Antikörpern durch Zerstörung der Zielzellen. Diese sind Zellen normalen oder neoplastischen Gewebes, gegen die sich eine immunologische Aggression spezifisch sensibilisierter Angriffszellen (Killerzellen, Effektorzellen) richtet. In diesem Fall sind die Zielzellen- auch Targetzellen genannt- durch Mitogene induzierte Lymphoblasten (113, S. 305 sowie 58, S. 496).

Im klassischen CML werden Lymphozyten zweier Individuen für fünf Tage im „one-way“-MLC inkubiert und anschließend überlebende Zellen mit Zielzellen für vier Tage inkubiert. Die letzteren werden mit $\text{Na}_2^{51}\text{CrO}_4$ markiert; die Freisetzung von radioaktivem Chrom aus den lysierten Zellen ist ein Maß für die Fähigkeit spezifischer T-Lymphozyten (d.h. T-Zellen aus einem immunisierten Individuum), andere Zellen zu lysieren, die Membran-Antigene tragen, gegen die das Individuum sensibilisiert ist.

In den hier durchgeführten Versuchen wurde der klassische Test modifiziert, das heißt, es erfolgte nur eine zweitägige Inkubation; zum einen, um evtl. schon früh aufgetretene Effekte zu untersuchen, zum anderen aus praktischen Gründen, um möglichst viele Substanzen bzw. Substanzkombinationen zu testen.

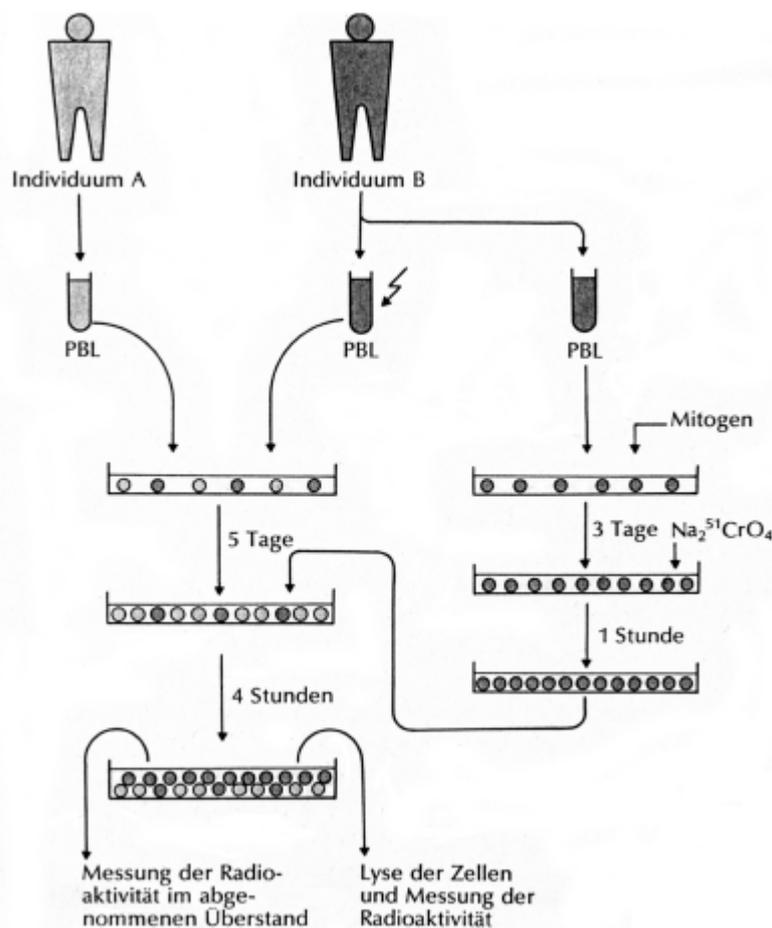


Abbildung 9: Die Messung der zellvermittelten Lymphozytentoxizität (Jan Klein)

4.3.2 Der CML-Test im Labor (*modifiziert*)

Der CML-Test beginnt mit der Generierung von Target-Zellen durch PHA (Konzentration $1\mu\text{g/ml}$). Dazu werden am Tag 0 des Versuchsansatzes Proben der Person B aufgetaut und auf eine Zellzahl von $2,0 \times 10^6$ Zellen/ml eingestellt. Anschließend wird 1 mg PHA abgewogen und auf eine Konzentration von $1\mu\text{g/ml}$ gebracht. Die Zellen der Person werden nun mit PHA in der vorgegebenen Konzentration im Brutschrank (37°C , 5% CO_2 : 95% Luftgemisch, 100% Luftfeuchtigkeit) für drei Tage inkubiert.

Am Tag 1 des Tests werden Proben der Person A aufgetaut und wie die Zellen der Person B vorher auf eine Zellzahl von $2,0 \times 10^6$ Zellen/ml eingestellt. Diese Zellen werden wie beim MLC nun mit verschiedenen Testsubstanzen sowie den Lektinen Con A (in der Konzentration $10\mu\text{g/ml}$) und PHA (in der Konzentration $1\mu\text{g/ml}$) für zwei Tage im Brutschrank inkubiert. Als Referenzwerte laufen wieder frische Zellen ohne Lektine und Testsubstanzen mit.

Am Tag 3 werden alle inkubierten Zellsuspensionen dreimal gewaschen und auf die neue Zellzahl eingestellt. Hierbei wird ein Verhältnis A:B von 1,5:1 hergestellt, d.h. Zellen der Person A mit einer Zahl von ca. $1,0 \times 10^6$ Zellen/ml und B mit einer Zahl von ca. $0,75 \times 10^6$ Zellen/ml. Nun erfolgt die Beschickung der 96-well-Platte: in je drei Parallelen wird die Zellsuspension der Person A (100 μ l) mit der Zellsuspension von Person B (100 μ l) gemischt. Als Referenzwerte dabei sind wieder Zellen der Person A ohne Testsubstanzen und ohne die Lektine Con A und PHA dabei.

Die Inkubationszeit beträgt nun 18 Stunden (im Gegensatz zum klassischen CML-Test!).

4.3.3 Messung des (*modifizierten*) CML -Ansatzes

Statt der klassischen Messung des freigesetzten radioaktiven Chroms aus lysierten Zellen als Parameter der Plasmamembran-Integrität, kommt hier der LDH-Freisetzungstest „Cytotoxicity Detection Kit (LDH)“ zum Einsatz. Dieser wurde bezogen von der Firma Boehringer Mannheim und enthält zwei Fläschchen: in einen befindet sich der Katalysator, den man in 1 ml destillierten Wassers auflösen und gut mischen muß; das andere enthält den Farbstoff. Um eine fertige Kombination für den Test zu erhalten, müssen die beiden Lösungen vermischt werden: 250 μ l aus dem ersten Fläschchen werden zu 11,25 ml aus dem zweiten gegeben.

Es handelt sich wieder um eine kolorimetrische Messung, die den Zelltod bzw. die Zytolyse quantifiziert; der Farbumschlag ist von rot (Formazansalz) zu gelb (Tetrazoliumsalz). Die Basis ist die Messung der LDH- (Lactat-Dehydrogenase) Freisetzung aus dem Zytosol der beschädigten Zellen. Die freigesetzte Enzymmenge korreliert mit der Anzahl der lysierten Zellen.

Nachdem LDH ein ubiquitäres Enzym ist, das auch in kleiner Menge aus intakten Zellen freigesetzt wird, muß die LDH-Freisetzung der Zellen der Person A und der Person B auch einzeln gemessen werden.

Die Vorteile dieser Methode sind, daß keine radioaktiven Isotope verwendet werden, daß sie sehr sensitiv ist und vor allem schnell Ergebnisse liefert.

Zur praktischen Vorgehensweise: nach der 18-stündigen Inkubation wird die 96-well-Platte bei 250 x g für 10 Minuten zentrifugiert. Anschließend wird mit einer 100 μ l-Pipette der Überstand vorsichtig abgetragen und in eine frische 96-well-Platte gegeben; dazu werden nun je 100 μ l der „Cytotoxicity Detection Kit“-Mischung pipettiert. Diese neue Kulturplatte wird nun im Brutschrank für 20 Minuten inkubiert. Anschließend erfolgt die Messung im ELISA-Test bei einer Wellenlänge von 490 nm und einer Referenzwellenlänge von über 600 nm. Nicht vergessen werden darf auch hier der „blank“-Wert ohne Zellen.

Nach Erhalt des Ausdruckes aus dem angeschlossenen Computer müssen noch die Differenzen zwischen der LDH-Freisetzung aus dem Zellgemisch der Personen A und B und derjenigen aus den Zellen der Personen A und B getrennt berechnet werden.

4.3.4 Die durchgeführten Versuche im Einzelnen

4.3.4.1 CML (*modifiziert*) mit Testsubstanzen, **ohne** Lektine

4.3.4.1.1 *Vergleich zweier Testsubstanzen*

4.3.4.1.1.1 Propranolol und Molsidomin

Die beiden Testsubstanzen werden abgewogen und durch Verdünnung im RPMI-Medium auf eine Konzentration von 10^{-7} M gebracht. Die PBL der Person A werden nun mit diesen Substanzen für 48 Stunden vorinkubiert; anschließend folgt die Bebrütung mit den PBL der Person B, die wiederum für drei Tage mit PHA (Konzentration 1 μ g/ml) inkubiert wurden, für 18 Stunden.

4.3.4.1.1.2 ISDN und Cinnarizin

Das Verfahren ist wie unter 4.3.4.1.1.1.; die Konzentration der Testsubstanzen beträgt hier 10^{-12} M.

4.3.4.1.1.3 Propranolol, ISDN, Molsidomin und Cinnarizin in einem Testansatz

Die Konzentration der Testsubstanzen beträgt hier 10^{-7} M; diese werden direkt miteinander in ihrer Wirkung auf die Lyse von PBL verglichen.

4.3.4.1.2 *Vergleich von **Zweier**-Kombinationen der Testsubstanzen*

4.3.4.1.2.1 Nicardipin kombiniert mit Propranolol

Die beiden Testsubstanzen werden abgewogen und auf die Konzentrationen 10^{-7} M, 10^{-10} M und 10^{-12} M eingestellt. Es folgt die 48stündige Vorinkubation mit den Zellen der Person A; anschließend werden die Substanzen gründlich ausgewaschen. Die PBL der Person A werden nun mit PBL der Person B, die drei Tage mit dem mitogenen Lektin PHA (Konzentration 1 μ g/ml) inkubiert wurden, gemischt. Nach 18 Stunden Inkubation erfolgt die Messung im ELISA-Test.

4.3.4.1.2.2 Nifedipin/Propranolol in drei Konzentrationen (10^{-7} M, 10^{-10} M und 10^{-12} M)

Das Verfahren ist das gleiche, wie unter 4.3.4.1.2.1. dargestellt. Nicardipin wird dabei durch Nifedipin ersetzt.

4.3.4.1.2.3 Nicardipin/Nifedipin, Nicardipin/Propranolol und Nifedipin/Propranolol im Vergleich

Die Konzentration der Testsubstanzkombinationen beträgt hier 10^{-7} M bzw. 10^{-12} M.

4.3.4.1.2.4 Nifedipin/Propranolol verglichen mit Nifedipin/ISDN, Nifedipin/Molsidomin und Nifedipin/Cinnarizin

Nach Vorinkubation (48 Stunden) der PBL der Person A mit diesen Substanzkombinationen (Konzentration jeweils 10^{-7} M bzw. 10^{-12} M) werden sie mit den PHA-behandelten Zellen der Person B für 18 Stunden koinkubiert.

4.3.4.1.2.5 Molsidomin kombiniert mit Propranolol, Nifedipin oder Cinnarizin

Der Testablauf wurde oben bereits ausführlich beschrieben; die Konzentration der Testsubstanzkombinationen ist 10^{-7} M bzw. 10^{-12} M.

4.3.4.1.3 Vergleich von **Dreier-Kombinationen** der Testsubstanzen

4.3.4.1.3.1 Nicardipin/ISDN/Cinnarizin, Nifedipin/ISDN/Cinnarizin und Molsidomin/ISDN/Cinnarizin im Vergleich

Die Testsubstanzen werden abgewogen und auf eine Konzentration der jeweiligen Kombination von 10^{-5} M eingestellt. Es folgt die Koinkubation von PBL der Person A mit diesen Testsubstanzen für 48 Stunden, nach anschließendem Auswaschen dann die Bebrütung von PBL der Personen A und B für 18 Stunden.

4.3.4.1.3.2 Nifedipin/Propranolol/Cinnarizin verglichen mit ISDN/Propranolol/Cinnarizin und Diltiazem/Propranolol/Cinnarizin

Vorgehensweise wie unter 4.3.4.1.3.1. bereits beschrieben; Konzentration der Testsubstanzkombinationen jeweils 10^{-5} M.

4.3.4.2 CML (*modifiziert*) mit Testsubstanzen, zusätzlich **Con A**

4.3.4.2.1 Vergleich zweier Testsubstanzen

4.3.4.2.1.1 Propranolol und Molsidomin

Nach Vorinkubation (48 Stunden) der PBL/Person A mit dem mitogenen Lektin Con A (Konzentration $10\mu\text{g/ml}$) und den Testsubstanzen (Konzentration jeweils 10^{-7} M) erfolgt die Bebrütung mit PBL der Person B für 18 Stunden. Als Referenzwert läuft ein Teil der PBL der Person A ohne Con A mit.

4.3.4.2.1.2 ISDN und Cinnarizin

ISDN und Cinnarizin (Konzentration jeweils 10^{-12} M) haben nach zusätzlicher Vorinkubation (48 Stunden) mit Con A (Konzentration $10\mu\text{g/ml}$) eine unterschiedliche Wirkung auf die Zytolyse von PBL.

4.3.4.2.1.3 Propranolol, ISDN, Molsidomin und Cinnarizin in einem Testansatz

Konzentration des mitogenen Lektins Con A $10\mu\text{g/ml}$, die der Testsubstanzen jeweils 10^{-7} M; der weitere Testverlauf wurde bereits oben ausführlich beschrieben.

4.3.4.2.2 Vergleich von **Zweier-Kombinationen** der Testsubstanzen bei zusätzlicher Vorinkubation durch **Con A**

4.3.4.2.2.1 Nicardipin/Nifedipin, Nicardipin/Propranolol und Nifedipin/Propranolol

Diese drei Testsubstanzen werden abgewogen, auf eine Konzentration von 10^{-7} M bzw. 10^{-12} M pro Kombination eingestellt und mit PBL der Person A sowie Con A (Konzentration $10\mu\text{g/ml}$) für 48 Stunden koinkubiert.

4.3.4.2.2.2 Nifedipin/Propranolol, Nifedipin/ISDN, Nifedipin/Molsidomin und Nifedipin/Cinnarizin im Vergleich

Die Konzentration der Substanzkombinationen beträgt 10^{-7} M bzw. 10^{-12} M; die Vorgehensweise wurde oben beschrieben.

4.3.4.2.2.3 Vergleich von Molsidomin/Propranolol, Molsidomin/Nifedipin und Molsidomin/Cinnarizin

Mit dem Zusatz von Con A (Konzentration 10 µg/ml) werden die Testsubstanzkombinationen (Konzentration jeweils 10^{-7} M bzw. 10^{-12} M) mit PBL der Person A kokubiert.

4.3.4.3 CML (*modifiziert*) mit Testsubstanzen, zusätzlich **PHA**

4.3.4.3.1 *Vergleich zweier Testsubstanzen*

4.3.4.3.1.1 Propranolol und Molsidomin

Siehe unter 4.3.4.2.1.1.; anstelle von Con A wird hier das mitogene Lektin PHA (Konzentration 1 µg/ml) verwendet.

4.3.4.3.1.2 ISDN und Cinnarizin

Die beiden Testsubstanzen Isosorbiddinitrat und Cinnarizin haben eine Konzentration von 10^{-12} M; gemeinsam mit PHA (Konzentration 1 µg/ml) werden sie mit PBL der Person A für 48 Stunden vorinkubiert.

4.3.4.3.1.3 Propranolol, ISDN, Molsidomin und Cinnarizin in einem Testansatz

Nach zusätzlicher Vorinkubation mit PHA (Konzentration 1 µg/ml) wirken die vier Testsubstanzen (Konzentration 10^{-7} M bzw. 10^{-12} M) unterschiedlich auf die Lyse von PBL.

4.3.4.3.2 *Vergleich von **Zweier**-Kombinationen der Testsubstanzen bei zusätzlicher Vorinkubation durch **PHA***

4.3.4.3.2.1 Nicardipin/Nifedipin verglichen mit Nicardipin/Propranolol und Nifedipin/Propranolol

Die drei Testsubstanzen werden abgewogen und unterschiedlich kombiniert; in einer Konzentration von 10^{-7} M bzw. 10^{-12} M werden sie gemeinsam mit PHA (Konzentration 1 µg/ml) mit PBL der Person A für 48 Stunden vorinkubiert.

4.3.4.3.2.2 Nifedipin/Propranolol, Nifedipin/ISDN, Nifedipin/Molsidomin und Nifedipin/Cinnarizin im Vergleich

Die Konzentrationen der Testsubstanzkombinationen sind jeweils 10^{-7} M bzw. 10^{-12} M; die weitere Vorgehensweise ist oben beschrieben.

4.3.4.3.2.3 Vergleich von Molsidomin/Propranolol, Molsidomin/Nifedipin und Molsidomin/Cinnarizin

PBL der Person werden mit diesen Substanzkombinationen (Konzentration jeweils 10^{-7} M bzw. 10^{-12} M) und dem mitogenen Lektin PHA (Konzentration 1 µg/ml) für 48 Stunden vorinkubiert; es folgt die 18stündige Bebrütung mit PHA-behandelten PBL der Person B.

4.3.4.4 CML (*modifiziert*) mit Testsubstanzen, **mit** oder **ohne** Lektine im Vergleich

4.3.4.4.1 *Vergleich von Propranolol, ISDN, Molsidomin und Cinnarizin in einem Testansatz*

Diese vier Testsubstanzen werden abgewogen, auf eine Konzentration von 10^{-7} M eingestellt und mit PBLs der Person A für 48 Stunden vorinkubiert. Dazu werden die mitogenen Lektine Con A (Konzentration 10 µg/ml) und PHA (Konzentration 1 µg/ml) gegeben. Als Referenzwerte gelten Zellen der Person A ohne Lektine.

4.3.4.4.2 *Vergleich von **Zweier**-Kombinationen der Testsubstanzen*

4.3.4.4.2.1 Nicardipin/Nifedipin verglichen mit Nicardipin/Propranolol und Nifedipin/Propranolol

Die Konzentration der Testsubstanzkombinationen beträgt jeweils 10^{-7} M. Diese werden mit oder ohne Lektine mit den PBL der Person A für 48 Stunden kokubiert.

4.3.4.4.2.2 Nifedipin/Nicardipin und Nifedipin/Cinnarizin

Zur Vorgehensweise siehe oben; die Konzentration der Substanzkombinationen ist jeweils 10^{-7} M.

4.3.4.4.2.3 Vergleich von Cinnarizin/Propranolol und Cinnarizin/Nifedipin

Die PBL der Person A werden mit bzw. ohne Lektine und den Testsubstanzkombinationen (Konzentration jeweils 10^{-7} M) für 48 Stunden kokubiert und nach ausführlichem Auswaschen der Substanzen mit PBL der Person B für 18 Stunden bebrütet.

4.3.4.4.2.4 Propranolol kombiniert mit Cinnarizin

Diese Substanzkombination wird in den Konzentrationen 10^{-7} M, 10^{-10} M und 10^{-12} M hergestellt. Es folgt die 48stündige Bebrütung mit PBL der Person A sowie mit bzw. ohne Lektine.

4.3.4.4.2.5 Vergleich von Nifedipin/Propranolol, Nifedipin/ISDN und Nifedipin/Cinnarizin

Die Vorgehensweise ist wie gehabt; die Konzentration der Testsubstanzkombinationen ist jeweils 10^{-7} M.

4.3.4.4.2.6 Propranolol/Diltiazem und Propranolol/Cinnarizin

Die Konzentration der Testsubstanzkombinationen beträgt jeweils 10^{-7} M.

4.3.4.4.2.7 Molsidomin kombiniert mit Nifedipin oder Cinnarizin

PBL der Person A werden mit diesen Substanzkombinationen (Konzentration jeweils 10^{-12} M) und mit bzw. ohne mitogene Lektine vorinkubiert.

4.3.4.4.2.8 Propranolol/Molsidomin verglichen mit Propranolol/Cinnarizin

Die Konzentration dieser Testsubstanzkombinationen ist 10^{-7} M, die der Lektine Con A $10 \mu\text{g/ml}$ und PHA $1 \mu\text{g/ml}$.

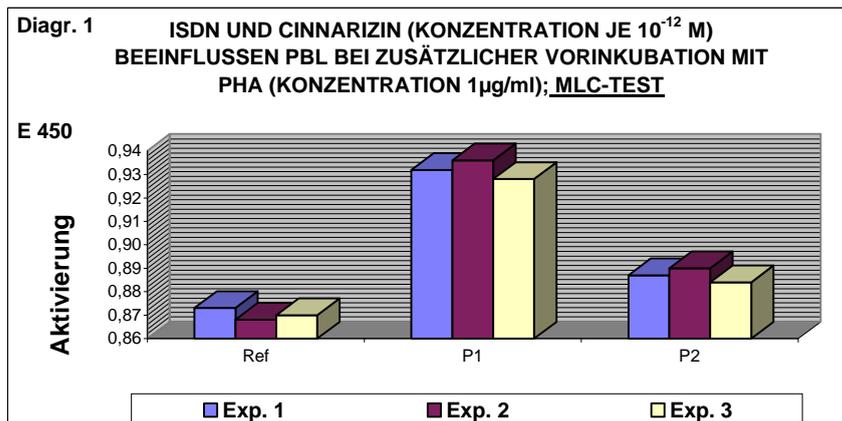
IV ERGEBNISSE

1 Die gemischte Lymphozytenkultur- MLC (mixed-lymphocyte culture)

1.1 MLC mit Testsubstanzen, ohne Lektine

1.1.1 Vergleich zweier Testsubstanzen

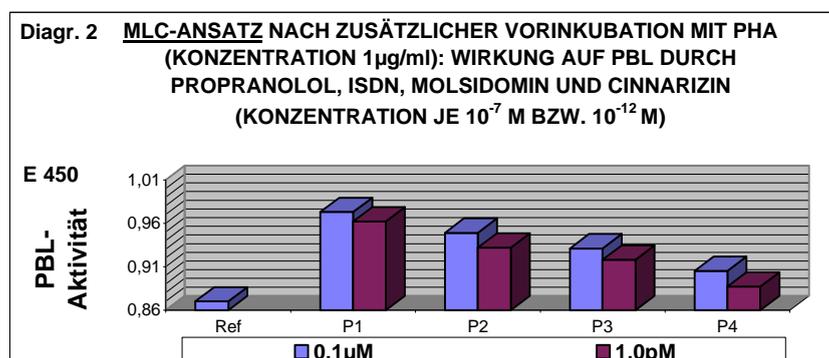
1.1.1.1 Propranolol und Molsidomin



Exp. 1,2,3 : Experiment 1,2,3
Ref : PBL der Person A gemischt mit PBL der Person B; keine Testsubstanzen
P1 : PBL der Person A, 48 Stunden vorinkubiert mit Propranolol (Konzentration 10^{-7} M), gemischt mit PBL der Person B
P2 : PBL der Person A, 48 Stunden vorinkubiert mit Molsidomin (Konzentration 10^{-7} M), gemischt mit PBL der Person B

Wie aus dem Diagramm 1 hervorgeht, stimulieren die Testsubstanzen Propranolol und Molsidomin (Konzentration jeweils 10^{-7} M) PBL in unterschiedlicher Weise. Im Vergleich zu den Zellen ohne Testsubstanzen (s. Referenzwert) kommt es mit beiden Substanzen zu einer Zunahme der Zellaktivität, im ELISA-Test ausgedrückt durch eine Zunahme der Extinktion (s. y-Achse). Propranolol erweist sich als der stärkere Stimulator der PBL; der Extinktionswert bei einer Wellenlänge von 450 nm liegt im Schnitt bei 0,958, der von Molsidomin bei 0,915.

1.1.1.2 ISDN und Cinnarizin

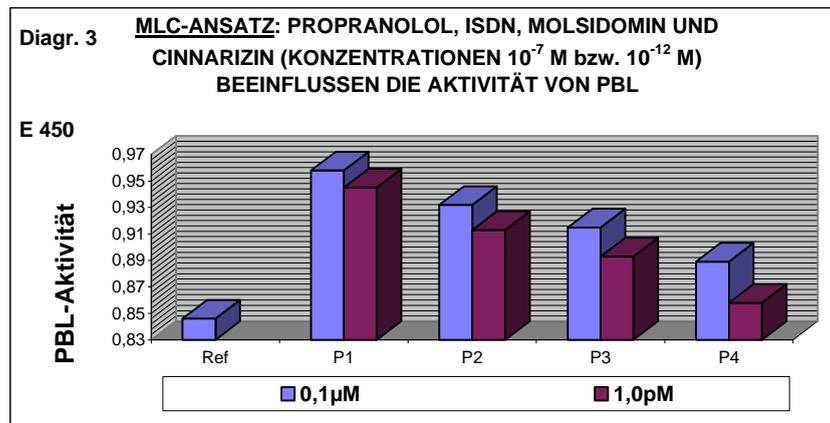


Exp. 1,2,3 : Experiment 1,2,3
Ref : PBL der Person A gemischt mit PBL der Person B; keine Testsubstanzen
P1 : PBL der Person A, 48 Stunden vorinkubiert mit Isosorbiddinitrat (Konzentration 10^{-12} M), gemischt mit PBL der Person B
P2 : PBL der Person A, 48 Stunden vorinkubiert mit Cinnarizin (Konzentration 10^{-12} M), gemischt mit PBL der Person B

Diagramm 2 zeigt die Zunahme der PBL-Aktivität unter dem Einfluß der Testsubstanzen Isosorbiddinitrat und Cinnarizin (Konzentration jeweils 10^{-12} M). Dargestellt sind- wie auch in Diagramm 1- jeweils die Werte von drei Parallelversuchen. Cinnarizin (E-Wert durchschnittlich 0,889) fördert die Aktivität von peripheren Blut-

Lymphozyten in deutlich geringerer Weise als ISDN (E-Wert im Schnitt 0,932), jedoch ist auch hier eine Steigerung im Vergleich zu den Referenzwerten zu erkennen.

1.1.1.3 Propranolol, ISDN, Molsidomin und Cinnarizin in einem Testansatz

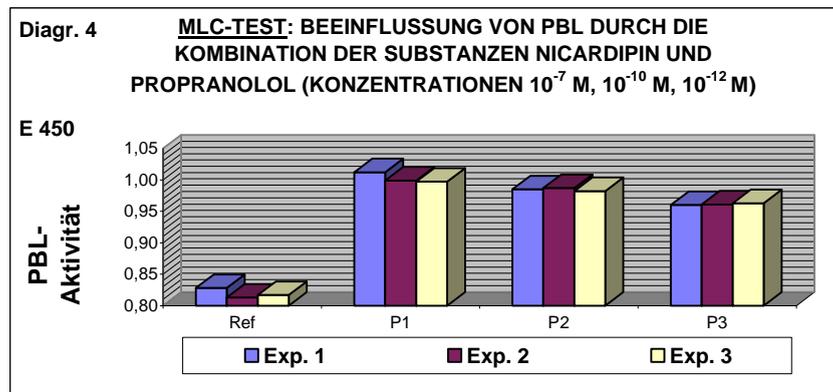


0,1µM bzw. 1,0pM : Konzentration der Testsubstanzen
Ref : PBL der Person A gemischt mit PBL der Person B; keine Testsubstanzen
P1 : PBL der Person A, vorinkubiert mit Propranolol (Konzentration 10^{-7} M bzw. 10^{-12} M), gemischt mit PBL der Person B
P2 : wie P1; anstelle von Propranolol hier ISDN (Konzentration 10^{-7} M bzw. 10^{-12} M)
P3 : wie P1; anstelle von Propranolol hier Molsidomin (Konzentration 10^{-7} M bzw. 10^{-12} M)
P4 : wie P1; anstelle von Propranolol hier Cinnarizin (Konzentration 10^{-7} M bzw. 10^{-12} M)

Hier wurden vier Einzelsubstanzen direkt miteinander verglichen. Wie in Diagramm 3 ersichtlich ist der β -Blocker Propranolol der potenteste Stimulator von PBL (E-Wert bei 0,958 in der Konzentration 10^{-7} M und 0,945 in der Konzentration 10^{-12} M). Es folgen Isosorbiddinitrat und Molsidomin, die sich in ihrer Wirkung nur geringfügig unterscheiden: ISDN bei einer Konzentration von 10^{-7} M 0,932, Molsidomin hingegen 0,915, während die Werte bei einer Konzentration von 10^{-12} M 0,913 bzw. 0,893 betragen. Die Stimulation durch Cinnarizin ist auch hier am geringsten, aber im Vergleich zum Referenzwert (E-Wert 0,846) in beiden Konzentrationen (10^{-7} M und 10^{-12} M) noch gut zu erkennen. Ebenfalls lässt sich aus Diagramm 3 die geringere Wirkung der Testsubstanzen bei niedrigerer Konzentration (10^{-7} M verglichen mit 10^{-12} M) ablesen. Der Unterschied in der Auswirkung auf die PBL-Aktivität zwischen den beiden Konzentrationen ist am deutlichsten bei Cinnarizin zu sehen; er ist am kleinsten bei der Testsubstanz Propranolol.

1.1.2 Vergleich von **Zweier**-Kombinationen der Testsubstanzen

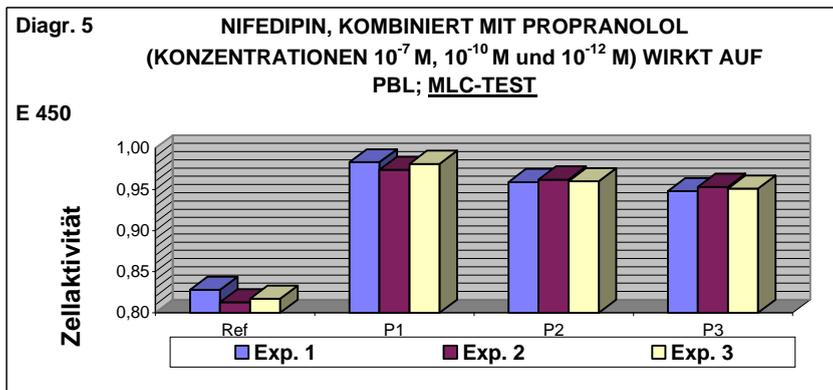
1.1.2.1 Nicardipin/Propranolol in drei Konzentrationen



Ref : PBL der Person A gemischt mit PBL der Person B; keine Testsubstanzen
P1 : PBL der Person A, vorinkubiert (48 Std.) mit dem Substanzengemisch Nicardipin und Propranolol (Konzentration 10^{-7} M), dazu PBL der Person B
P2 : wie P1; Konzentration des Substanzengemisches hier 10^{-10} M
P3 : wie P1; Konzentration des Substanzengemisches hier 10^{-12} M

In Diagramm 4 ist die Aktivität von PBL unter dem Einfluß des Testsubstanzgemisches Nicardipin und Propranolol dargestellt. Diese Kombination ist offensichtlich sehr wirksam- im Vergleich zu den Referenzwerten der Parallelversuche (im Schnitt 0,844) werden PBL deutlich stimuliert (z.B. bei einer Konzentration der Kombination von 10^{-7} M E von 1,001). Die Unterschiede der Aktivitätssteigerung zwischen den drei Konzentrationen sind hier nicht sehr ausgeprägt, doch auch noch bei 10^{-12} M ist die Stimulation von PBL durch Nicardipin/Propranolol gut festzustellen.

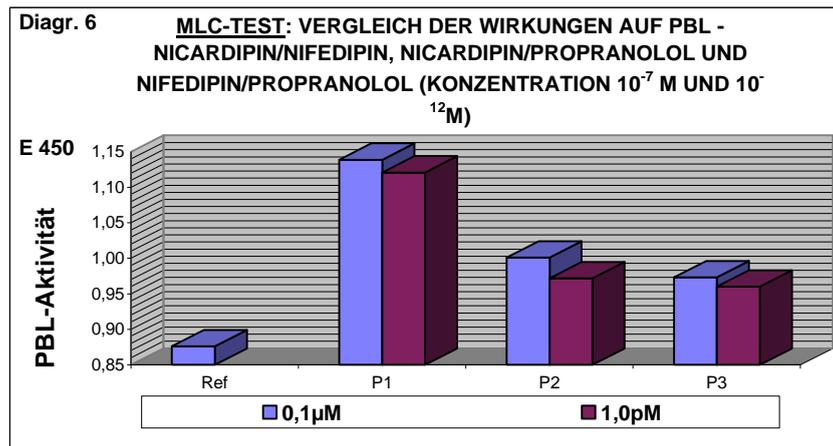
1.1.2.2 Nifedipin/Propranolol in drei Konzentrationen



Exp. 1,2,3 : Experiment 1,2,3
Ref : PBL der Person A gemischt mit PBL der Person B; keine Testsubstanzen
P1 : PBL der Person A, vorinkubiert mit der Substanzkombination Nifedipin/ Propranolol (Konzentration 10^{-7} M), gemischt mit PBL der Person B
P2 : wie P1; hier Konzentration der Substanzkombination 10^{-10} M
P3 : wie P1; hier Konzentration der Substanzkombination 10^{-12} M

Im Gegensatz zur vorherigen Grafik ist hier (Diagramm 5) Nicardipin gegen Nifedipin ausgetauscht. Diese beiden sehr ähnlichen Testsubstanzen zeigen auch eine ähnliche Wirkung: keine großen Unterschiede zwischen den drei Konzentrationen 10^{-7} M, 10^{-10} M und 10^{-12} M und eine deutliche Aktivitätssteigerung im Vergleich zu den Referenzwerten der Parallelansätze. Da Propranolol konstant geblieben ist, könnte man aus dem Vergleich der Diagramme 4 und 5 schließen, daß Nicardipin ein stärkerer Stimulator von PBL als Nifedipin ist; z.B. Nicardipin/Propranolol 1,001, Nifedipin/Propranolol 0,973 (Konzentration der Substanzkombinationen jeweils 10^{-7} M).

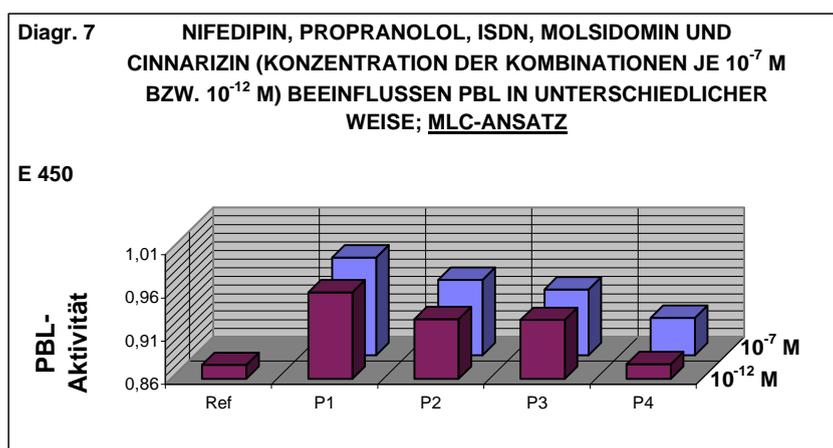
1.1.2.3 Vergleich von Nicardipin/Nifedipin, Nicardipin/Propranolol und Nifedipin/Propranolol



0,1 μM bzw. 1,0 μM : Konzentration der Testsubstanz-Kombinationen
Ref : PBL der Person A gemischt mit PBL der Person B; keine Testsubstanzen
P1 : PBL der Person A, vorinkubiert mit der Substanzkombination Nicardipin/Nifedipin (Konzentration 10^{-7} M bzw. 10^{-12} M), gemischt mit PBL der Person B
P2 : wie P1; hier Kombination aus Nicardipin und Propranolol (Konzentr. 10^{-7} M bzw. 10^{-12} M)
P3 : wie P1; hier Kombination aus Nifedipin und Propranolol (Konzentr. 10^{-7} M bzw. 10^{-12} M)

Im Diagramm 6 sind die Wirkungen auf PBL durch die drei Testsubstanzen Nicardipin, Nifedipin und Propranolol in unterschiedlicher Kombination dargestellt. Es fällt zunächst einmal auf, daß die beiden Kalzium-Kanal-Blocker Nicardipin und Nifedipin eine sehr potente Kombination bilden, sie fördern gemeinsam die PBL-Aktivität in deutlicher Weise (E-Wert 1,139 bei einer Konzentration von 10^{-7} M im Vergleich zu 0,875 des Referenzwertes). Werden sie jeweils mit Propranolol kombiniert, stimulieren sie PBL in ähnlicher Weise, wobei sich auch hier Nicardipin als die stärkere Substanz erweist. Die Unterschiede in der aktivierenden Wirkung von zwei Konzentrationen sind gut zu erkennen bei P1; bei der Kombination Nifedipin/Propranolol sind diese nicht so deutlich zu sehen.

1.1.2.4 Nifedipin in Kombination mit Propranolol, ISDN, Molsidomin und Cinnarizin



Ref : PBL der Person A gemischt mit PBL der Person B; keine Testsubstanzen
P1 : PBL der Person A, vorinkubiert (48 Std.) mit dem Substanzgemisch Nifedipin und Propranolol (Konzentration 10^{-7} M bzw. 10^{-12} M), gemischt mit PBL der Person B
P2 : wie P1; hier Kombination der Substanzen Nifedipin/Isosorbiddinitrat (Konz. 10^{-7} M bzw. 10^{-12} M)
P3 : wie P1; hier Kombination aus Nifedipin und Molsidomin (Konzentration 10^{-7} M bzw. 10^{-12} M)
P4 : wie P1; hier Kombination aus Nifedipin und Cinnarizin (Konzentration 10^{-7} M bzw. 10^{-12} M)

In diesem MLC-Ansatz (Diagramm 7) sind vier Zweier-Kombinationen dargestellt. Nifedipin als Konstante wurde mit Propranolol, ISDN, Molsidomin und Cinnarizin kombiniert und in seiner aktivierenden Wirkung getestet. Man erkennt hier die deutliche Stimulation von PBL durch die Kombination Nifedipin/Propranolol im Vergleich zum Referenzwert, was auch in den Diagrammen 5 und 6 bereits gezeigt wurde. Analog zu Diagramm 3 ist die Stimulation von PBL durch die Kombinationen von Nifedipin mit den beiden Nitraten ISDN

und Molsidomin sowie dem Kalziumüberladungsblocker Cinnarizin, d.h. eine Stimulation in abnehmender Reihenfolge.

Festzustellen sind wieder die geringen Unterschiede zwischen den Kombinationen mit beiden Nitraten, aber auch die minimale Differenz zwischen der Kombination Nifedipin/Cinnarizin (Konzentration 10^{-12} M) und dem Referenzwert: sie beträgt nur 0,001!

1.1.2.5 Molsidomin kombiniert mit Propranolol, Nifedipin oder Cinnarizin

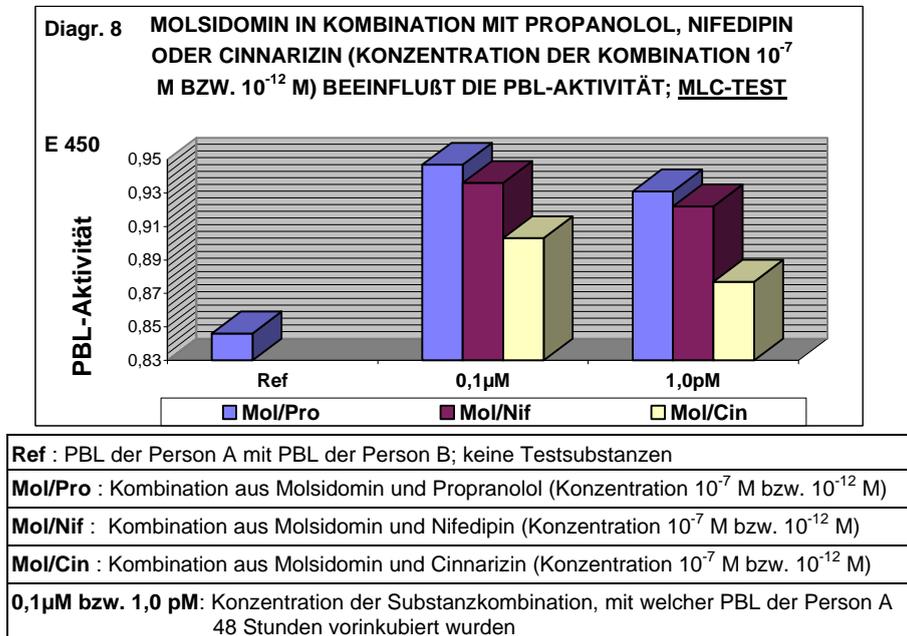
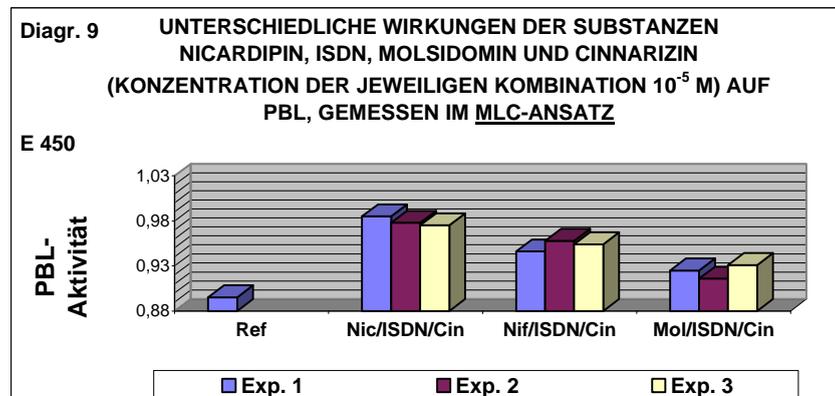


Diagramm 8 zeigt die stimulierende Wirkung auf PBL durch Molsidomin, kombiniert mit den Testsubstanzen Propranolol, Nifedipin oder Cinnarizin. Alle drei Kombinationen fördern (in beiden Konzentrationen 10^{-7} M und 10^{-12} M) die Aktivität von peripheren Blut-Lymphozyten, allerdings in unterschiedlicher Weise. Cinnarizin erweist sich wiederholt als die schwächste Substanz, wirkt aber in Kombination mit Molsidomin immer noch stimulierend auf PBL im Vergleich zum Referenzwert. Keine deutlichen Unterschiede sind zwischen den Kombinationen Molsidomin/Propranolol und Molsidomin/Nifedipin zu erkennen, wobei sich jedoch Propranolol im Vergleich zu Nifedipin als etwas potenter erweist.

1.1.3 Vergleich von Dreier-Kombinationen der Testsubstanzen

1.1.3.1 Nicardipin/ISDN/Cinnarizin im Vergleich zu Nifedipin/ISDN/Cinnarizin und Molsidomin/ISDN/Cinnarizin



Exp. 1,2,3 : Experiment 1,2,3

Ref : PBL der Person A gemischt mit PBL der Person B; keine Testsubstanzen

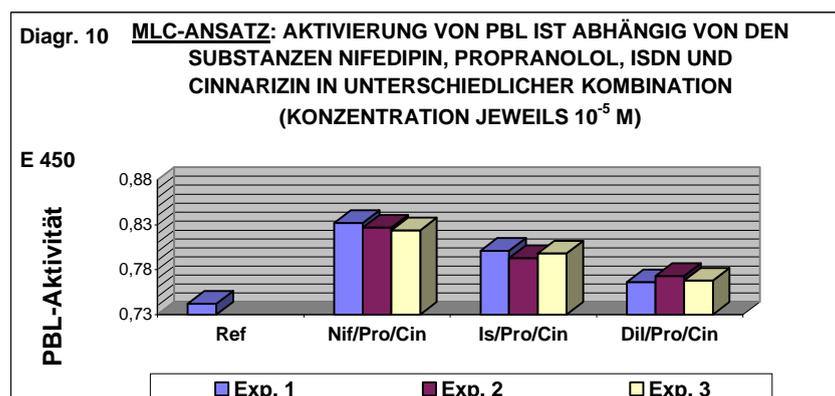
Nic/ISDN/Cin : Kombination aus Nicardipin, Isosorbiddinitrat und Cinnarizin (Konzentr. 10^{-5} M)

Nif/ISDN/Cin : Kombination aus Nifedipin, Isosorbiddinitrat und Cinnarizin (Konzentr. 10^{-5} M)

Mo/ISDN/Cin : Kombination aus Molsidomin, Isosorbiddinitrat und Cinnarizin (Konz. 10^{-5} M)

Die unterschiedliche Wirkung von Dreier-Kombinationen (Konzentration jeweils 10^{-5} M) auf die Aktivität von PBL ist im Diagramm 9 dargestellt, dabei wurde jeweils eine Testsubstanzen ausgetauscht, die anderen beiden hingegen als Konstanten belassen. Die Werte der drei Parallelversuche zeigen, daß Nicardipin die stärkste stimulierende Wirkung hat- diese Tatsache wurde bereits in den Diagrammen 4 und 6 deutlich. Als etwas weniger aktivierend erweist sich wieder Nifedipin in Kombination mit den anderen beiden Testsubstanzen; der Unterschied zwischen den beiden Kalzium-Kanal-Blockern ist auch nicht sehr groß.

1.1.3.2 Nifedipin/Propranolol/Cinnarizin, ISDN/Propranolol/Cinnarizin und Diltiazem/Propranolol/Cinnarizin



Exp. 1,2,3 : Experiment 1,2,3

Ref : PBL der Person A gemischt mit PBL der Person B; keine Testsubstanzen

Nif/Pro/Cin : Substanzgemisch aus Nifedipin, Propranolol und Cinnarizin (Konzentration 10^{-5} M)

Is/Pro/Cin : Substanzgemisch aus Isosorbiddinitrat, Propranolol und Cinnarizin (Konz. 10^{-5} M)

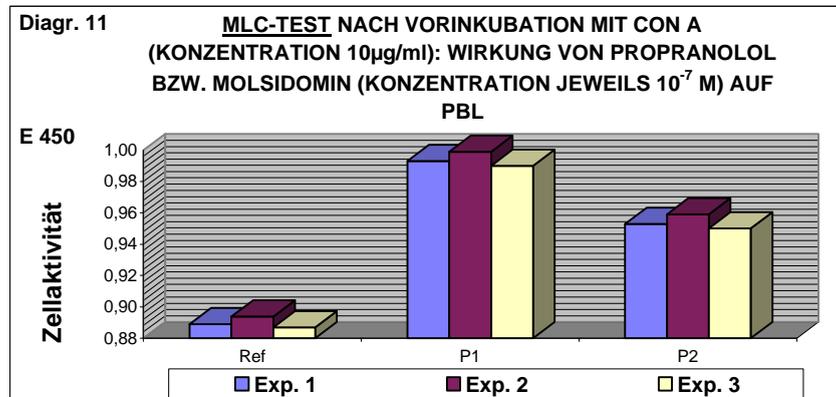
Dil/Pro/Cin : Substanzgemisch aus Diltiazem, Propranolol und Cinnarizin (Konzentration 10^{-5} M)

Diagramm 10 zeigt wieder einen Vergleich von Dreier-Kombinationen der Testsubstanzen (Konzentration jeweils 10^{-5} M). Auch in Kombination mit zwei anderen Substanzen erweist sich Nifedipin hier als potentester Aktivator für PBL. Deutlich geringere Wirkung zeigt ISDN, mit einigem Abstand gefolgt von Diltiazem. Interessanterweise stimuliert das Nitrat die Zellen besser als der Kalzium-Kanal-Blocker, den man eigentlich an zweiter Stelle vermutet hätte.

1.2 MLC mit Testsubstanzen, zusätzlich **Con A**

1.2.1 Vergleich von zwei Testsubstanzen

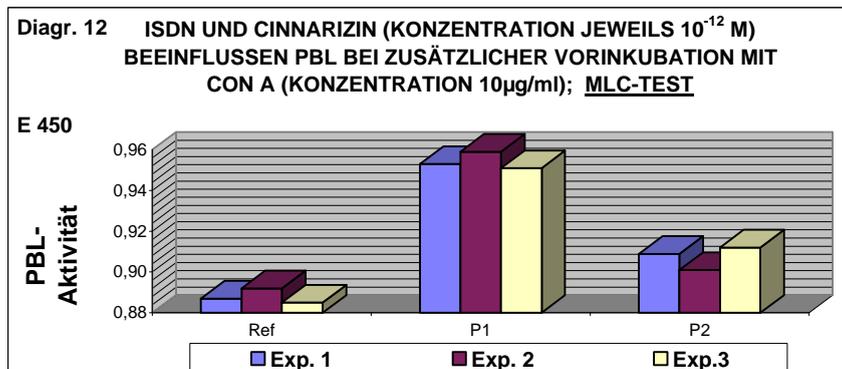
1.2.1.1 Propranolol und Molsidomin



Exp. 1,2,3 : Experiment 1,2,3
Ref : PBL/Person A nach Vorinkubation (48 Stunden) mit dem mitogenen Lektin Con A (Konzentration 10µg/ml), gemischt mit PBL/Person B; keine Testsubstanzen
P1 : PBL/Person A, vorinkubiert (48 Std.) mit Con A und Propranolol (Konzentration 10 ⁻⁷ M), gemischt mit PBL der Person B
P2 : wie P1; anstelle von Propranolol hier Molsidomin (Konzentration 10 ⁻⁷ M)

Diagramm 11 ist vergleichbar mit Diagramm 1; hier zeigt sich die Wirkung von dem hinzugefügten Lektin Con A. Dieses fördert die PBL-Aktivität deutlicher im Vergleich zu den Werten ohne das Lektin; die jeweils drei Parallelversuche sind gleich aufgebaut wie in Diagramm 1. So ist der Extinktionswert für Propranolol (Konzentration 10⁻⁷ M) hier z.B. 0,992, während er im Versuch ohne Con A 0,958 beträgt.

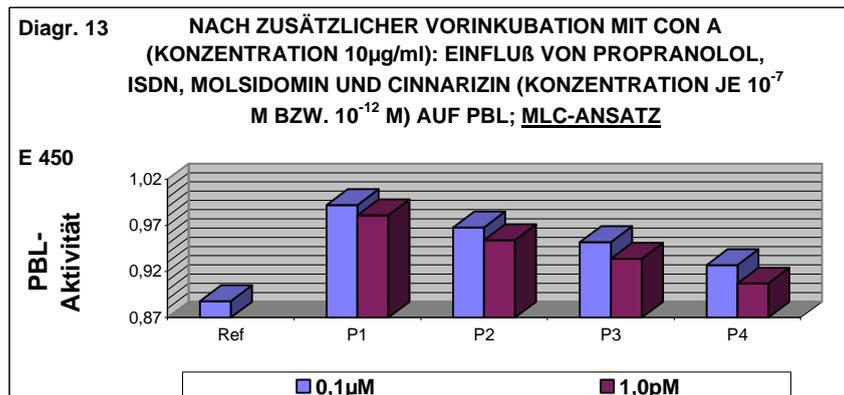
1.2.1.2 ISDN und Cinnarizin



Exp. 1,2,3 : Experiment 1,2,3
Ref : PBL der Person A nach Vorinkubation (48 Stunden) mit dem mitogenen Lektin Con A (Konzentration 10µg/ml) gemischt mit PBL der Person B; keine Testsubstanzen
P1 : PBL/Person A, vorinkubiert mit Con A und Isosorbiddinitrat (Konzentration 10 ⁻¹² M), gemischt mit PBL der Person B
P2 : wie P1; anstelle von ISDN hier Cinnarizin (Konzentration 10 ⁻¹² M)

Zum Vergleich des hier gezeigten Diagrammes 12 kann man Diagramm 2 heranziehen; der Unterschied ist die zusätzliche Vorinkubation durch das mitogene Lektin Con A (Konzentration 10µg/ml). Es ist deutlich erkennbar, daß Con A PBLs stärker stimuliert als dies der Fall ist, wenn das Lektin nicht hinzugefügt wird.

1.2.1.3 Propranolol, ISDN, Molsidomin und Cinnarizin in einem Testansatz

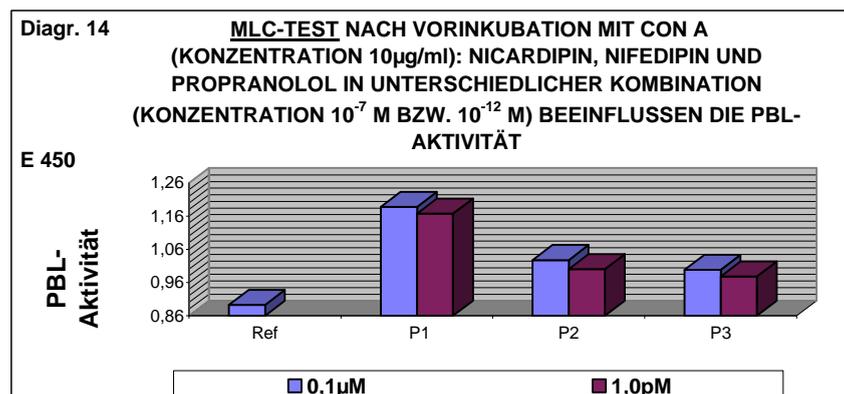


0,1µM bzw. 1,0pM : Konzentration der Testsubstanzen
Ref : PBL der Person A nach Vorinkubation (48 Stunden) mit dem mitogenen Lektin Con A (Konzentration 10µg/ml), gemischt mit PBL der Person B; keine Testsubstanzen
P1 : PBL der Person A, vorinkubiert (48 Stunden) mit Con A (Konz. 10µg/ml) und Propranolol (Konzentration 10 ⁻⁷ M bzw. 10 ⁻¹² M), gemischt mit PBL der Person B
P2 : wie P1; anstelle von Propranolol hier Isosorbiddinitrat (Konzentration 10 ⁻⁷ M bzw. 10 ⁻¹² M)
P3 : wie P1; anstelle von Propranolol hier Molsidomin (Konzentration 10 ⁻⁷ M bzw. 10 ⁻¹² M)
P4 : wie P1; anstelle von Propranolol hier Cinnarizin (Konzentration 10 ⁻⁷ M bzw. 10 ⁻¹² M)

Diagramm 13 zeigt den Einfluß der Substanzen Propranolol, Isosorbiddinitrat, Molsidomin und Cinnarizin auf die Stimulation von peripheren Blut-Lymphozyten bei zusätzlicher Vorinkubation durch das mitogene Lektin Con A. Wenn man zum Vergleich nun Diagramm 3 heranzieht, fällt auf, daß durch Con A die Stimulation von PBL noch zusätzlich verstärkt wird; so beträgt z.B. die Differenz der Extinktionswerte zwischen Cinnarizin alleine und Cinnarizin mit Con A 0,038.

1.2.2 Vergleich von **Zweier**-Kombinationen der Testsubstanzen bei zusätzlicher Vorinkubation durch **Con A**

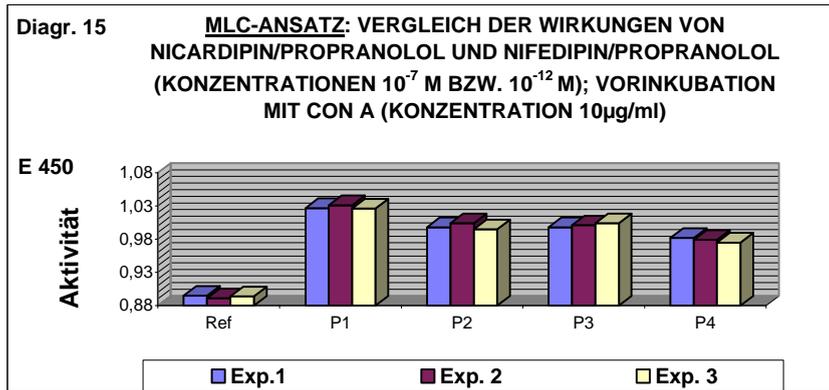
1.2.2.1 Nicardipin/Nifedipin, Nicardipin/Propranolol und Nifedipin/Propranolol



0,1 M bzw. 1,0 pM : Konzentration der Testsubstanzenkombinationen
Ref : PBL/Person A, vorinkubiert mit dem mitogenen Lektin Con A (Konzentration 10µg/ml), gemischt mit PBL der Person B; keine Testsubstanzen
P1 : PBL/Person A, vorinkubiert (48 Stunden) mit Con A und der Substanzkombination Nicardipin/Nifedipin (Konzentration 10 ⁻⁷ M bzw. 10 ⁻¹² M), gemischt mit PBL der Person B
P2 : wie P1; hier Substanzkombination Nicardipin/Propranolol (Konzentration 10 ⁻⁷ M bzw. 10 ⁻¹² M)
P3 : wie P1; hier Substanzkombination Nifedipin/Propranolol (Konzentration 10 ⁻⁷ M bzw. 10 ⁻¹² M)

Wie aus Diagramm 14 ersichtlich, stimulieren alle verwendeten Kombinationen PBL; bei einer Konzentration von 10⁻⁷ M als auch bei 10⁻¹² M ist dabei die Kombination aus den beiden Kalzium-Kanal-Blockern Nicardipin und Nifedipin am wirkungsvollsten. Im Unterschied zu Diagramm 4 kommt hier das mitogene Lektin Con A zum Einsatz- der Effekt ist eine Steigerung der PBL-Aktivität.

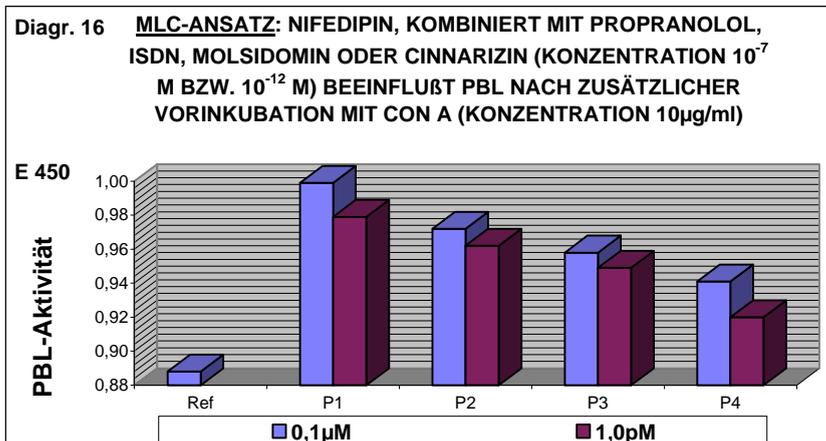
1.2.2.2 Nicardipin/Propranolol verglichen mit Nifedipin/Propranolol



Exp. 1,2,3 :Experiment 1,2,3
Ref : PBL/Person A, vorinkubiert für 48 Stunden mit Con A (Konzentration $10\mu\text{g/ml}$), gemischt mit PBL/Person B; keine Testsubstanzen
P1 : PBL/Person A, vorinkubiert mit Con A und der Substanzkombination Nicardipin und Propranolol (Konzentration 10^{-7} M), gemischt mit PBL der Person B
P2 : wie P1; hier Substanzkombination Nifedipin/Propranolol (Konzentration 10^{-7} M)
P3 : wie P1; Konzentration der Substanzkombination hier 10^{-12} M
P4 : wie P2; Konzentration der Substanzkombination hier 10^{-12} M

Nicardipin in Kombination mit Propranolol wird in Diagramm 15 verglichen mit der Kombination Nifedipin/Propranolol (Konzentration der Substanzkombination jeweils 10^{-7} M bzw. 10^{-12} M) bei zusätzlicher Vorinkubation durch Con A. Anhand der in drei Parallelversuchen dargestellten Werte wird deutlich, daß Nicardipin in Verbindung mit Propranolol (Konzentration 10^{-7} M) die stärkste Verbindung darstellt, gefolgt von dieser Kombination in einer Konzentration von 10^{-12} M. Es besteht nur ein minimaler Unterschied zwischen der letztgenannten Kombination und Nifedipin/Propranolol (Konzentration 10^{-7} M); die geringste stimulierende Wirkung hat das Substanzgemisch Nifedipin/Propranolol in einer Konzentration von 10^{-12} M, der Effekt ist aber im Vergleich zu den Referenzparallelen noch immer deutlich zu sehen.

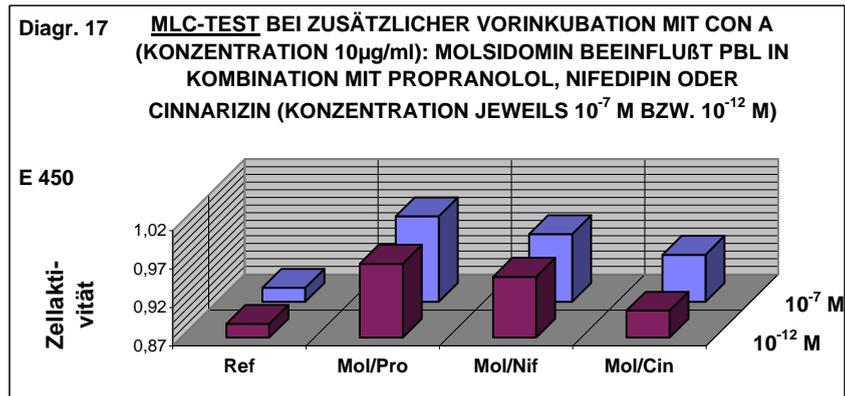
1.2.2.3 Nifedipin kombiniert mit Propranolol, ISDN, Molsidomin oder Cinnarizin



0,1µM bzw. 1,0pM : Konzentration der Testsubstanzkombinationen
Ref : PBL/Person A, vorinkubiert für 48 Stunden mit dem mitogenen Lektin Con A (Konzentration $10\mu\text{g/ml}$), gemischt mit PBL/Person B; keine Testsubstanzen
P1 : PBL der Person A, vorinkubiert (48 Stunden) mit Con A sowie der Substanzkombination Nifedipin/Propranolol (Konzentration 10^{-7} M bzw. 10^{-12} M), gemischt mit PBL der Person B
P2 : wie P1; Substanzkombination hier Nifedipin /ISDN (Konzentration 10^{-7} M bzw. 10^{-12} M)
P3 : wie P1; Substanzkombination hier Nifedipin/Molsidomin (Konzentration 10^{-7} M bzw. 10^{-12} M)
P4 : wie P1 ; Substanzkombination hier Nifedipin /Cinnarizin (Konzentration 10^{-7} M bzw. 10^{-12} M)

Diagramm 16 zeigt im Vergleich zu Diagramm 6 eine Zunahme der PBL-Aktivität bei zusätzlicher Vorinkubation mit dem mitogenen Lektin Con A (Konzentration $10\mu\text{g/ml}$). Auch hier unterscheiden sich die beiden Nitrate nur unwesentlich voneinander, haben aber in Kombination mit Nifedipin eine weniger aktivierende Wirkung als Propranolol.

1.2.2.4 Molsidomin in Kombination mit Propranolol, Nifedipin oder Cinnarizin



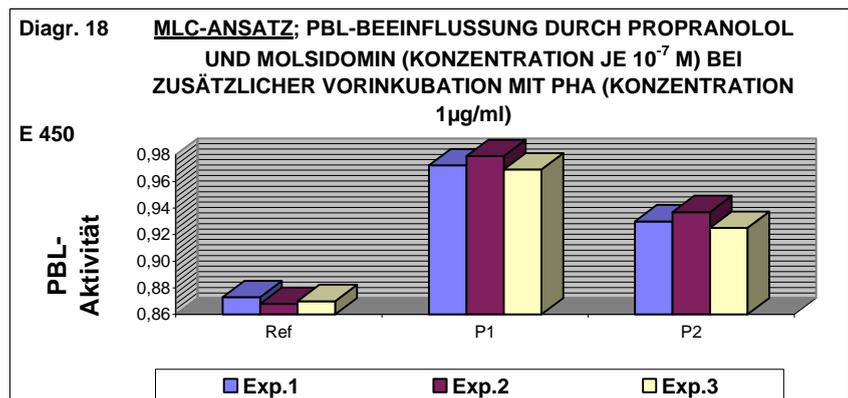
Ref : PBL/Person A, vorinkubiert für 48 Stunden mit dem mitogenen Lektin Con A, gemischt mit PBL/Person B; keine Testsubstanzen
Ref.wert ist für beide Konzentrationen derselbe!
Mol/Pro : Kombination aus Molsidomin und Propranolol (Konzentration 10 ⁻⁷ M bzw. 10 ⁻¹² M)
Mol/Nif : Kombination aus Molsidomin und Nifedipin (Konzentration 10 ⁻⁷ M bzw. 10 ⁻¹² M)
Mol/Cin : Kombination aus Molsidomin und Cinnarizin (Konzentration 10 ⁻⁷ M bzw. 10 ⁻¹² M)

Wie im Diagramm 17 dargestellt führt die zusätzliche Vorinkubation durch Con A zu einer Steigerung der PBL-Aktivität (s. im Vergleich Diagramm 7). In den beiden Konzentrationen 10⁻⁷ M und 10⁻¹² M der Substanzkombinationen erweist sich das Gemisch aus Molsidomin und Propranolol als besonders stimulierend für die PBL, mit kleinem Abstand gefolgt von der Kombination Molsidomin/Nifedipin. Auch hier hat Cinnarizin (zusammen mit Molsidomin) die geringste Wirkung, stimuliert die Zellen aber auch noch in einer Konzentration der Kombination von 10⁻¹² M.

1.3 MLC mit Testsubstanzen, zusätzlich PHA

1.3.1 Vergleich von zwei Testsubstanzen

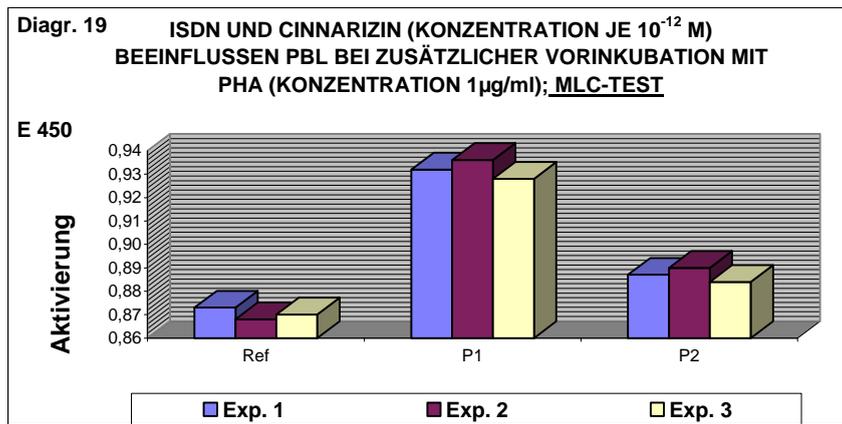
1.3.1.1 Propranolol und Molsidomin



Exp. 1,2,3 : Experiment 1,2,3
Ref : PBL/Person A nach Vorinkubation (48 Stunden) mit dem mitogenen Lektin PHA (Konz. 1µg/ml), gemischt mit PBL/Person B; keine Testsubstanzen
P1 : PBL/Person A, vorinkubiert für 48 Stunden mit PHA und Propranolol (Konzentration 10 ⁻⁷ M), gemischt mit PBL/Person B
P2 : wie P1; anstelle von Propranolol hier Molsidomin (Konzentration 10 ⁻⁷ M)

Diagramm 18 zeigt die Stimulation von PBL unter dem Einfluß von Propranolol bzw. Molsidomin (Konzentration jeweils 10⁻⁷ M) bei zusätzlicher Vorinkubation durch das mitogene Lektin PHA (Konzentration 1µg/ml). Wie man im Vergleich zu den Diagrammen 1 und 11 feststellen kann, ist die Aktivierung von PBL ausgeprägter als im Testansatz ohne Lektine, jedoch geringer als im Testansatz mit Con A.

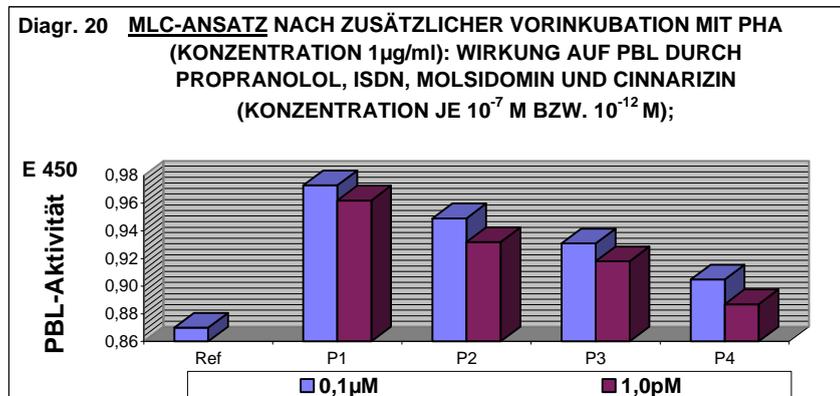
1.3.1.2 ISDN und Cinnarizin



Exp. 1,2,3 : Experiment 1,2,3
Ref : PBL/Person A, vorinkubiert (48 Stunden) mit dem mitogenen Lektin PHA, gemischt mit PBL/Person B; keine Testsubstanzen
P1 : PBL/Person A, 48 Stunden Vorinkubation mit PHA und Isosorbiddinitrat (Konzentr. 10^{-12} M), gemischt mit PBL/Person B
P2 : wie P1; anstelle von ISDN hier Cinnarizin (Konzentration 10^{-12} M)

ISDN und Cinnarizin (Konzentration jeweils 10^{-12} M) aktivieren PBL bei zusätzlicher Vorinkubation mit PHA, wie aus Diagramm 19 ersichtlich ist. ISDN ist der stärkere Stimulator; es besteht ein deutlicher Unterschied zu Cinnarizin. Wie man im Vergleich zum Diagramm 2 feststellen kann, fördert das mitogene Lektin PHA die Aktivierung von PBL zusätzlich.

1.3.1.3 Propranolol, ISDN, Molsidomin und Cinnarizin in einem Testansatz

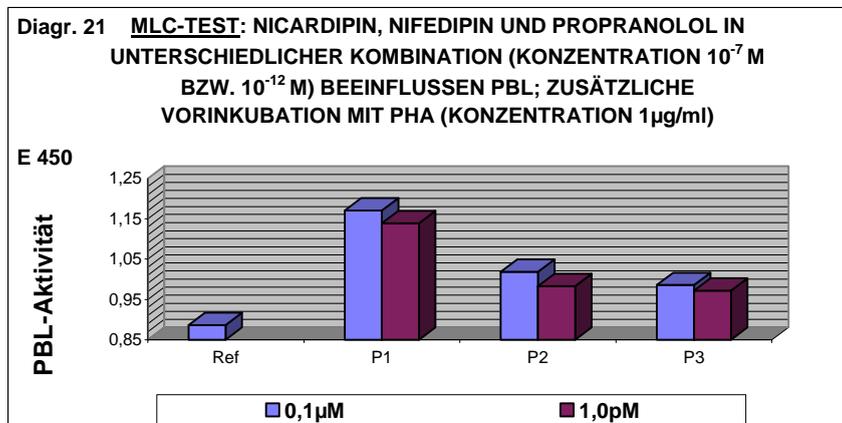


0,1µM bzw. 1,0pM : Konzentration der Testsubstanzen
Ref : PBL/Person A, 48 Stunden vorinkubiert mit dem mitogenen Lektin PHA (Konz. $1\mu\text{g/ml}$), gemischt mit PBL/Person B; keine Testsubstanzen
P1 : PBL/Person A, inkubiert (48 Std.) mit PHA und Propranolol (Konzentr. 10^{-7} M bzw. 10^{-12} M), gemischt mit PBL der Person B
P2 : wie P1; anstelle von Propranolol hier Isosorbiddinitrat (Konzentration 10^{-7} M bzw. 10^{-12} M)
P3 : wie P1; anstelle von Propranolol hier Molsidomin (Konzentration 10^{-7} M bzw. 10^{-12} M)
P4 : wie P1; anstelle von Propranolol hier Cinnarizin (Konzentration 10^{-7} M bzw. 10^{-12} M)

Im Unterschied zum Diagramm 3 erfolgte bei diesem Testansatz (Diagramm 20) eine zusätzliche Vorinkubation mit PHA (Konzentration $1\mu\text{g/ml}$). Dieses Lektin steigert die Stimulation von PBL, jedoch nicht so deutlich wie Con A (z.B. ISDN mit Con A 0,968, mit PHA 0,949 und ohne Lektine 0,932; diese Werte sind Durchschnittswerte).

1.3.2 Vergleich von **Zweier**-Kombinationen der Testsubstanzen bei zusätzlicher Vorinkubation durch **PHA**

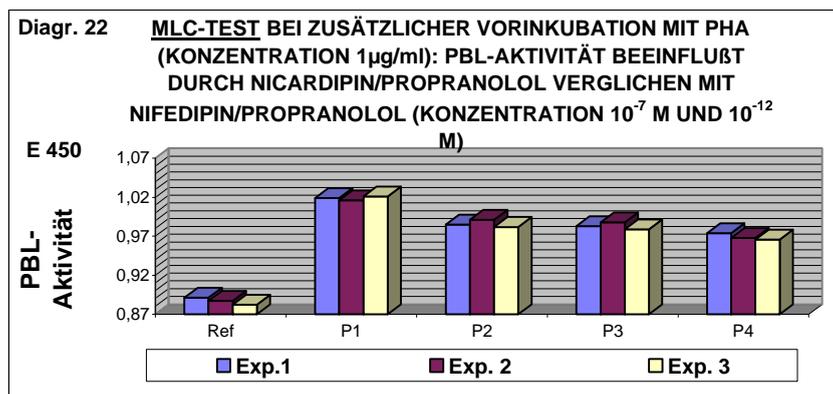
1.3.2.1 Nicardipin/Nifedipin, Nicardipin/Propranolol und Nifedipin/Propranolol im Vergleich



0,1µM bzw. 1,0pM : Konzentration der Testsubstanzkombinationen
Ref: PBL/Person A, vorinkubiert (48 Stunden) mit dem mitogenen Lektin PHA, gemischt mit PBL/Person B; keine Testsubstanzen
P1 : PBL/Person A, vorinkubiert (48 Stunden) mit PHA sowie der Kombination Nicardipin und Nifedipin (Konzentration 10^{-7} M bzw. 10^{-12} M), gemischt mit PBL der Person B
P2 : wie P1; hier Kombination aus Nicardipin und Propranolol (Konzentration 10^{-7} M bzw. 10^{-12} M)
P3 : wie P1; hier Kombination aus Nifedipin und Propranolol (Konzentration 10^{-7} M bzw. 10^{-12} M)

In unterschiedlicher Kombination stimulieren die Testsubstanzen Nicardipin, Nifedipin und Propranolol (Konzentration jeweils 10^{-7} M bzw. 10^{-12} M) PBL, wie aus Diagramm 21 ersichtlich ist. Am deutlichsten wird diese Tatsache bei der Kombination Nicardipin/Nifedipin; die beiden Kalzium-Kanal-Blocker fördern die PBL-Aktivität bei zusätzlicher Vorinkubation durch PHA, aber auch durch Con A (Diagramm 14) oder ohne Lektine (Diagramm 6) am meisten.

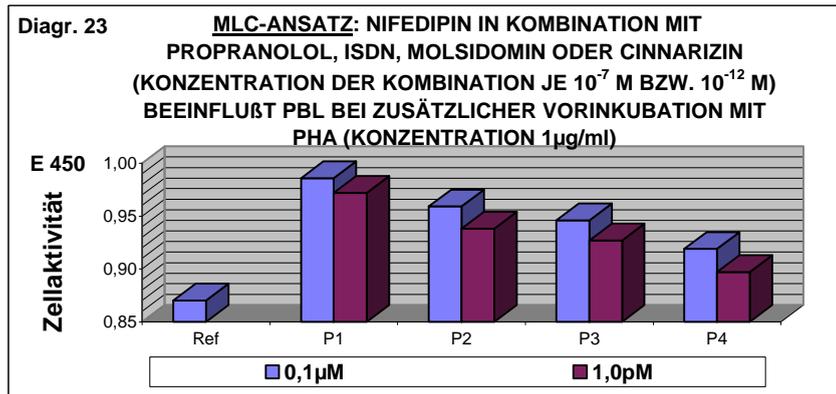
1.3.2.2 Nicardipin/Propranolol und Nifedipin/Propranolol



Exp. 1,2,3 : Experiment 1,2,3
Ref : PBL/Person A, vorinkubiert mit dem mitogenen Lektin PHA (Konzentration $1\mu\text{g/ml}$), gemischt mit PBL/Person B; keine Testsubstanzen
P1 : PBL/Person A, für 48 Stunden vorinkubiert mit PHA sowie der Kombination Nicardipin und Propranolol (Konzentration 10^{-7} M), gemischt mit PBL/Person B
P2 : wie P1; hier Kombination Nifedipin/Propranolol (Konzentration 10^{-7} M)
P3 : wie P1; hier Konzentration der Substanzkombination 10^{-12} M
P4 : wie P2; hier Konzentration der Substanzkombination 10^{-12} M

Bei zusätzlicher Vorinkubation mit dem mitogenen Lektin PHA (Konzentration $1\mu\text{g/ml}$) fördern Nicardipin und Nifedipin, jeweils in Kombination mit Propranolol, die Aktivität von peripheren Blut-Lymphozyten (Diagramm 22). Im Vergleich zum Testansatz in Diagramm 15 fällt auf, daß PHA die Zellen zwar stimuliert, aber nicht so ausgeprägt wie Con A.

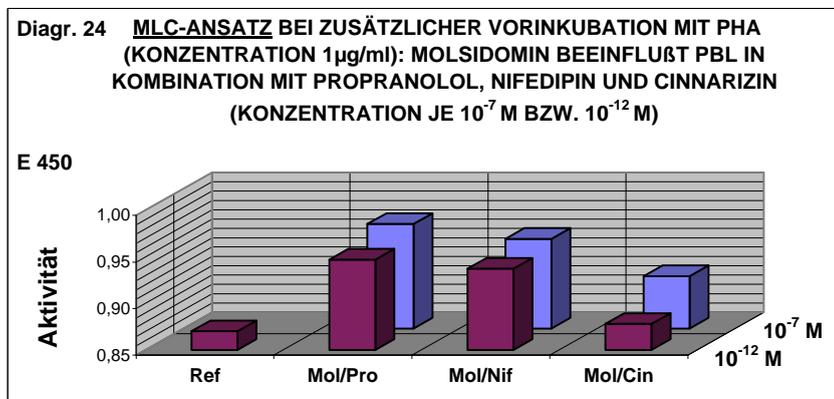
1.3.2.3 Nifedipin kombiniert mit Propranolol, ISDN, Molsidomin oder Cinnarizin



0,1µM bzw. 1,0pM : Konzentration der Testsubstanzkombinationen
Ref : PBL/Person A, vorinkubiert (48 Std.) mit dem mitogenen Lektin PHA (Konzentration $1\mu\text{g/ml}$), gemischt mit PBL/Person B; keine Testsubstanzen
P1 : PBL/Person A, für 48 Stunden vorinkubiert mit PHA sowie der Substanzkombination Nifedipin/Propranolol (Konzentration 10^{-7} M bzw. 10^{-12} M), gemischt mit PBL/Person B
P2 : wie P1; hier Substanzkombination Nifedipin/Isosorbiddinitrat (Konzentr. 10^{-7} M bzw. 10^{-12} M)
P3 : wie P1; hier Kombination aus Nifedipin und Molsidomin (Konzentration 10^{-7} M bzw. 10^{-12} M)
P4 : wie P1; hier Kombination aus Nifedipin und Cinnarizin (Konzentration 10^{-7} M bzw. 10^{-12} M)

In Kombination mit Propranolol, ISDN, Molsidomin oder Cinnarizin (Konzentration jeweils 10^{-7} M bzw. 10^{-12} M) stimuliert Nifedipin PBL bei zusätzlicher Vorinkubation durch PHA (Konzentration $1\mu\text{g/ml}$). Die potenteste Kombination ist diejenige mit dem β -Blocker Propranolol; in beiden Konzentrationen ist die Aktivierung der PBL im Diagramm 23 am deutlichsten zu sehen.

1.3.2.4 Molsidomin kombiniert mit Propranolol, Nifedipin oder Cinnarizin

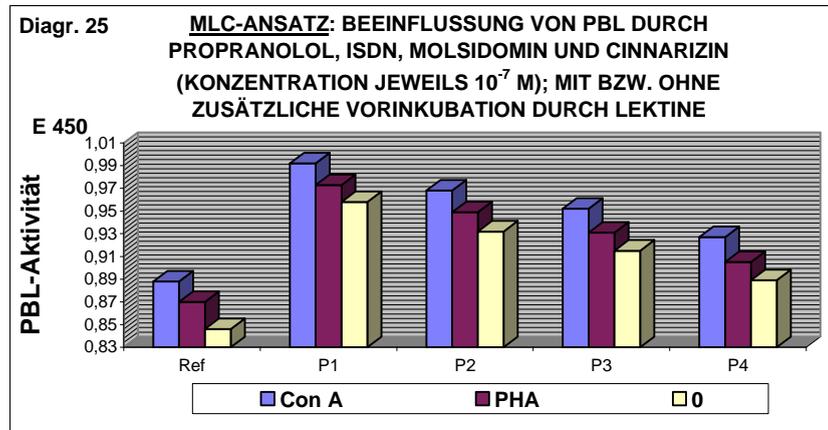


Ref : PBL/Person A, vorinkubiert für 48 Stunden mit PHA (Konzentration $1\mu\text{g/ml}$), gemischt mit PBL/Person B; keine Testsubstanzen Ref.wert ist für beide Konzentration derselbe!
Mol/Pro : Molsidomin kombiniert mit Propranolol (Konzentration 10^{-7} M bzw. 10^{-12} M)
Mol/Nif : Molsidomin kombiniert mit Nifedipin (Konzentration 10^{-7} M bzw. 10^{-12} M)
Mol/Cin : Molsidomin kombiniert mit Cinnarizin (Konzentration 10^{-7} M bzw. 10^{-12} M)

Wie aus Diagramm 24 ersichtlich, führt Molsidomin in unterschiedlichen Kombinationen zu einer Steigerung der PBL-Aktivität. Kombiniert mit Propranolol wirkt es am stärksten stimulierend, unterstützt durch das mitogene Lektin PHA. Zwar wird durch das Lektin Con A eine deutlichere Stimulation der PBL (Diagramm 17) erreicht, durch PHA ist diese aber immer noch ausgeprägter als ohne Lektine (Diagramm 8). Die Kombination Molsidomin/Cinnarizin zeigt hier eine geringfügig stärkere Aktivierung der PBL als der Referenzwert ohne Testsubstanzen, jeweils bei zusätzlicher Vorinkubation durch PHA.

1.4 MLC mit Testsubstanzen, **mit** bzw. **ohne** Lektine

1.4.1 Propranolol, ISDN, Molsidomin und Cinnarizin in einem Testansatz

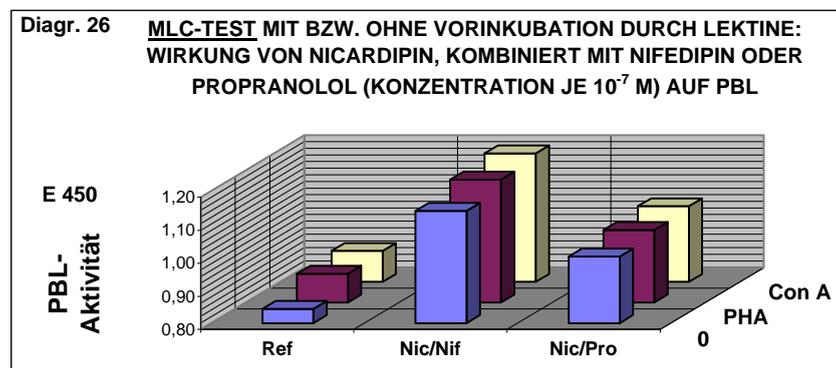


Con A : mitogenes Lektin, Konzentration 10µg/ml
PHA : mitogenes Lektin, Konzentration 1µg/ml
0 : keine Lektine
Ref : PBL/Person A, mit oder ohne Vorinkubation (48 Stunden) durch Lektine, gemischt mit PBL/Person B; keine Testsubstanzen
P1 : PBL/Person A, vorinkubiert für 48 Stunden mit Propranolol (Konzentration 10^{-7} M), mit oder ohne Lektine; gemischt mit PBL/Person B
P2 : wie P1; anstelle von Propranolol hier Isosorbiddinitrat (Konzentration 10^{-7} M)
P3 : wie P1; anstelle von Propranolol hier Molsidomin (Konzentration 10^{-7} M)
P4 : wie P1; anstelle von Propranolol hier Cinnarizin (Konzentration 10^{-7} M)

Im Unterschied zu den Diagrammen 3, 13 und 20 wird hier im Diagramm 25 die Stimulation von PBL durch die vier Testsubstanzen (Konzentration jeweils 10^{-7} M) mit und ohne zusätzliche Vorinkubation durch Lektine dargestellt. Neben der inzwischen bekannten Tatsache, daß Propranolol der stärkste und Cinnarizin der schwächste Aktivator ist, fällt auf, dass die Lektine einen entscheidenden Beitrag zur Stimulation der PBL leisten. Dabei wirkt Con A etwas stärker als PHA; das letztere fördert die PBL aber immer noch mehr, als dies beim Testansatz ohne Lektine der Fall ist.

1.4.2 Vergleich von **Zweier**-Kombinationen der Testsubstanzen, **mit** bzw. **ohne** Lektine

1.4.2.1 Nicardipin/Nifedipin verglichen mit Nicardipin/Propranolol

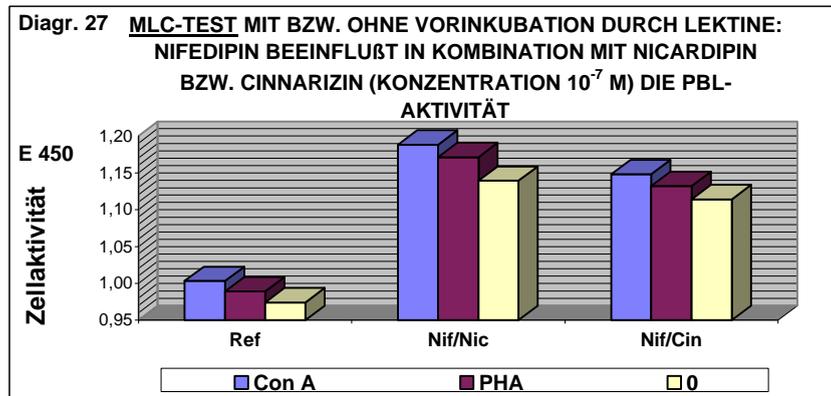


Con A : mitogenes Lektin; Konzentration 10µg/ml
PHA : mitogenes Lektin; Konzentration 1µg/ml
0 : keine Lektine
Ref : PBL/Person A, mit/ohne Vorinkubation (48 Stunden) durch Lektine, gemischt mit PBL der Person B; keine Testsubstanzen
Nic/Nif : Nicardipin kombiniert mit Nifedipin (Konzentration 10^{-7} M)
Nic/Pro : Nicardipin kombiniert mit Propranolol (Konzentration 10^{-7} M)

Wie im Diagramm 26 zu erkennen ist, tragen die mitogenen Lektine einen entscheidenden Anteil zur Stimulation von PBL bei; Con A wirkt dabei etwas stärker als PHA. Im Vergleich zum Referenzwert ohne

Testsubstanzen fällt auf, daß die Kombination Nicardipin/Nifedipin deutlich mehr die PBL-Aktivität fördert als die Kombination Nifedipin/Propranolol (Konzentration jeweils 10^{-7} M).

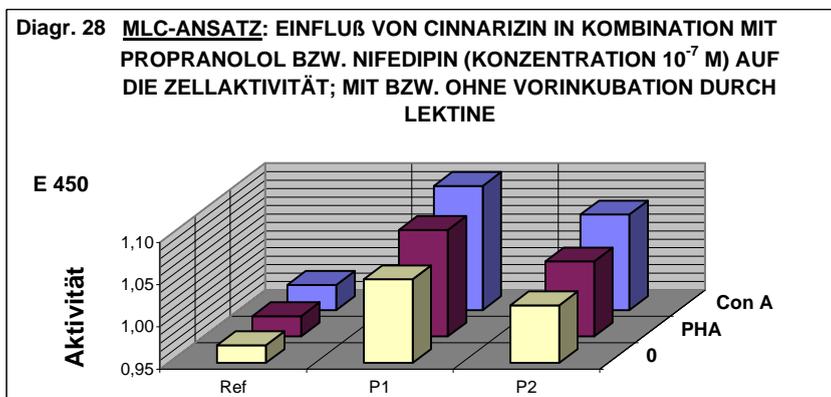
1.4.2.2 Nifedipin/Nicardipin und Nifedipin/Cinnarizin



Con A : mitogenes Lektin; Konzentration 10µg/ml
PHA : mitogenes Lektin; Konzentration 1µg/ml
0 : keine Lektine
Ref : PBL/Person A, mit bzw. ohne Vorinkubation (48 Std.) durch Lektine, gemischt mit PBL der Person B; keine Testsubstanzen
Nif/Nic : Kombination aus Nifedipin und Nicardipin (Konzentration 10^{-7} M)
Nif/Cin : Kombination aus Nifedipin und Cinnarizin (Konzentration 10^{-7} M)

Diagramm 27 demonstriert den Vergleich der stimulierenden Wirkung von Nifedipin/Nicardipin und Nifedipin/Cinnarizin auf PBL- mit oder ohne Vorinkubation durch mitogene Lektine. Im Gegensatz zu den bisherigen Testansätzen fällt hier auf, daß der Unterschied von Nicardipin und Cinnarizin in Kombination mit Nifedipin nicht groß ist (Differenz der Extinktionswerte 0,02). Der Einfluß der Lektine ist auch hier wieder gut zu erkennen.

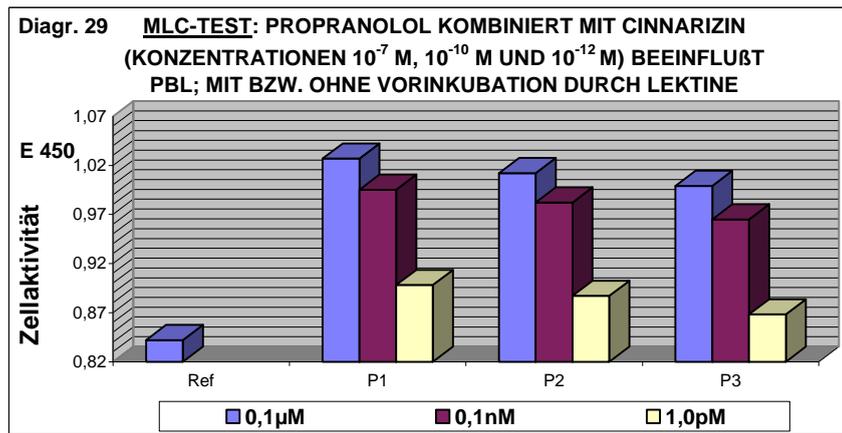
1.4.2.3 Cinnarizin kombiniert mit Propranolol oder Nifedipin



Con A : mitogenes Lektin; Konzentration 10µg/ml
PHA : mitogenes Lektin; Konzentration 1µg/ml
0 : keine Lektine
Ref : PBL/Person A, mit bzw. ohne Vorinkubation durch Lektine, gemischt mit PBL der Person B; keine Testsubstanzen
P1 : PBL/Person A, vorinkubiert (48 Std.) mit der Substanzkombination Cinnarizin/Propranolol (Konzentration 10^{-7} M), mit bzw. ohne Lektine, gemischt mit PBL der Person B
P2 : wie P1; hier Substanzkombination Cinnarizin/Nifedipin (Konzentration 10^{-7} M)

Der Einfluß von Cinnarizin in unterschiedlicher Kombination mit Propranolol oder Nifedipin auf die Aktivität von PBL mit bzw. ohne zusätzliche Vorinkubation durch Lektine ist im Diagramm 28 dargestellt. Con A und PHA verstärken die PBL-Stimulation, Con A etwas mehr als PHA. Das Substanzengemisch Cinnarizin/Propranolol hat eine etwas ausgeprägtere Wirkung auf PBL als Cinnarizin in Verbindung mit Nifedipin.

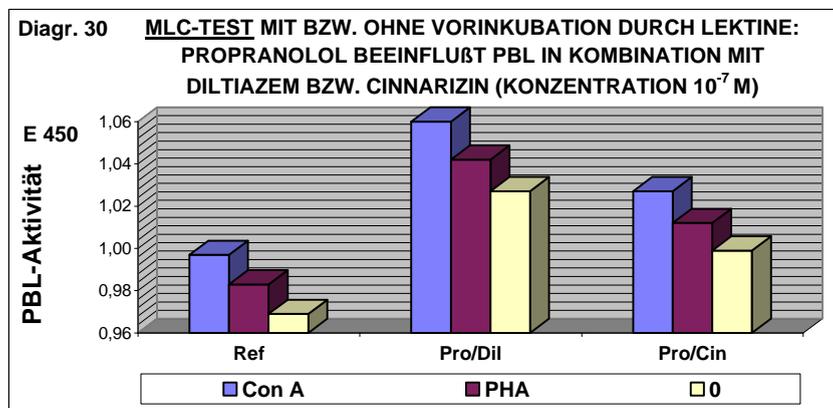
1.4.2.4 Propranolol/Cinnarizin in drei Konzentrationen



0,1µM, 0,1nM, 1,0pM : Konzentration der Testsubstanzen
Ref : PBL der Person A ohne Lektine, ohne Testsubstanzen, gemischt mit PBL/Person B
P1 : PBL/Person A, vorinkubiert für 48 Stunden mit dem mitogenen Lektin Con A (Konzentration 10µg/ml) sowie der Substanzkombination Propranolol/Cinnarizin (Konzentration 10^{-7} M, 10^{-10} M bzw. 10^{-12} M); gemischt mit PBL der Person B
P2 : wie P1; anstelle von Con A hier mitogenes Lektin PHA (Konzentration 1µg/ml)
P3 : wie P1; hier keine mitogenen Lektine

Im Diagramm 29 ist die PBL-aktivierende Wirkung der Substanzkombination Propranolol/Cinnarizin (Konzentrationen 10^{-7} M, 10^{-10} M, 10^{-12} M), mit bzw. ohne Vorinkubation durch Lektine, dargestellt. In allen drei Konzentrationen ist eine verstärkende Wirkung festzustellen, wenn man den Referenzwert als Vergleich heranzieht. Con A und PHA zeigen hier keinen großen Einfluß, die Extinktionswerte sind sehr ähnlich, unabhängig davon, ob eine zusätzliche Vorinkubation durch Lektine erfolgt war.

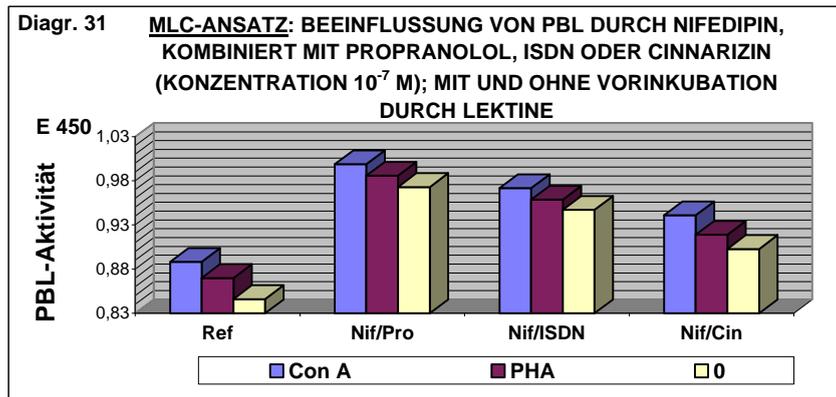
1.4.2.5 Propranolol kombiniert mit Diltiazem oder Cinnarizin



Con A : mitogenes Lektin; Konzentration 10µg/ml
PHA : mitogenes Lektin; Konzentration 1µg/ml
0 : keine Lektine
Ref : PBL/Person A, mit bzw. ohne Vorinkubation durch Lektine, gemischt mit PBL der Person B; keine Testsubstanzen
Pro/Dil : Propranolol kombiniert mit Diltiazem (Konzentration 10^{-7} M)
Pro/Cin : Propranolol kombiniert mit Cinnarizin (Konzentration 10^{-7} M)

In Kombination mit Diltiazem bzw. Cinnarizin stimuliert Propranolol PBL, wie im Diagramm 30 dargestellt ist. Außerdem wird deutlich, daß die beiden Lektine Con A und PHA einen großen Einfluß auf die PBL haben; im Vergleich zu den Zellen ohne Lektine ist eine deutliche Steigerung der Aktivität- auch bei den Referenzwerten- feststellbar. Con A bewirkt die größere Stimulation als PHA.

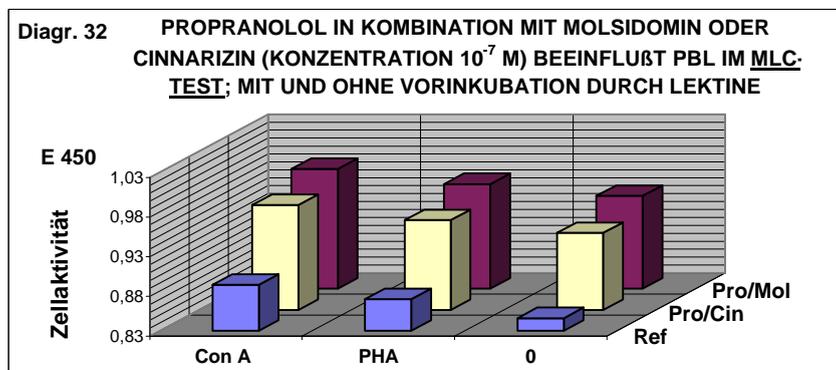
1.4.2.6 Nifedipin kombiniert mit Propranolol, ISDN, Molsidomin oder Cinnarizin



Con A : mitogenes Lektin; Konzentration 10µg/ml
PHA : mitogenes Lektin; Konzentration 1µg/ml
0 : keine Lektine
Ref : PBL/Person A, mit/ohne Vorinkubation (48 Stunden) durch Lektine, gemischt mit PBL der Person B; keine Testsubstanzen
Nif/Pro : Nifedipin kombiniert mit Propranolol (Konzentration 10^{-7} M)
Nif/ISDN : Nifedipin kombiniert mit Isosorbiddinitrat (Konzentration 10^{-7} M)
Nif/Cin : Nifedipin kombiniert mit Cinnarizin (Konzentration 10^{-7} M)

Die Aktivierung von PBL durch Nifedipin in unterschiedlichen Kombinationen ist im Diagramm 31 gezeigt. Dabei wirkt das Gemisch aus Nifedipin und Propranolol, wie bereits in den Diagrammen 7, 16 und 23 dargestellt, am stärksten auf die Stimulation von PBL. Auch hier wird wieder die zusätzliche aktivierende Wirkung der Lektine Con A und PHA deutlich in der bekannten Abstufung.

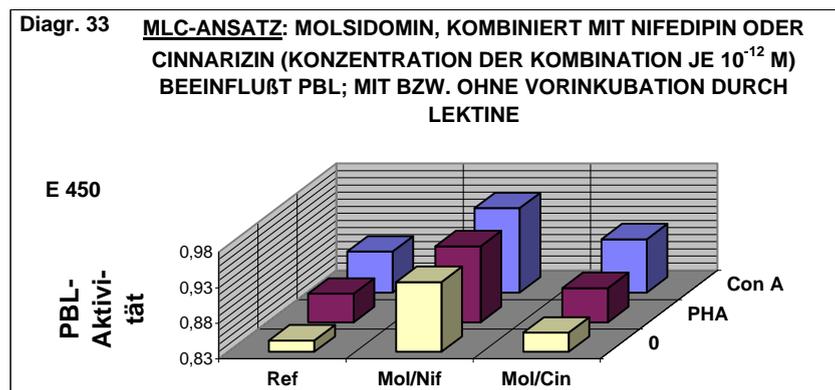
1.4.2.7 Propranolol/Molsidomin verglichen mit Propranolol/Cinnarizin



Con A : mitogenes Lektin; Konzentration 10µg/ml
PHA : mitogenes Lektin; Konzentration 1µg/ml
0 : keine Lektine
Ref : PBL/Person A, mit/ohne Vorinkubation durch Lektine, gemischt mit PBL/Person B; keine Testsubstanzen
Pro/Mol : Propranolol kombiniert mit Molsidomin (Konzentration 10^{-7} M)
Pro/Cin : Propranolol kombiniert mit Cinnarizin (Konzentration 10^{-7} M)

Ob mit Molsidomin oder Cinnarizin kombiniert- Propranolol hat einen stimulierenden Einfluß auf PBL; dieses wird wieder deutlich im Diagramm 32. Die Substanzkombination Propranolol/Molsidomin wirkt dabei stärker aktivierend als die Kombination Propranolol/Cinnarizin; die Zellen, die mit der letzteren Kombination koinkubiert wurden, zeigen jedoch immer noch eine ausgeprägte Aktivität im Vergleich zu den Zellen ohne Testsubstanzen. Auch in diesem Testansatz bestätigt sich die stimulierende Wirkung der beiden Lektine; Con A wieder deutlicher als PHA.

1.4.2.8 Molsidomin kombiniert mit Nifedipin oder Cinnarizin



Con A : mitogenes Lektin; Konzentration 10 μ g/ml
PHA : mitogenes Lektin; Konzentration 1 μ g/ml
0 : keine Lektine
Ref : PBL/Person A, mit bzw. ohne Vorinkubation (48 Std.) durch Lektine, gemischt mit PBL der Person B; keine Testsubstanzen
Mol/Nif : Molsidomin kombiniert mit Nifedipin (Konzentration 10^{-12} M)
Mol/Cin : Molsidomin kombiniert mit Cinnarizin (Konzentration 10^{-12} M)

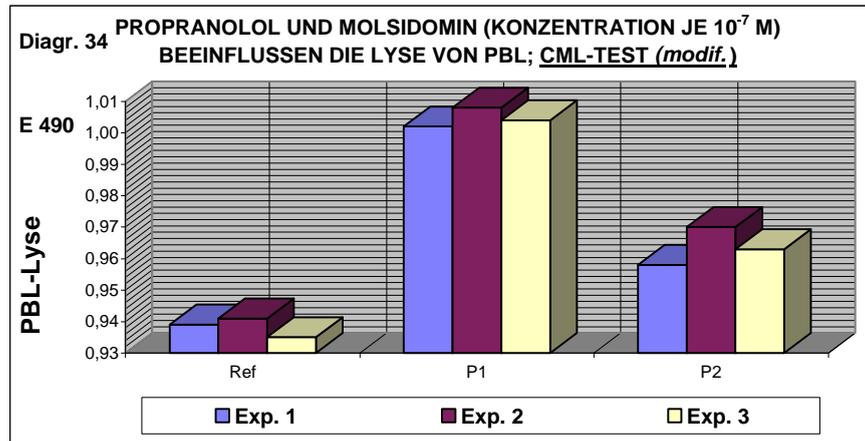
Diagramm 33 zeigt die unterschiedliche Wirkung von Molsidomin auf PBL- kombiniert mit Nifedipin oder Cinnarizin. In beiden Kombinationen stimuliert es die Zellen, mit Nifedipin deutlich stärker als mit Cinnarizin; die mit dem letztgenannten Gemisch inkubierten Zellen unterscheiden sich nicht sehr von den Zellen ohne Testsubstanzen. Desweiteren ist auch hier wieder der stimulierende Einfluß der Lektine zu erkennen.

2 Die zellvermittelte Zytotoxizität- CML (cell-mediated lympholysis, modifiziert)

2.1 CML (modifiziert) mit Testsubstanzen, **keine** Lektine

2.1.1 Vergleich zweier Testsubstanzen

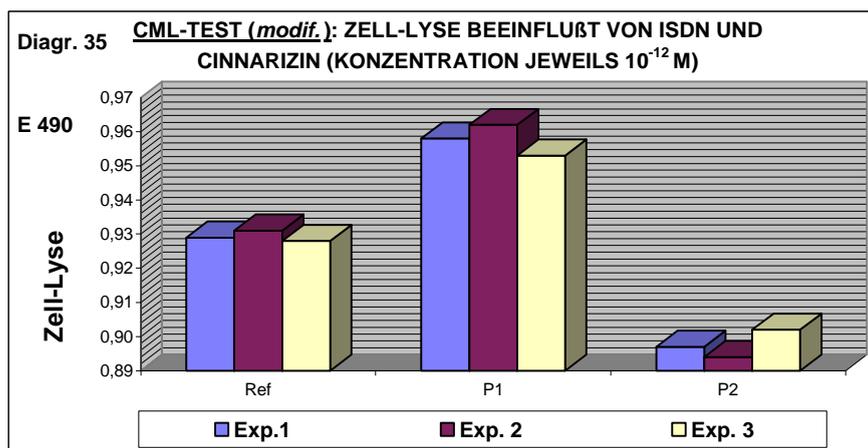
2.1.1.1 Propranolol und Molsidomin



Exp. 1,2,3 : Experiment 1,2,3
Ref : PBL/Person A gemischt mit PBL der Person B; keine Testsubstanzen
P1 : PBL der Person A, 48 Stunden vorinkubiert mit Propranolol (Konzentration 10^{-7} M), gemischt mit PBL der Person B
P2 : wie P1; anstelle von Propranolol hier Molsidomin (Konzentration 10^{-7} M)

Diagramm 34 zeigt den Einfluß der Testsubstanzen Propranolol und Molsidomin (Konzentration jeweils 10^{-7} M) auf die Zytolyse von PBL. Es ist gut zu erkennen, daß die beiden Substanzen im Vergleich zum Referenzwert die Lyse der Zellen fördern- Propranolol mehr als Molsidomin.

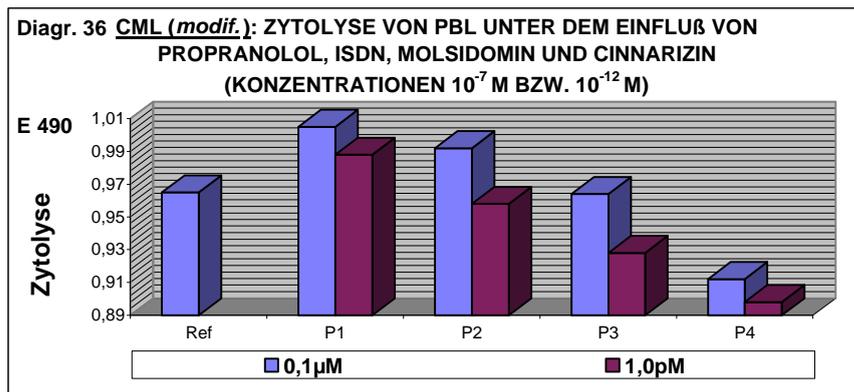
2.1.1.2 ISDN und Cinnarizin



Exp. 1,2,3 : Experiment 1,2,3
Ref : PBL/Person A gemischt mit PBL/Person B; keine Testsubstanzen
P1 : PBL/Person A, 48 Stunden vorinkubiert mit Isosorbiddinitrat (Konzentration 10^{-12} M), gemischt mit PBL/Person B
P2 : wie P1; anstelle von ISDN hier Cinnarizin (Konzentration 10^{-12} M)

Während ISDN deutlich die Lyse von PBL verstärkt (Diagramm 35), ist diese unter dem Einfluß der Testsubstanzen Cinnarizin im Vergleich zum Referenzwert wesentlich geringer (z.B. Extinktionswert des Referenzwertes im Durchschnitt der drei Parallelansätze 0,935, der Wert mit Cinnarizin dagegen 0,897).

2.1.1.3 Propranolol, ISDN, Molsidomin und Cinnarizin in einem Testansatz

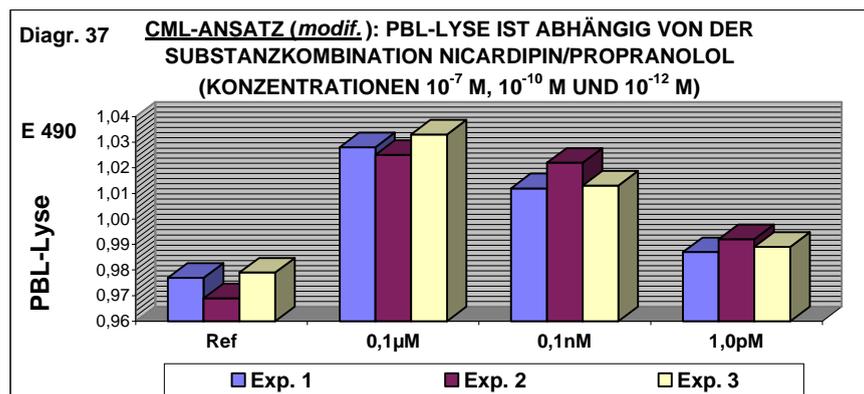


0,1µM, 1,0pM : Konzentrationen der Testsubstanzen
Ref : PBL/Person A gemischt mit PBL/Person B; keine Testsubstanzen
P1 : PBL/Person A, vorinkubiert (48 Std.) mit Propranolol (Konzentration 10^{-7} M bzw. 10^{-12} M), gemischt mit PBL/Person B
P2 : wie P1; anstelle von Propranolol hier Isosorbiddinitrat (Konzentration 10^{-7} M bzw. 10^{-12} M)
P3 : wie P1; anstelle von Propranolol hier Molsidomin (Konzentration 10^{-7} M bzw. 10^{-12} M)
P4 : wie P1; anstelle von Propranolol hier Cinnarizin (Konzentration 10^{-7} M bzw. 10^{-12} M)

Wie aus Diagramm 36 ersichtlich, fördern Propranolol (in den Konzentrationen 10^{-7} M und 10^{-12} M) und ISDN (bei einer Konzentration von 10^{-7} M) die Zytolyse von PBL; die Zellen mit der Testsubstanz Molsidomin (bei einer Konzentration von 10^{-7} M) verhalten sich ähnlich wie die Zellen ohne Testsubstanzen. Ist jedoch Molsidomin höher verdünnt (Konzentration 10^{-12} M), ist der Einfluß auf die Lyse bereits deutlich abgeschwächt. Cinnarizin hemmt die Zytolyse in beiden Konzentrationen (s. auch Diagramm 35).

2.1.2 Vergleich von **Zweier**-Kombinationen der Testsubstanzen

2.1.2.1 Nicardipin/Propranolol in drei Konzentrationen



Exp. 1,2,3 : Experiment 1,2,3
0,1µM, 0,1nM und 1,0pM : Konzentration der Substanzkombination
Ref : PBL/Person A gemischt mit PBL der Person B; keine Testsubstanzen

Die Kombination der Testsubstanzen Nicardipin und Propranolol stimuliert in drei verschiedenen Konzentrationen (10^{-7} M, 10^{-10} M und 10^{-12} M) die Lyse von peripheren Blut-Lymphozyten, wie man im Diagramm 37 erkennen kann. Im Vergleich zu den Extinktionswerten der jeweils drei Parallelversuche ist eine deutliche Verstärkung der Zytolyse zu sehen, die bei einer Konzentration von 10^{-12} M der Substanzenkombination etwas schwächer ausfällt.

2.1.2.2 Nifedipin/Propranolol in drei Konzentrationen

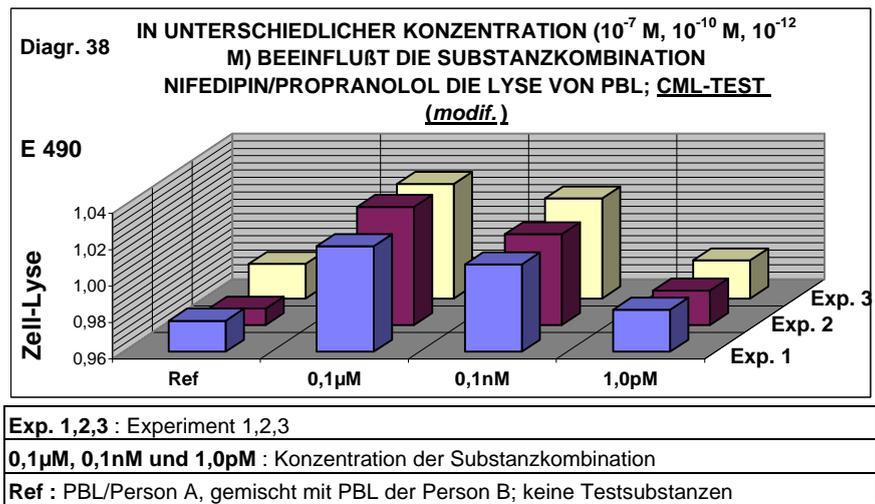
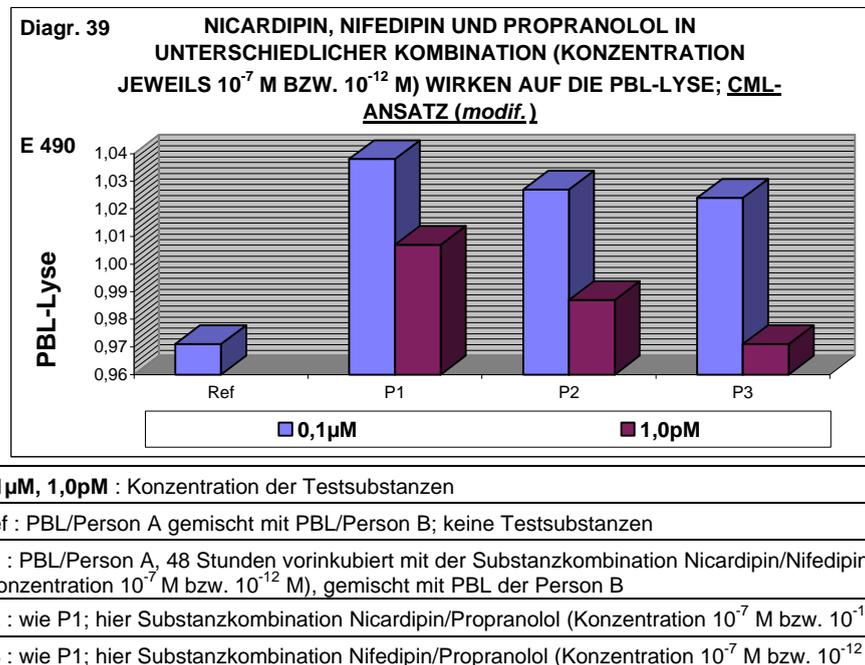


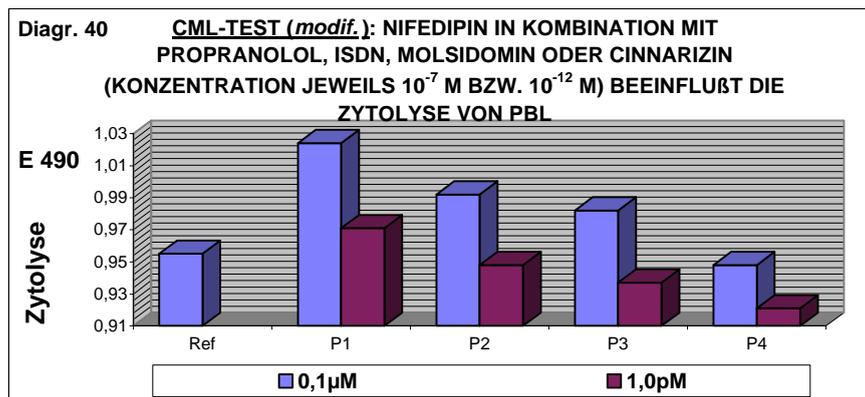
Diagramm 38 zeigt die Auswirkung der Kombination Nifedipin /Propranolol in verschiedenen Konzentrationen (10^{-7} M, 10^{-10} M und 10^{-12} M) auf die Lyse von PBL. Wie man gut erkennen kann, ist diese deutlich stimuliert bei den Konzentrationen von 10^{-7} M und 10^{-10} M. Im Vergleich zu den Referenzparallelen ist bei einer Konzentration von 10^{-12} M keine große Steigerung zu sehen.

2.1.2.3 Nicardipin/Nifedipin, Nicardipin/Propranolol und Nifedipin/Propranolol



Die Testsubstanzen Nicardipin, Nifedipin und Propranolol fördern in allen Kombinationen die Lyse von PBL, wie in Diagramm 39 zu sehen ist. Die stärkste Verbindung ist Nicardipin kombiniert mit Propranolol, der Unterschied zum Referenzwert ist ziemlich groß. Bei einer Konzentration von 10^{-7} M verhalten sich die beiden Kombinationen aus Nicardipin/Propranolol und Nifedipin/Propranolol sehr ähnlich; bei einer Konzentration von 10^{-12} M fällt das Gemisch Nifedipin/Propranolol etwas ab und zeigt keinen Unterschied zum Referenzwert.

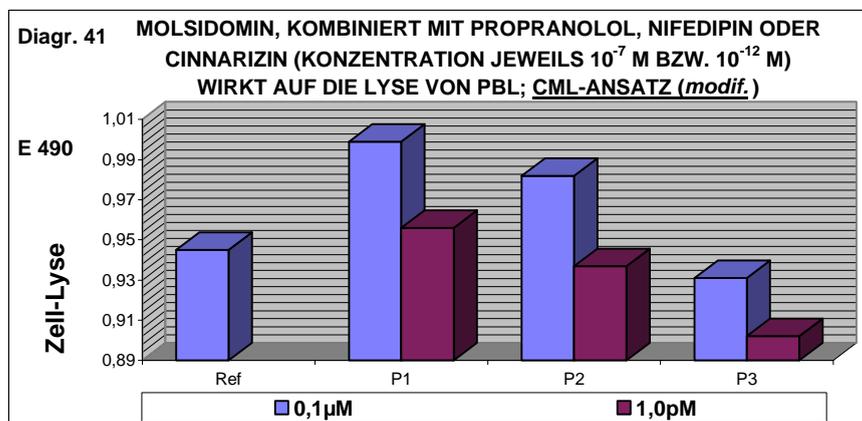
2.1.2.4 Nifedipin in Kombination mit Propranolol, ISDN, Molsidomin und Cinnarizin



0,1µm, 1,0pM : Konzentration der Testsubstanzen
Ref : PBL/Person A gemischt mit PBL/Person B; keine Testsubstanzen
P1 : PBL/Person A, vorinkubiert (48 Std.) mit der Substanzkombination Nifedipin/Propranolol (Konzentration 10^{-7} M bzw. 10^{-12} M), gemischt mit PBL der Person B
P2 : wie P1; hier Substanzkombination Nifedipin/Isosorbiddinitrat (Konzentr. 10^{-7} M bzw. 10^{-12} M)
P3 : wie P1; hier Substanzkombination Nifedipin/Molsidomin (Konzentration 10^{-7} M bzw. 10^{-12} M)
P4 : wie P1; hier Substanzkombination Nifedipin/Cinnarizin (Konzentration 10^{-7} M bzw. 10^{-12} M)

Diagramm 40 demonstriert, daß Nifedipin in Kombination mit Propranolol, ISDN oder Molsidomin bei einer Konzentration von jeweils 10^{-7} M die Zytolyse verstärken, wenn man den Referenzwert zum Vergleich heranzieht. Kombiniert mit den beiden Nitraten ISDN oder Molsidomin, hemmt Nifedipin bei einer Konzentration von 10^{-12} M im Vergleich zum Referenzwert die Lyse von PBL. Nimmt man Cinnarizin zu Nifedipin dazu, tritt wieder ein Abfall in der LDH-Freisetzung in beiden Konzentrationen auf (vergleiche auch Diagramme 35 und 36).

2.1.2.5 Molsidomin in Kombination mit Propranolol, Nifedipin oder Cinnarizin

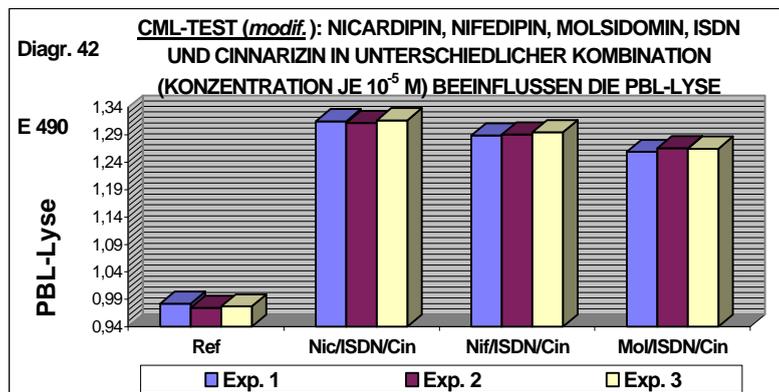


0,1µM bzw. 1,0pM : Konzentration der Substanzkombinationen
Ref : PBL/Person A gemischt mit PBL der Person B; keine Testsubstanzen
P1 : PBL/Person A, vorinkubiert für 48 Stunden mit der Substanzkombination Molsidomin und Propranolol (Konzentration 10^{-7} M bzw. 10^{-12} M), gemischt mit PBL der Person B
P2 : wie P1; hier Substanzkombination Molsidomin/Nifedipin (Konzentration 10^{-7} M bzw. 10^{-12} M)
P3 : wie P1; hier Substanzkombination Molsidomin/Cinnarizin (Konzentration 10^{-7} M bzw. 10^{-12} M)

In der Konzentration von 10^{-7} M fördern die Kombinationen Molsidomin/Propranolol und Molsidomin/Nifedipin die Lyse von PBL (Diagramm 41). Bei einer Konzentration von 10^{-12} M ist dieser Effekt nur noch bei der Kombination mit Propranolol zu sehen; bei allen anderen fällt die Zytolyse im Vergleich zum Referenzwert geringer aus. Auch hemmt die Kombination mit Cinnarizin die Lyse in beiden Konzentrationen.

2.1.3 Vergleich von **Dreier**-Kombinationen der Testsubstanzen

2.1.3.1 Nicardipin/ISDN/Cinnarizin, Nifedipin/ISDN/Cinnarizin und Molsidomin/ISDN/Cinnarizin



Exp. 1,2,3 : Experiment 1,2,3

Ref : PBL/Person A gemischt mit PBL der Person B; keine Testsubstanzen

Nic/ISDN/Cin : Kombination Nicardipin, Isosorbiddinitrat und Cinnarizin (Konzentration 10^{-5} M)

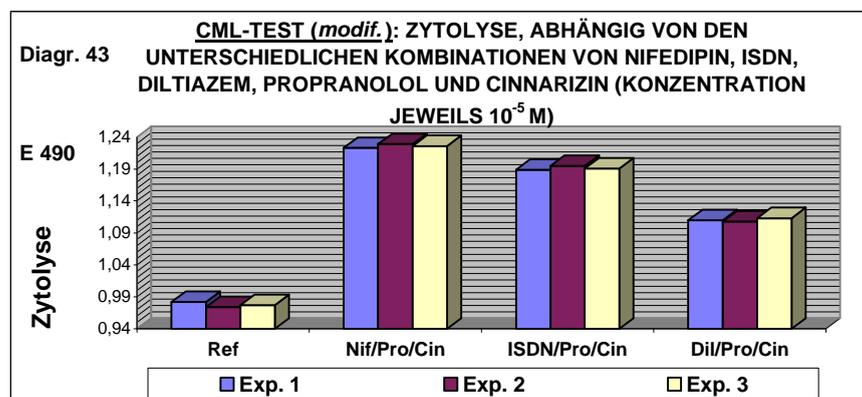
Nif/ISDN/Cin : Kombination Nifedipin, Isosorbiddinitrat und Cinnarizin (Konzentration 10^{-5} M)

Mol/ISDN/Cin : Kombination Molsidomin, Isosorbiddinitrat und Cinnarizin (Konzentration 10^{-5} M)

PBL/Person vorinkubiert mit den Testsubstanzen für 48 Stunden, dann gemischt mit PBL der Person B

Wie man in Diagramm 42 erkennen kann, wird die Lyse von peripheren Blut-Lymphozyten durch die drei Substanzkombinationen gefördert. Im Vergleich zum Referenzwert ist eine deutliche Steigerung in der LDH-Freisetzung zu sehen. Die Unterschiede der Wirkungen sind nicht groß; die stärkste Kombination ist die aus Nicardipin/ISDN und Cinnarizin.

2.1.3.2 Nifedipin/Propranolol/Cinnarizin, ISDN/Propranolol/Cinnarizin und Diltiazem/Propranolol/Cinnarizin



Exp. 1,2,3 : Experiment 1,2,3

Ref : PBLs/Person A gemischt mit PBLs der Person B; keine Testsubstanzen

Nif/Pro/Cin : Kombination aus Nifedipin, Propranolol und Cinnarizin (Konzentration 10^{-5} M)

ISDN/Pro/Cin : Kombination aus Isosorbiddinitrat, Propranolol und Cinnarizin (Konzentr. 10^{-5} M)

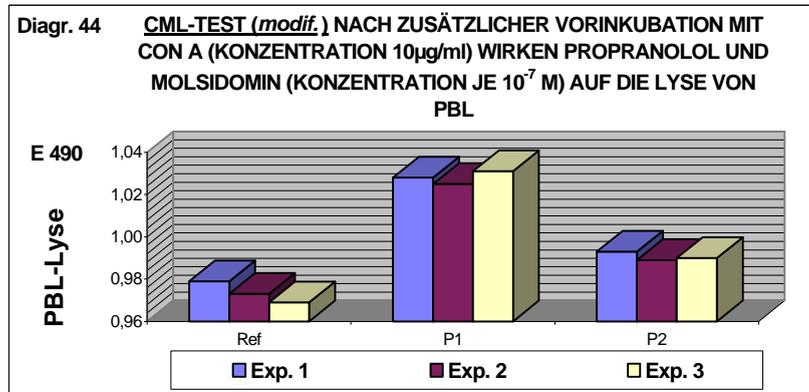
Dil/Pro/Cin : Kombination aus Diltiazem, Propranolol und Cinnarizin (Konzentration 10^{-5} M)

Die Kombination aus Nifedipin, Propranolol und Cinnarizin hat in diesem Testansatz den größten Einfluß auf die Lyse von PBL (Diagramm 43). Wie die Werte der drei Parallelversuche zeigen, ist das Gemisch aus Diltiazem, Propranolol und Cinnarizin am schwächsten, es hat aber immer noch eine deutlich bessere zytolytische Wirkung als das Gemisch ohne Testsubstanzen.

2.2 CML (*modifiziert*) mit Testsubstanzen, zusätzlich **Con A**

2.2.1 Vergleich zweier Testsubstanzen

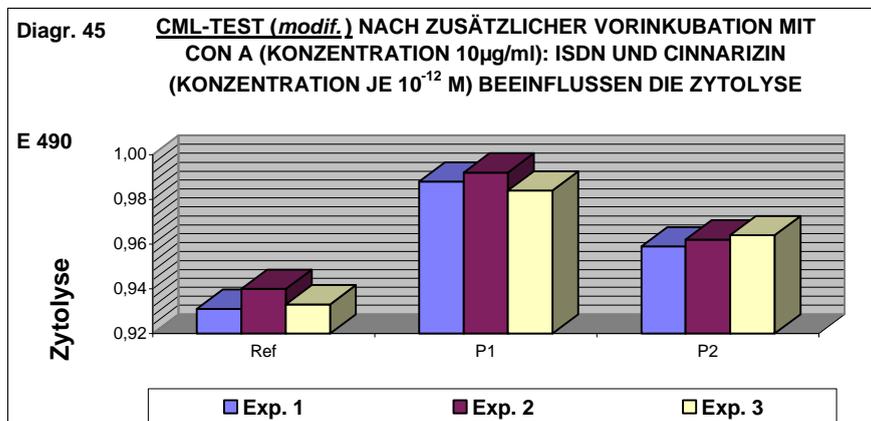
2.2.1.1 Propranolol und Molsidomin



Exp. 1,2,3 : Experiment 1,2,3
Ref : PBL/Person A, vorinkubiert (48 Std.) mit dem mitogenen Lektin Con A (Konzentr. 10µg/ml), gemischt mit PBL der Person B; keine Testsubstanzen
P1 : PBL/Person A, vorinkubiert (48 Stunden) mit Propranolol (Konzentration 10 ⁻⁷ M) und Con A, gemischt mit PBL der Person B
P2 : wie P1; anstelle von Propranolol hier Molsidomin (Konzentration 10 ⁻⁷ M)

Diagramm 44 zeigt die Verstärkung der Zytolyse bei zusätzlicher Vorinkubation durch Con A (Konzentration 10µg/ml). Wenn man zum Vergleich das Diagramm 34 heranzieht, fällt auf, dass die Extinktionswerte hier höher ausfallen (Beispiel Propranolol und Con A Extinktionswert 1,028, dagegen Propranolol alleine 1,005).

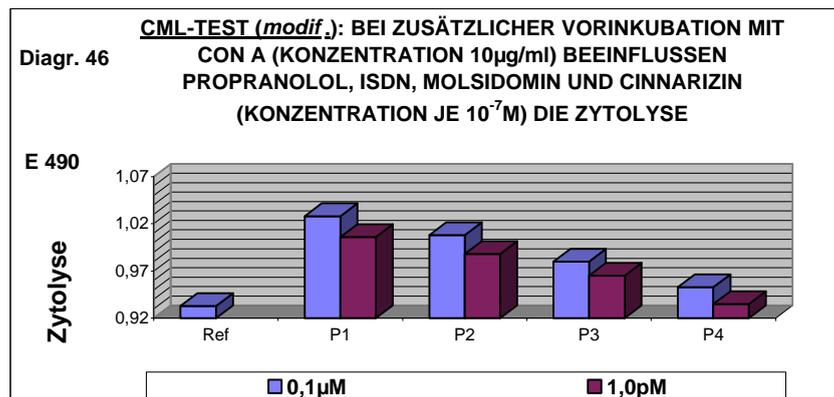
2.2.1.2 ISDN und Cinnarizin



Exp. 1,2,3 : Experiment 1,2,3
Ref : PBL/Person A, vorinkubiert (48 Std.) mit dem mitogenen Lektin Con A (Konzentration 10µg/ml), gemischt mit PBL der Person B; keine Testsubstanzen
P1 : PBL/Person A, vorinkubiert (48 Std.) mit Isosorbiddinitrat (Konzentration 10 ⁻¹² M) und Con A, gemischt mit PBL der Person B
P2 : wie P1; anstelle von ISDN hier Cinnarizin (Konzentration 10 ⁻¹² M)

Unterstützt von Con A zeigen nun auch die Zellen mit der Testsubstanz Cinnarizin eine höher zytolytische Wirkung, wenn man den Referenzwert zum Vergleich heranzieht (Diagramm 45). Die Zellen mit der Testsubstanz ISDN verhalten sich auch hier zytolytisch, im Vergleich zum Testansatz in Diagramm 35 fällt der Extinktionswert höher aus.

2.2.1.3 Propranolol, ISDN, Molsidomin und Cinnarizin in einem Testansatz

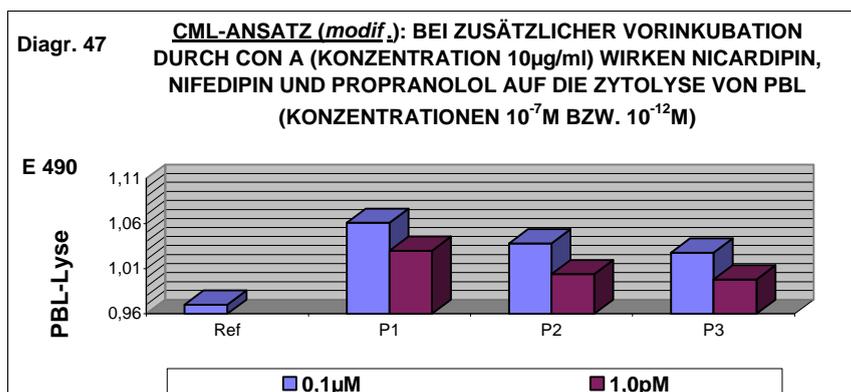


0,1µM bzw. 1,0 pM : Konzentration der Testssubstanzen
Ref : PBL/Person A, vorinkubiert (48 Stunden) mit dem mitogenen Lektin Con A (Konzentration 10µg/ml), gemischt mit PBL der Person B; keine Testssubstanzen
P1 : PBL/Person A, 48 Std. vorinkubiert mit Con A und Propranolol (Konzentr. 10 ⁻⁷ M bzw. 10 ⁻¹² M), gemischt mit PBL der Person B
P2 : wie P1; anstelle von Propranolol hier Isosorbiddinitrat (Konzentration 10 ⁻⁷ M bzw. 10 ⁻¹²)
P3 : wie P1; anstelle von Propranolol hier Molsidomin (Konzentration 10 ⁻⁷ M bzw. 10 ⁻¹² M)
P4 : wie P1; anstelle von Propranolol hier Cinnarizin (Konzentration 10 ⁻⁷ M bzw. 10 ⁻¹² M)

Aus Diagramm 46 ist ersichtlich, daß die zusätzliche Vorinkubation mit dem mitogenen Lektin Con A die Zytolyse weiter fördert. Nun bewirken alle Zellen mit den Tests substanz-Kombinationen (auch diejenige mit Cinnarizin) in beiden Konzentrationen (10⁻⁷ M und 10⁻¹² M) eine höhere LDH-Freisetzung als die Zellen ohne Tests substanz (vergleiche auch Diagramm 35).

2.2.2 Vergleich von **Zweier**-Kombinationen der Tests substanz bei zusätzlicher Vorinkubation durch **Con A**

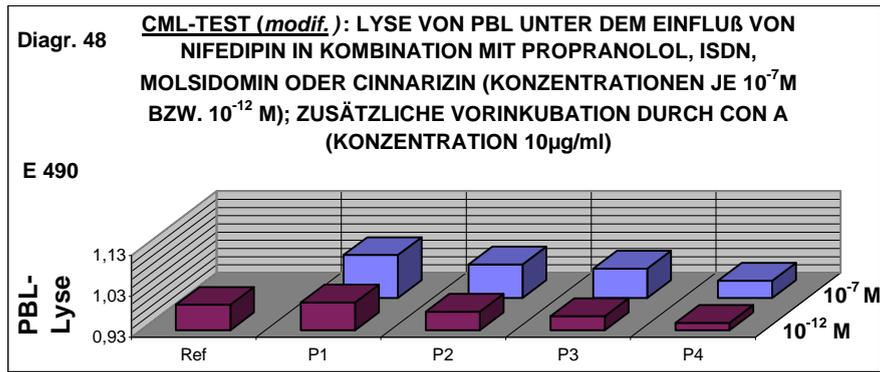
2.2.2.1 Nicardipin/Nifedipin, Nicardipin/Propranolol und Nifedipin/Propranolol



0,1µM bzw. 1,0pM : Konzentration der Substanzkombinationen
Ref : PBL/Person A, vorinkubiert (48 Stunden) mit dem mitogenen Lektin Con A Konzentration 10µg/ml), gemischt mit PBL der Person B; keine Tests substanz
P1 : PBL/Person A, 48 Stunden vorinkubiert mit Con A und der Substanzkombination Nicardipin und Nifedipin (Konzentration 10 ⁻⁷ M bzw. 10 ⁻¹² M), gemischt mit PBL der Person B
P2 : wie P1; hier Substanzkombination Nicardipin/Propranolol (Konzentration 10 ⁻⁷ M bzw. 10 ⁻¹² M)
P3 : wie P1; hier Substanzkombination Nifedipin/Propranolol (Konzentration 10 ⁻⁷ M bzw. 10 ⁻¹² M)

In allen Kombinationen und beiden Konzentrationen (10⁻⁷ M und 10⁻¹² M) steigern die Tests substanz Nicardipin, Nifedipin und Propranolol die Lyse von PBL, wenn man den Referenzwert als Vergleich heranzieht (Diagramm 47). Der Unterschied zu Diagramm 39 ist die zusätzliche Vorinkubation mit dem Lektin Con A, welches die zytolytischen Fähigkeiten der behandelten Zellen noch verstärkt.

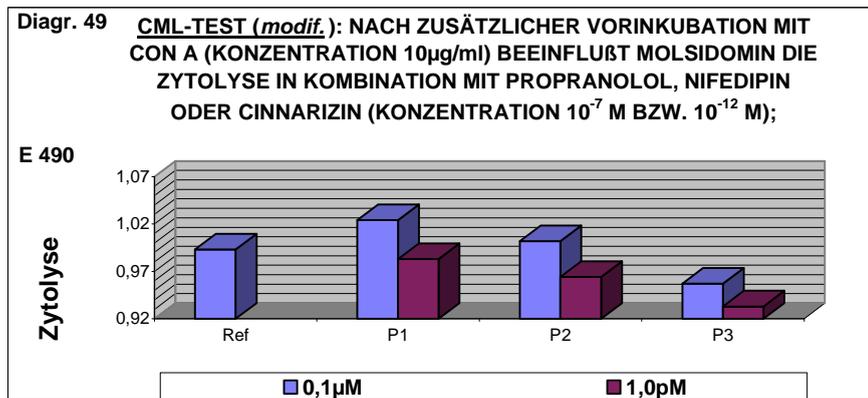
2.2.2.2 Nifedipin kombiniert mit Propranolol, ISDN, Molsidomin oder Cinnarizin



10^{-7} M bzw. 10^{-12} M : Konzentration der Substanzkombinationen
Ref : PBL/Person A, vorinkubiert (48 Std.) mit dem mitogenen Lektin Con A (Konzentration $10\mu\text{g/ml}$), gemischt mit PBL der Person B; keine Testsubstanzen
Ref.wert ist für beide Konzentrationen derselbe!
P1 : PBL/Person A, 48 Stunden vorinkubiert mit Con A und der Substanzkombination Nifedipin und Propranolol (Konzentration 10^{-7} M bzw. 10^{-12} M), gemischt mit PBL der Person B
P2 : wie P1; hier Kombination aus Nifedipin und ISDN (Konzentration 10^{-7} M bzw. 10^{-12} M)
P3 : wie P1; hier Kombination aus Nifedipin und Molsidomin (Konzentration 10^{-7} M bzw. 10^{-12} M)
P4 : wie P1; hier Kombination aus Nifedipin und Cinnarizin (Konzentration 10^{-7} M bzw. 10^{-12} M)

Diagramm 48 zeigt, daß die Lyse von PBL durch die Substanzkombinationen Nifedipin/Propranolol in beiden Konzentrationen und durch Nifedipin/ISDN sowie Nifedipin/Molsidomin in einer Konzentration von 10^{-7} M bei zusätzlicher Vorinkubation durch Con A gefördert wird. Zellen mit den Kombinationen Nifedipin/ISDN, Nifedipin/Molsidomin (Konzentration 10^{-12} M) und Nifedipin/Cinnarizin (beide Konzentrationen) zeigen eine geringere Zytolyse als die Zellen ohne Testsubstanzen (vergleiche auch Diagramm 40).

2.2.2.3 Molsidomin kombiniert mit Propranolol, Nifedipin oder Cinnarizin



0,1µM bzw. 1,0pM : Konzentration der Testsubstanzkombinationen
Ref : PBL/Person A, vorinkubiert (48 Std.) mit dem mitogenen Lektin Con A (Konzentration $10\mu\text{g/ml}$), gemischt mit PBL/Person B; keine Testsubstanzen
P1 : PBL/Person A, vorinkubiert für 48 Stunden mit Con A und der Substanzkombination Molsidomin/Propranolol (Konzentration 10^{-7} M bzw. 10^{-12} M), gemischt mit PBL/Person B
P2 : wie P1; hier Substanzkombination Molsidomin/Nifedipin (Konzentration 10^{-7} M bzw. 10^{-12} M)
P3 : wie P1; hier Substanzkombination Molsidomin/Cinnarizin (Konzentration 10^{-7} M bzw. 10^{-12} M)

In einer Konzentration von 10^{-7} M steigern die Testsubstanzkombinationen Molsidomin/Propranolol sowie Molsidomin/Nifedipin die Lyse von PBL (Diagramm 49) bei zusätzlicher Vorinkubation durch Con A (vergleiche auch Diagramm 41). Diese beiden Kombinationen in einer Konzentration von 10^{-12} M und die Kombination Molsidomin/Cinnarizin in beiden Konzentrationen zeigen im Vergleich zum Referenzwert eine geringere zytolytische Wirkung.

2.3 CML (*modifiziert*) mit Testsubstanzen, zusätzlich PHA

2.3.1 Vergleich zweier Testsubstanzen

2.3.1.1 Propranolol und Molsidomin

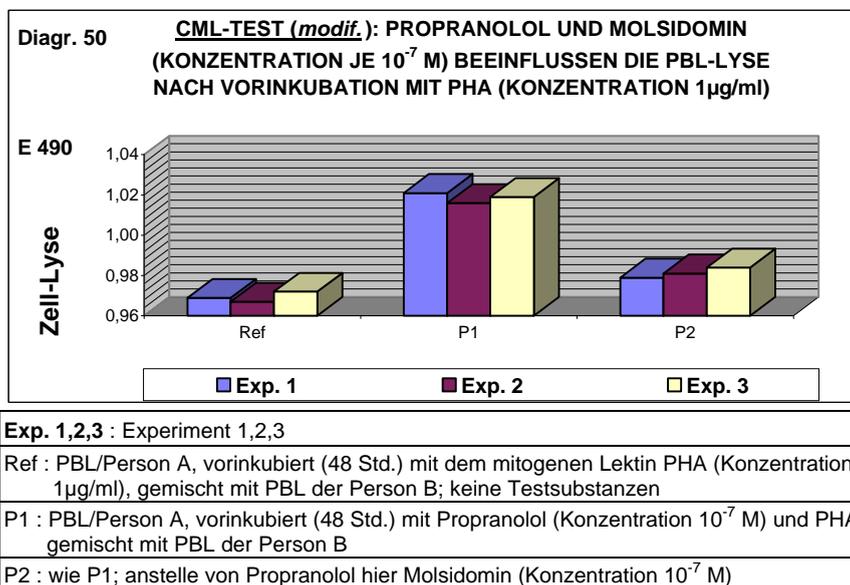
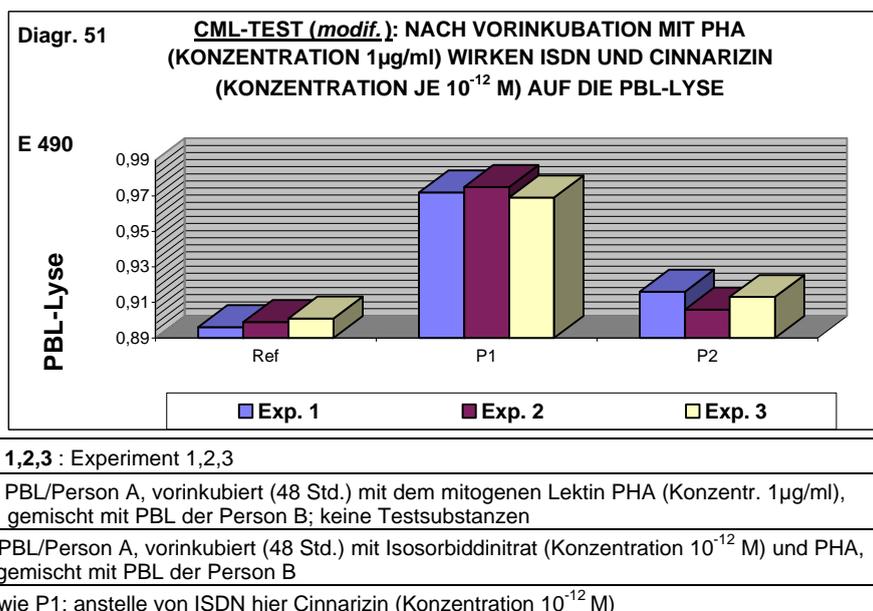


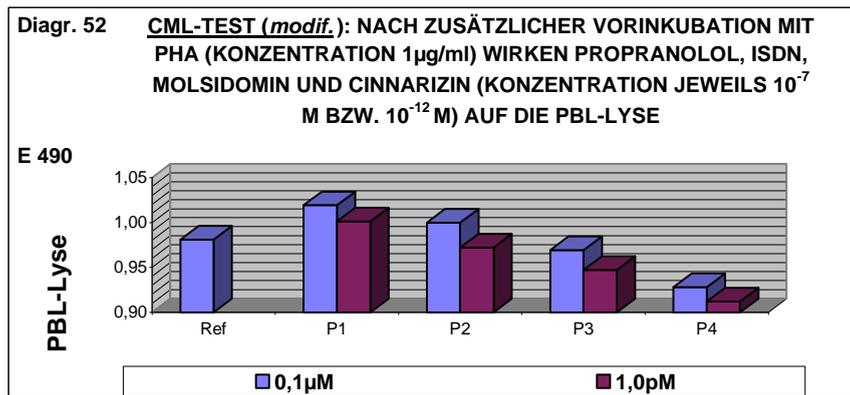
Diagramm 50 zeigt den Einfluß der Testsubstanzen Propranolol und Molsidomin auf die Lyse von PBL bei zusätzlicher Vorinkubation durch das mitogene Lektin PHA (Konzentration $1\mu\text{g/ml}$). Zieht man die Diagramme 34 und 44 zum Vergleich heran, fällt auf, daß PHA die Zytolyse verstärkt- nicht so ausgeprägt wie Con A, aber doch deutlich im Gegensatz zu den Referenzwerten der drei Parallelversuche.

2.3.1.2 ISDN und Cinnarizin



ISDN und Cinnarizin (Konzentration jeweils 10^{-12} M) fördern die Lyse von PBL unter dem zusätzlichen Einfluß von PHA, wie aus Diagramm 51 ersichtlich ist. Unterstützt durch dieses mitogene Lektin wirken nun auch die Zellen mit der Testsubstanz Cinnarizin im Vergleich zu den Zellen ohne Testsubstanzen eher zytolytisch; auch die Wirkung von ISDN ist verstärkt (vgl. auch Diagramme 35 und 45).

2.3.1.3 Propranolol, ISDN, Molsidomin und Cinnarizin in einem Testansatz

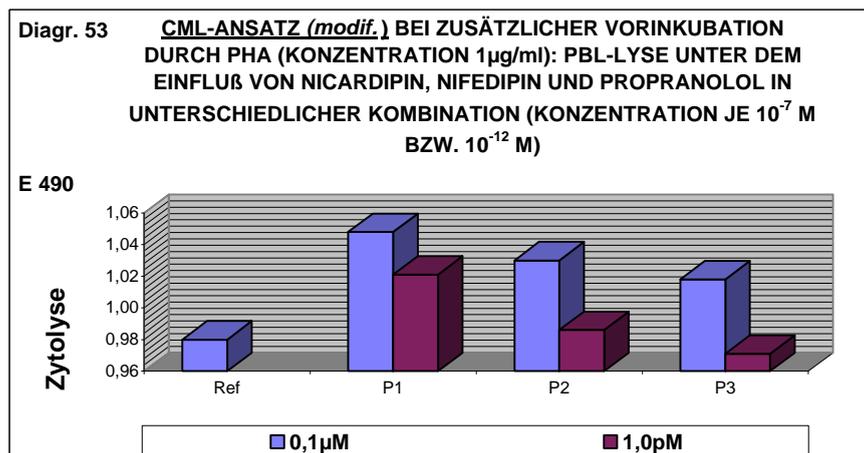


0,1µM bzw. 1,0pM : Konzentration der Testsubstanzen
Ref : PBL/Person A, 48 Stunden vorinkubiert mit dem mitogenen Lektin PHA (Konzentration 1µg/ml), gemischt mit PBL/Person B; keine Testsubstanzen
P1 : PBL/Person A, vorinkubiert (48 Std.) mit PHA und Propranolol (Konzentr. 10 ⁻⁷ M bzw. 10 ⁻¹² M), gemischt mit PBL der Person B
P2 : wie P1; anstelle von Propranolol hier Isosorbiddinitrat (Konzentration 10 ⁻⁷ M bzw. 10 ⁻¹² M)
P3 : wie P1; anstelle von Propranolol hier Molsidomin (Konzentration 10 ⁻⁷ M bzw. 10 ⁻¹² M)
P4 : wie P1; anstelle von Propranolol hier Cinnarizin (Konzentration 10 ⁻⁷ M bzw. 10 ⁻¹² M)

Propranolol (Konzentrationen 10⁻⁷ M und 10⁻¹² M) und ISDN (Konzentration 10⁻⁷ M) fördern die Lyse von PBL; die Zellen mit den Testsubstanzen ISDN (Konzentration 10⁻⁷ M), Molsidomin und Cinnarizin (in beiden Konzentrationen) wirken weniger zytolytisch im Vergleich zu den Zellen ohne Testsubstanzen (Diagramm 52). Die zusätzliche Vorinkubation durch PHA bewirkt zwar eine Steigerung der zytolytischen Fähigkeiten, aber nicht in dem Umfang wie Con A.

2.3.2 Vergleich von **Zweier**-Kombinationen der Testsubstanzen bei zusätzlicher Vorinkubation durch **PHA**

2.3.2.1 Nicardipin/Nifedipin, Nicardipin/Propranolol und Nifedipin/Propranolol

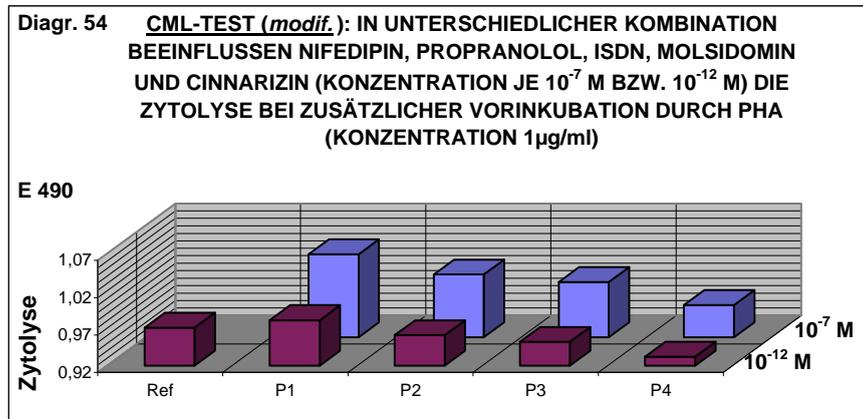


0,1µM bzw. 1,0pM : Konzentration der Testsubstanzenkombinationen
Ref : PBL/Person A, 48 Stunden vorinkubiert mit dem mitogenen Lektin PHA (Konzentration 1µg/ml), gemischt mit PBL der Person B; keine Testsubstanzen
P1 : PBL/Person A, vorinkubiert für 48 Stunden mit PHA und der Substanzkombination Nicardipin/Nifedipin (Konzentration 10 ⁻⁷ M bzw. 10 ⁻¹² M), gemischt mit PBL/Person B
P2 : wie P1; hier Substanzkombination Nicardipin/Propranolol (Konzentration 10 ⁻⁷ M bzw. 10 ⁻¹² M)
P3 : wie P1; hier Substanzkombination Nifedipin/Propranolol (Konzentration 10 ⁻⁷ M bzw. 10 ⁻¹² M)

Wie aus Diagramm 53 ersichtlich, steigern die Testsubstanz-Kombinationen Nicardipin/Nifedipin, Nicardipin/Propranolol und Nifedipin/Propranolol die Zytolyse von PBL; die ersten beiden in zwei Konzentrationen (10⁻⁷ M und 10⁻¹² M), die letzte nur bei einer Konzentration von 10⁻⁷ M. Der Effekt von PHA ist

im Vergleich zu den Diagrammen 39 und 47 zu erkennen: es fördert die Lyse zusätzlich, allerdings weniger als Con A.

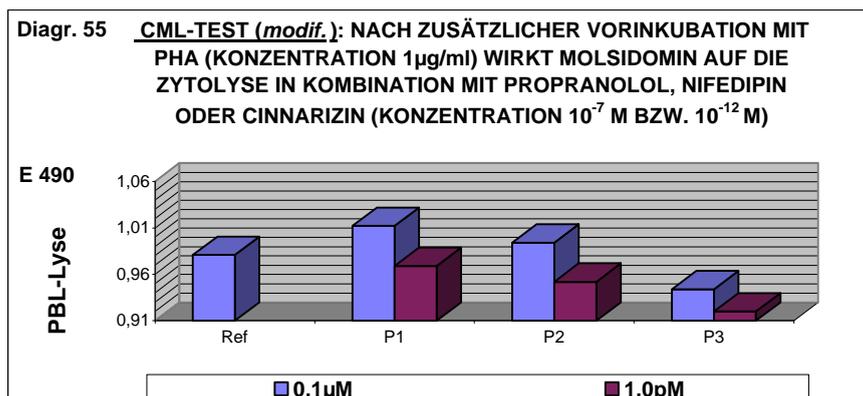
2.3.2.2 Nifedipin kombiniert mit Propranolol, ISDN, Molsidomin oder Cinnarizin



10^{-7} M bzw. 10^{-12} M : Konzentration der Testsubstanzkombinationen
Ref : PBL/Person A, vorinkubiert (48 Stunden) mit dem mitogenen Lektin PHA (Konzentration $1\mu\text{g/ml}$), gemischt mit PBL/Person B; keine Testsubstanzen
P1 : PBL/Person A, für 48 Stunden vorinkubiert mit PHA und der Substanzkombination Nifedipin/Propranolol (Konzentration 10^{-7} M bzw. 10^{-12} M), gemischt mit PBL/Person B
P2 : wie P1; hier Substanzkombination Nifedipin/Isosorbiddinitrat (Konzentration 10^{-7} M bzw. 10^{-12} M)
P3 : wie P1; hier Substanzkombination Nifedipin/Molsidomin (Konzentration 10^{-7} M bzw. 10^{-12} M)
P4 : wie P1; hier Substanzkombination Nifedipin/Cinnarizin (Konzentration 10^{-7} M bzw. 10^{-12} M)

In der Kombination mit Propranolol (in beiden Konzentrationen), mit ISDN und Molsidomin (jeweils bei 10^{-7} M) steigert Nifedipin die Zytolyse von PBL (Diagramm 54). Die Zellen mit ISDN und Molsidomin (Konzentration jeweils 10^{-12} M) sowie Cinnarizin (in beiden Konzentrationen) wirken weniger zytolytisch als die Zellen ohne Testsubstanzen. Die zusätzliche Vorinkubation durch PHA bewirkt eine Vermehrung des zytolytischen Effektes, der aber verglichen mit dem durch Con A wieder geringer ist.

2.3.2.3 Molsidomin kombiniert mit Propranolol, Nifedipin oder Cinnarizin

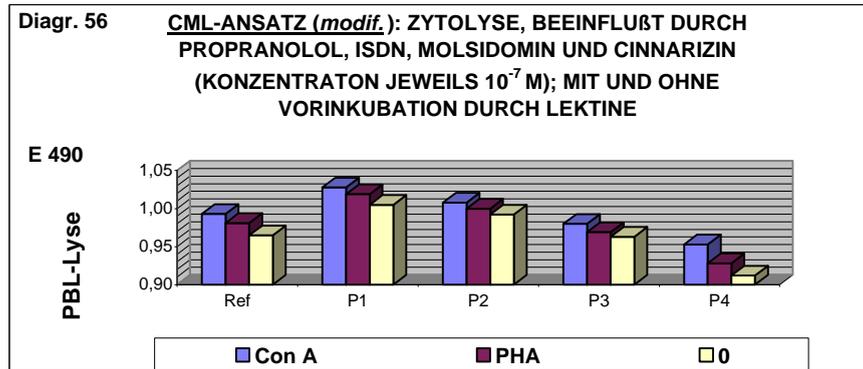


0,1µM bzw. 1,0pM : Konzentration der Testsubstanzkombinationen
Ref : PBL/Person A, vorinkubiert (48 Std.) mit dem mitogenen Lektin PHA (Konzentration $1\mu\text{g/ml}$), gemischt mit PBL/Person B; keine Testsubstanzen
P1 : PBL/Person A, vorinkubiert (48 Stunden) mit PHA und der Kombination aus Molsidomin und Propranolol (Konzentration 10^{-7} M bzw. 10^{-12} M), gemischt mit PBL der Person B
P2 : wie P1; hier Kombination aus Molsidomin und Nifedipin (Konzentration 10^{-7} M bzw. 10^{-12} M)
P3 : wie P1; hier Kombination aus Molsidomin und Cinnarizin (Konzentration 10^{-7} M bzw. 10^{-12} M)

Bei zusätzlicher Vorinkubation durch PHA (vergleiche auch Diagramme 41 und 49) steigert Molsidomin in Verbindung mit Propranolol oder Nifedipin (Konzentration jeweils 10^{-7} M) die Lyse von PBL (Diagramm 55). In einer Konzentration von 10^{-12} M wirken die Testsubstanzen weniger zytolytisch im Vergleich zum Referenzwert; dasselbe gilt auch für die Zellen mit der Testsubstanzkombination Molsidomin/Cinnarizin in beiden Konzentrationen.

2.4 CML (*modifiziert*) mit Testsubstanzen, **mit** bzw. **ohne** Lektine

2.4.1 Propranolol, ISDN, Molsidomin und Cinnarizin in einem Testansatz

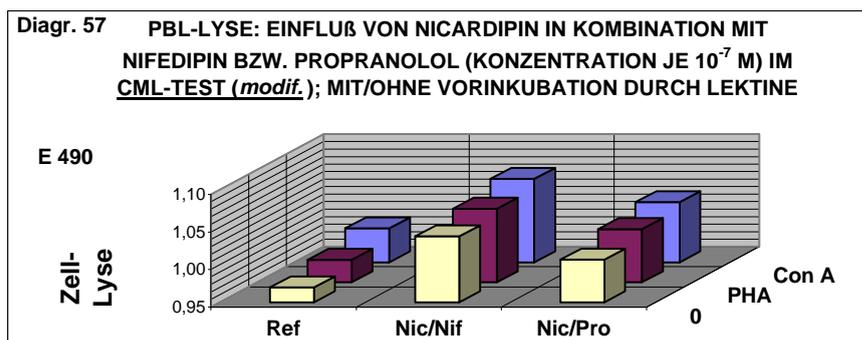


Con A : mitogenes Lektin; Konzentration 10µg/ml
PHA : mitogenes Lektin; Konzentration 1µg/ml
0 : keine Lektine
Ref : PBL/Person A mit/ohne Vorinkubation (48 Std.) durch Lektine, gemischt mit PBL der Person B, keine Testsubstanzen
P1 : PBL/Person A, vorinkubiert für 48 Stunden mit Propranolol (Konzentration 10^{-7} M), mit bzw. ohne Lektine; gemischt mit PBL der Person B
P2 : wie P1; anstelle von Propranolol hier Isosorbiddinitrat (Konzentration 10^{-7} M)
P3 : wie P1; anstelle von Propranolol hier Molsidomin (Konzentration 10^{-7} M)
P4 : wie P1; anstelle von Propranolol hier Cinnarizin (Konzentration 10^{-7} M)

Wie die Werte der drei Parallelversuche in Diagramm 56 erkennen lassen, wird die Zytolyse von PBL durch die Testsubstanzen Propranolol und ISDN gesteigert. Die Zellen mit Molsidomin verhalten sich nur etwas weniger zytolytisch als die Zellen ohne Testsubstanzen; ist Cinnarizin als Substanz dabei, wird der zytolytische Effekt doch deutlicher gehemmt. Die mitogenen Lektine Con A und PHA fördern die Lyse zusätzlich, Con A etwas mehr als PHA.

2.4.2 Vergleich von **Zweier**-Kombinationen der Testsubstanzen, **mit** bzw. **ohne** Lektine

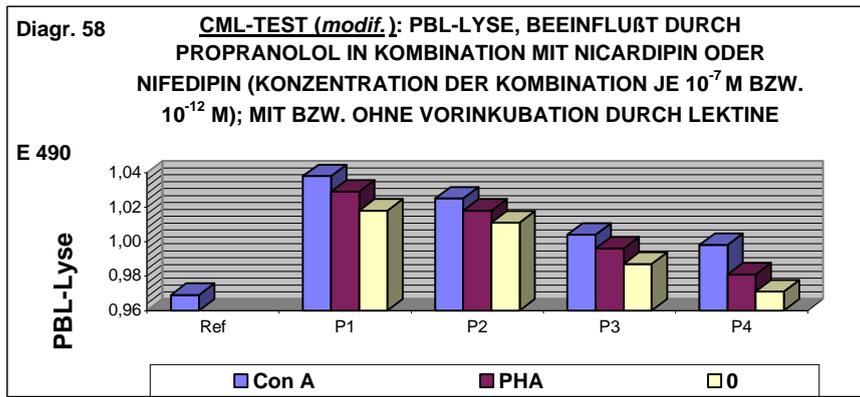
2.4.2.1 Nicardipin/Nifedipin und Nicardipin/Propranolol



Con A : mitogenes Lektin; Konzentration 10µg/ml
PHA : mitogenes Lektin; Konzentration 1µg/ml
0 : keine Lektine
Ref : PBL/Person A, mit bzw. ohne Vorinkubation (48 Std.) durch Lektine, gemischt mit PBL der Person B; keine Testsubstanzen
Nic/Nif : Kombination aus Nicardipin und Nifedipin (Konzentration 10^{-7} M)
Nic/Pro : Kombination aus Nicardipin und Propranolol (Konzentration 10^{-7} M)

Wie aus Diagramm 57 ersichtlich ist, bewirken die beiden mitogenen Lektine Con A und PHA eine Steigerung der Zytolyse, PHA etwas weniger als Con A. Die Kombinationen der Testsubstanzen Nicardipin, Nifedipin und Propranolol verstärken die Zytolyse eindeutig, wenn man den Referenzwert als Vergleich heranzieht.

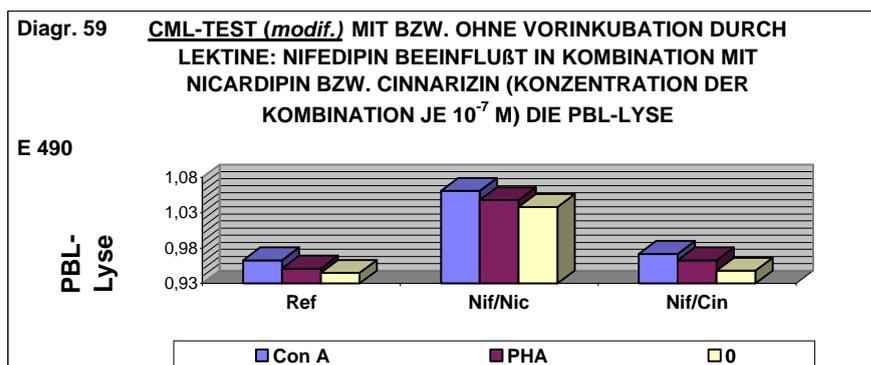
2.4.2.2 Nicardipin/Propranolol und Nifedipin/Propranolol im Vergleich



Con A : mitogenes Lektin; Konzentration 10µg/ml
PHA : mitogenes Lektin; Konzentration 1µg/ml
0 : keine Lektine
Ref : PBL/Person A, keine Lektine, keine Testsubstanzen, gemischt mit PBL/Person B
P1 : PBL/Person A, vorinkubiert mit der Substanzkombination Nicardipin/Propranolol (Konzentr. 10^{-7} M), mit bzw. ohne Lektine, gemischt mit PBL der Person B
P2 : wie P1; hier Substanzkombination Nifedipin/Propranolol (Konzentration 10^{-7} M)
P3 : wie P1; hier Konzentration der Substanzkombination 10^{-12} M
P4 : wie P2; hier Konzentration der Substanzkombination 10^{-12} M

Diagramm 58 zeigt den Einfluß der Kombinationen Nicardipin/Propranolol und Nifedipin/Propranolol auf die Lyse von PBL bei zusätzlicher Vorinkubation durch Lektine. Con A bewirkt die größte Zytolyse, gefolgt von PHA. Die stärkste Kombination ist Nicardipin/Propranolol bei einer Konzentration von 10^{-7} M, die schwächste Nifedipin/Propranolol bei einer Konzentration von 10^{-12} M; jedoch wirken die Zellen mit den Testsubstanzen alle mehr zytolytisch als die Zellen ohne Testsubstanzen.

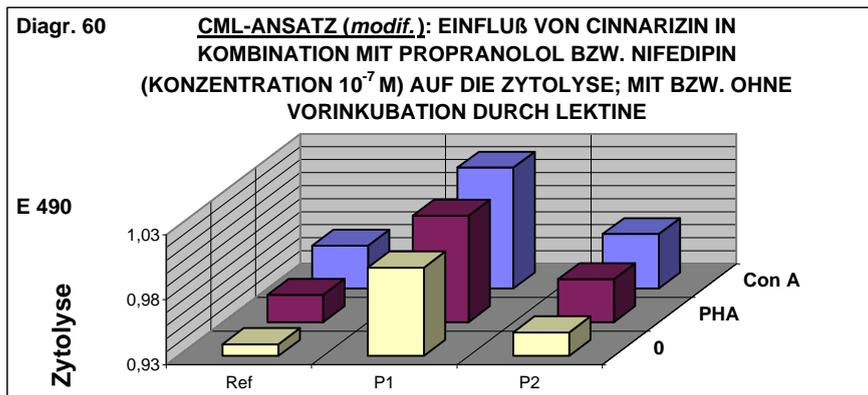
2.4.2.3 Nifedipin/Nicardipin verglichen mit Nifedipin/Cinnarizin



Con A : mitogenes Lektin; Konzentration 10µg/ml
PHA : mitogenes Lektin; Konzentration 1µg/ml
0 : keine Lektine
Ref : PBL/Person A, mit bzw. ohne Vorinkubation (48 Std.) durch Lektine, gemischt mit PBL der Person B; keine Testsubstanzen
Nif/Nic : Kombination aus Nifedipin und Nicardipin (Konzentration 10^{-7} M)
Nif/Cin : Kombination aus Nifedipin und Cinnarizin (Konzentration 10^{-7} M)

Wie aus Diagramm 59 ersichtlich, fördert die Testsubstanzkombination Nifedipin/Nicardipin im Vergleich zum Referenzwert die Lyse von PBL deutlich mehr. Auch die Kombination Nifedipin/Cinnarizin hat noch eine steigernde Wirkung, sie unterscheidet sich jedoch nicht wesentlich vom Referenzwert. Der Effekt der Lektine ist gut zu erkennen.

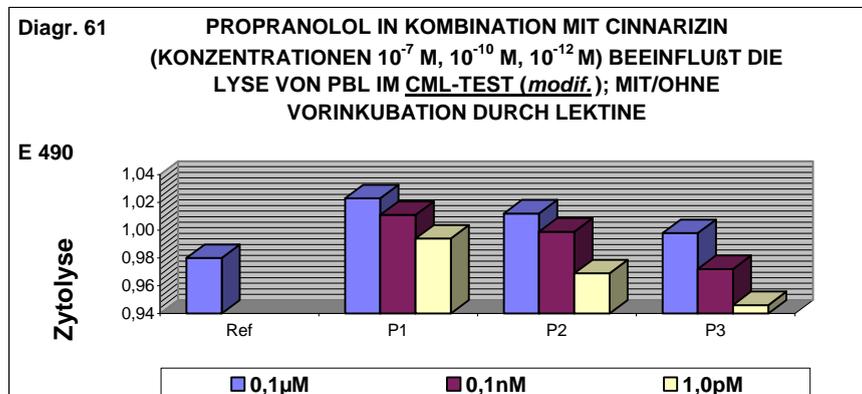
2.4.2.4 Cinnarizin/Propranolol verglichen mit Cinnarizin/Nifedipin



Con A : mitogenes Lektin; Konzentration 10µg/ml
PHA : mitogenes Lektin; Konzentration 1µg/ml
0 : keine Lektine
Ref : PBL/Person A, mit bzw. ohne Vorinkubation durch Lektine, gemischt mit PBL der Person B; keine Testsubstanzen
P1 : PBL/Person A, vorinkubiert (48 Std.) mit der Substanzkombination Cinnarizin/Propranolol (Konzentration 10^{-7} M), mit bzw. ohne Lektine, gemischt mit PBL der Person B
P2 ; wie P1; hier Substanzkombination Cinnarizin/Nifedipin (Konzentration 10^{-7} M)

Im Vergleich zu den Referenzwerten fällt bei der Testsubstanzkombination Cinnarizin/Propranolol eine deutliche Steigerung der Zytolyse von PBL auf (Diagramm 60); dieser Effekt ist bei der Kombination Cinnarizin/Nifedipin nicht mehr so deutlich zu erkennen. Die Zellen ohne Lektine zeigen eine geringere Zytolyse als die Zellen mit Con A bzw. PHA, wobei das erstere eine stärkere Wirkung besitzt.

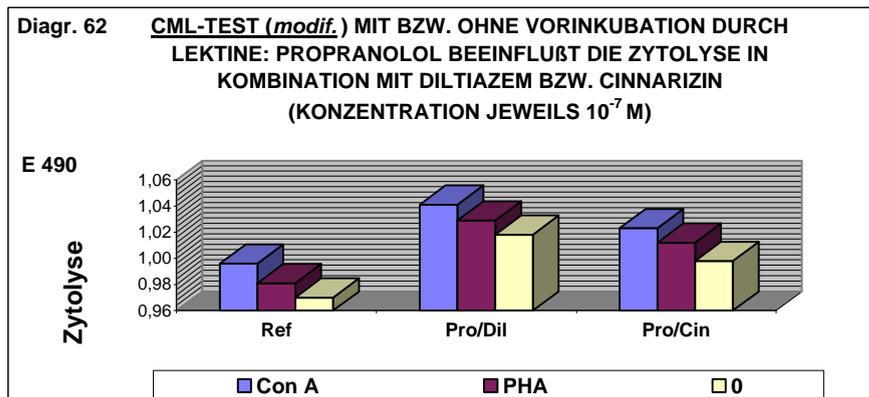
2.4.2.5 Propranolol/Cinnarizin in drei Konzentrationen



0,1µM, 0,1nM, 1,0pM : Konzentration der Testsubstanzkombination
Ref : PBL/Person A, ohne Vorinkubation durch Lektine, gemischt mit PBL der Person B; keine Testsubstanzen
P1 : PBL/Person A, vorinkubiert mit dem mitogenen Lektin Con A (Konzentration 10µg/ml) und der Substanzkombination Propranolol/Cinnarizin (Konzentration 10^{-7} M, 10^{-10} M, 10^{-12} M), gemischt mit PBL der Person B
P2 : wie P1; anstelle von Con A hier mitogenes Lektin PHA (Konzentration 1µg/ml)
P3 : wie P1; keine mitogenen Lektine

In drei Konzentrationen (10^{-7} M, 10^{-10} M und 10^{-12} M) und bei zusätzlicher Vorinkubation durch Con A steigert die Kombination Propranolol/Cinnarizin die Lyse von PBL (Diagramm 61); nimmt man anstelle von Con A PHA dazu, tritt diese Steigerung nur noch bei zwei Konzentrationen (10^{-7} M bzw. 10^{-10} M) auf. Die Zellen ohne Lektine zeigen diesen Effekt nur bei einer Konzentration von 10^{-7} M.

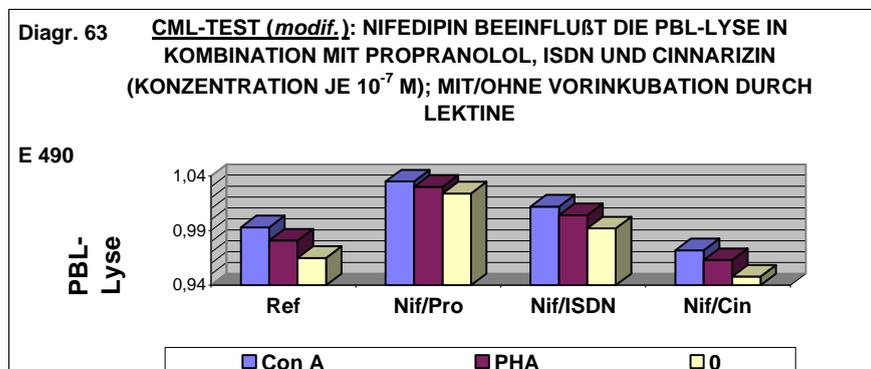
2.4.2.6 Propranolol/Diltiazem und Propranolol/Cinnarizin



Con A : mitogenes Lektin; Konzentration 10µg/ml
PHA : mitogenes Lektin; Konzentration 1µg/ml
0 : keine Lektine
Ref : PBL/Person A, mit bzw. ohne Vorinkubation durch Lektine, gemischt mit PBL/Person B; keine Testsubstanzen
Pro/Dil : Propranolol kombiniert mit Diltiazem (Konzentration 10^{-7} M)
Pro/Cin : Propranolol kombiniert mit Cinnarizin (Konzentration 10^{-7} M)

Verglichen mit dem Referenzwert haben die Kombinationen Propranolol/Diltiazem und Propranolol/Cinnarizin mit und ohne Vorinkubation durch Lektine einen höher zytolytischen Effekt (Diagramm 62). Dabei wirkt die erstgenannte Kombination noch etwas stärker als die zweite. Con A fördert im Vergleich zu PHA die Lyse von PBL etwas mehr.

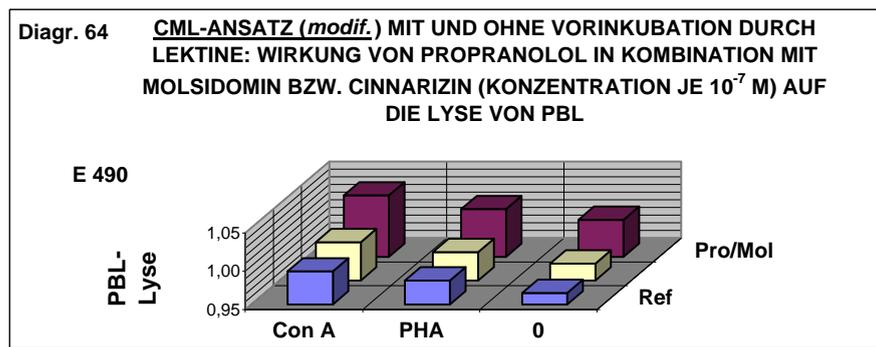
2.4.2.7 Nifedipin kombiniert mit Propranolol, ISDN oder Cinnarizin



Con A : mitogenes Lektin; Konzentration 10µg/ml
PHA : mitogenes Lektin; Konzentration 1µg/ml
0 : keine Lektine
Ref : PBL/Person A, mit/ohne Vorinkubation (48 Stunden) durch Lektine, gemischt mit PBL der Person B; keine Testsubstanzen
Nif/Pro : Kombination aus Nifedipin und Propranolol (Konzentration 10^{-7} M)
Nif/ISDN : Kombination aus Nifedipin und Isosorbiddinitrat (Konzentration 10^{-7} M)
Nif/Cin : Kombination aus Nifedipin und Cinnarizin (Konzentration 10^{-7} M)

Diagramm 63 zeigt den Einfluß der Substanzen Nifedipin, Propranolol, ISDN und Cinnarizin in unterschiedlicher Kombination auf die Zytolyse. Die stärkste Verbindung ist Nifedipin/Propranolol, gefolgt von Nifedipin/ISDN. Diese beiden Kombinationen fördern die Lyse von PBL im Vergleich zum Referenzwert, Nifedipin/Cinnarizin hemmt sie. Der Einfluß der Lektine ist deutlich zu erkennen: Con A steigert die Lyse am meisten.

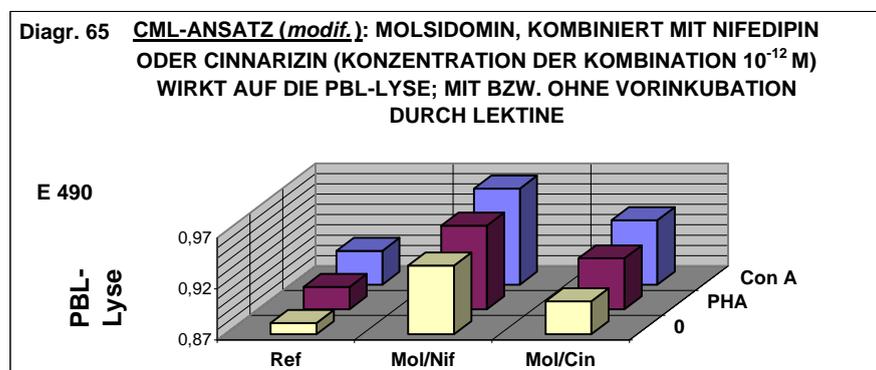
2.4.2.8 Propranolol/Molsidomin und Propranolol/Cinnarizin



Con A : mitogenes Lektin; Konzentration 10µg/ml
PHA : mitogenes Lektin; Konzentration 1µg/ml
0 : keine Lektine
Ref : PBL/Person A, mit/ohne Vorinkubation (48 Std.) durch Lektine, gemischt mit PBL der Person B; keine Testsubstanzen
Pro/Mol : Propranolol kombiniert mit Molsidomin (Konzentration 10^{-7} M)
Pro/Cin : Propranolol kombiniert mit Cinnarizin (Konzentration 10^{-7} M)

In Diagramm 64 ist der Effekt von Propranolol, Molsidomin und Cinnarizin in unterschiedlicher Kombination sowie der Lektine Con A und PHA auf die Lyse von PBL zu erkennen. Am stärksten fördert die Kombination Propranolol/Molsidomin die Zytolyse; im Vergleich zum Referenzwert zeigt die Kombination von Propranolol/Cinnarizin keine große Veränderung. Die Wirkung der Lektine ist wie schon häufig gesehen.

2.4.2.9 Molsidomin kombiniert mit Nifedipin oder Cinnarizin



Con A : mitogenes Lektin; Konzentration 10µg/ml
PHA : mitogenes Lektin; Konzentration 1µg/ml
0 : keine Lektine
Ref : PBL/Person A, mit bzw. ohne Vorinkubation (48 Std.) durch Lektine, gemischt mit PBL der Person B; keine Testsubstanzen
Mol/Nif : Molsidomin kombiniert mit Nifedipin (Konzentration 10^{-12} M)
Mol/Cin : Molsidomin kombiniert mit Cinnarizin (Konzentration 10^{-12} M)

Bei einer Konzentration von 10^{-12} M fördern die beiden Kombinationen Molsidomin/Nifedipin und Molsidomin/Cinnarizin die PBL-Lyse (Diagramm 65); die erstere wirkt etwas stärker. Auch hier ist der Effekt der zusätzlichen Vorinkubation durch die mitogenen Lektine zu erkennen: die Zellen mit Con A zeigen im Vergleich zu den Zellen ohne Lektine eine deutliche Steigerung der Zytolyse; diese Wirkung ist mit PHA etwas weniger ausgeprägt.

V DISKUSSION

Das Ziel der vorliegenden Arbeit bestand in der Untersuchung der Auswirkung eigentlich nicht-immunogener Pharmaka auf Lymphozyten; dazu wurden zwei verschiedene Testverfahren- die gemischte Lymphozytenkultur (**MLC** oder **MLR**) sowie die der Test der zellvermittelten Zytotoxizität (**CML**, *in Modifikation*) verwendet.

1 Die verwendeten Tests

Die gemischte Lymphozytenkultur oder **MLC** wird in der Praxis vor allem als Kreuzprobe vor Organtransplantationen durchgeführt. Da die Reaktion mehrere Tage dauert, ist ihr Ergebnis nur dann von Nutzen, wenn es sich um einen lebenden Spender handelt, wie dies zum Beispiel bei Knochenmark-Transplantationen der Fall ist. Hier werden die Zellen erst zu dem Zeitpunkt entnommen, an dem die Transplantation erfolgt. Die MLC-Reaktion beruht auf folgendem Prinzip:

Werden Lymphozyten von zwei Personen einige Tage lang zusammen in Kultur gehalten, so erkennen sie einander als „fremd“ und werden daraufhin aktiviert und zur Proliferation stimuliert. Die Reaktion wird durch die fremden HLA-Antigene induziert, aber auf welche Weise sich die Zellen gegenseitig aktivieren, weiß man noch nicht genau. Je mehr sich die HLA-Antigene der zwei Personen voneinander unterscheiden, desto stärker ist die Reaktion. Hierbei sind die HLA-Antigene der Klasse II viel wichtiger als die der Klasse I. Die fremden HLA-Antigene der Klasse II regen die T-Helferzellen zur Proliferation und zur Produktion von Faktoren wie IL-2 und IFN- γ an. Danach können auch zytotoxische T-Lymphozyten aktiviert werden, sofern sich die zwei Personen auch hinsichtlich der HLA-Antigene der Klasse I unterscheiden. Für die MLC-Reaktion ist keine vorherige Immunisierung nötig (58, S. 492-496).

Meistens wird die MLC-Reaktion so eingesetzt, dass sie nur „in einer Richtung“ (one way) abläuft. Zu diesem Zweck unterwirft man die Lymphozyten eines der beiden Individuen (die *Stimulatorzellen*) einer so starken Behandlung mit Mitomycin C oder radioaktiven Bestrahlung, dass sie nicht mehr zur Proliferation fähig sind, wohl aber noch einige Zeit am Leben bleiben und als Antigen dienen können. Wenn man Zellen durch eine zu hohe Dosis Mitomycin C oder Bestrahlung abtötet, verläuft der MLC-Test negativ. Die Reaktion, die man am Ende der Zellkultur misst, beruht auf der Proliferation der Lymphozyten des zweiten Individuums, der unbehandelten bzw. unbestrahlten *Responderzellen*.

Im Verlauf der allogenen MLR werden zwei Populationen von alloreaktiven T-Lymphozyten stimuliert, jede der aktivierten Subpopulationen erkennt ein unterschiedliches MHC-Genprodukt; während der MLR gebildete ZTL lysieren Zielzellen, die sich vom gleichen Individuum ableiten wie die ursprüngliche Stimulatorpopulation. Wenn die Klasse I-MHC-Moleküle der Stimulator- und Responder-Population in der MLR identisch sind, kommt es nicht zur Bildung von CD8+ZTL. Alloreaktive CD4+T-Lymphozyten werden nur stimuliert, wenn sich Klasse II-MHC-Allele in ursprünglichen Stimulator- und Responderzellen unterscheiden. Der sogenannte „allogene Effekt“ beruht auf der unspezifischen Steigerung oder Unterdrückung einer Immunantwort durch allogene T-Lymphozyten (99, S. 400).

Im MLC werden Zellen gebildet, die für allogene Zellen zytotoxisch sind; in der Kultur differenziert sich ein Teil der Zellen der Person A zu Effektorzellen und proliferiert mit der Spezifität gegen HLA-A, -B und -C-Antigene auf Zellen der Person B. Die zytotoxische Zelle wird also fähig, die Stimulatorzelle zur erkennen und zu töten- dieses Phänomen ist als zellvermittelte Zytotoxizität oder CML (cell-mediated lympholysis) bekannt und wird vermittelt durch T-Zellen, die im MLC generiert werden.

Mit Hilfe des **CML**-Tests lassen sich zytotoxische T-Lymphozyten untersuchen. Letztere können in einer MLC-Reaktion aktiviert werden, sofern sich die Responder- und Stimulatorzellen hinsichtlich ihrer HLA-Antigene unterscheiden. In einem CML-Test misst man klassischerweise die lytische Aktivität der zytotoxischen T-Lymphozyten für verschiedene Zielzellen (113, S. 305). Die Reaktivität der zytotoxischen T-Lymphozyten richtet sich vor allem gegen fremde HLA-Antigene der Klasse I. Deshalb spielen die ZTL auch eine wichtige Rolle bei Transplantatabstoßungsreaktionen. Außerdem beseitigen sie im Körper Zellen, die durch Viren infiziert sind. Mit virusinfizierten Zellen kann man auch diese Funktion *in vitro* testen (111, S. 163). Hierbei richtet sich die Reaktion nicht gegen fremde HLA-Antigene der Klasse I (wie dies der Fall in der MLC-Reaktion *in vitro* oder nach einer Transplantation *in vivo* ist), sondern gegen körpereigene HLA-Moleküle der Klasse I in Kombination mit viralen Antigenen. Dieses Phänomen wird Klasse-I-Restriktion genannt (58, S. 496).

Wenn sich Stimulator- und Responderzellen in HLA-A, -B und -C- Determinanten sowie in HLA-D und -DR unterscheiden, folgt

- a) eine gute Proliferation im MLC und eine starke Lyse der spezifischen Zielzellen
- b) eine Lyse anderer Targetzellen, die dieselben Haplotypen der Stimulatorzellen haben, aber nicht der Responderzellen
- c) eine geringe oder keine Lyse der Zellen, die HLA-D/-DR-Determinanten auf den Stimulatorzellen, nicht auf den Responderzellen tragen, aber HLA-A, -B, und C-Antigene auf den Responderzellen haben.

Im vorliegenden Fall wurde der klassische CML-Test modifiziert und über zwei Tage durchgeführt- zum einen, um mehrere Substanzen zu testen, zum anderen, um eine frühe Reaktion feststellen zu können.

2 Die Wirkungen der einzelnen Substanzen

Propranolol ist eine Substanz, die unselektiv β 1- und β 2-Rezeptoren für Katecholamine blockiert; die molekulare Wirkung nach Bindung an einen β -Rezeptor wurde im Kapitel 2.1.2. ausführlich beschrieben. Interessanterweise ist der TZR der Th2 wahrscheinlich funktionell nicht mit dem IP_3 -Signaltransduktionsweg verbunden; in Th2 kommt es nicht zu einem Anstieg der intrazellulären Konzentrationen von freiem Kalzium nach Aktivierung durch den TZR-Komplex, wohingegen der Kalzium-Anstieg in Th1 zwischen 180 und 500 % beträgt (108, S. 1922)! Da Th2 außerdem auf antigene Stimulation in Abwesenheit der PKC antworten, ist es noch wahrscheinlicher, dass Th2 nach TZR-vermittelter Stimulation nicht die PKC als Haupt-Signaltransduktionsweg benutzen, sondern eher die Proteinkinase A. Es besteht also eine reziproke Beziehung zwischen der PKC- und der PKA-Aktivierung, wenn es darum geht, die Immunantwort in Richtung Th1 oder Th2 zu lenken (34, S. 4181).

Der entscheidende Faktor der Aktivierung ist letztendlich das cAMP, das nach Aktivierung der Proteinkinase C eine Reihe von Phosphorylierungen zur Folge hat.

cAMP entsteht intrazellulär aus ATP mit Hilfe der in der Zellmembran gelegenen Adenylatzyklase (AC) und wird durch die Phosphodiesterase (PDE) abgebaut; es übermittelt generell inhibitorische Signale für die T-Zell-Aktivierung und die klonale T-Zell-Proliferation. Die Aktivierung der AC oder Hemmung der PDE fördert die Besetzung der intrazellulären cAMP-Rezeptoren und hemmt die IL-2-Produktion (46, S. 167); die Hemmung der cAMP-abhängigen Proteinkinase-Aktivität stellt teilweise die IL-2-Produktion wieder her. Das bedeutet, dass die Proteinphosphorylierung ein Mechanismus ist, durch den cAMP die IL-2-Produktion regulieren kann (6, S. 90). Die Inhibierung der IL-2-Produktion kann nicht allein durch die bekannte Fähigkeit des zyklischen Nukleotids, den Lektin-stimulierten Polyphosphoinosit-Stoffwechsels in T-Zellen zu hemmen, erklärt werden.

cAMP hemmt mehrere Ereignisse, die mit der TZR-Aktivierung verbunden sind: die Generierung von Inositolphosphaten, die Kalzium-Mobilisation, Proteinphosphorylierung, die IL-2-Produktion und die Expression von IL-2-Rezeptoren. B-Blocker hemmen die IL-2-Rezeptor-Expression in aktivierten Zellen in den gleichen Konzentrationen, in denen β -Agonisten die Lymphozyten-Proliferation supprimieren. B-adrenerge Agonisten hemmen die de novo-Expression von IL-2-Rezeptoren und vermindern bereits exprimierte IL-2-Rezeptor-Populationen auf reifen T-Zellen (121, S. 319).

Allgemein können Signale, die zur cAMP-Produktion in T-Zellen führen (z.B. Stimulatoren des β -adrenergen Rezeptors oder auch Prostaglandine) gemeinsam mit Signalen, die zur Aktivierung der Proteinkinase C führen, den intrazellulären cAMP-Spiegel erhöhen, der die T-Zell-Proliferation durch PKC-Aktivatoren hemmt (27, S. 252).

Die Erhöhung des intrazellulären cAMP hemmt die Proliferation von ZTL und Th1, die durch den TZR/CD3-Komplex oder andere PKC-Aktivatoren stimuliert werden, wesentlich effizienter als die Zellen, die durch IL-2 stimuliert werden; daher hemmen erhöhte cAMP-Spiegel wahrscheinlich selektiv Stimuli, die die PKC aktivieren (108, S. 1930).

In Th2 von Mäusen sind die Basalspiegel von cAMP höher als in Th1; in menschlichen T-Lymphozyten hemmen cAMP-erhöhende Substanzen Th1- und Th2-assoziierte Lymphokine, wobei die letzteren deutlich resistenter gegenüber einer cAMP-Erhöhung scheinen. Basierend auf diesen Erkenntnissen kann man spekulieren, dass die Rolle anti-entzündlicher Effekte der β -Adrenozeptor-Agonisten z.B. bei allergischem Asthma auf einer Hemmung der Th2-vermittelten Lymphokine beruht (108, S. 1934).

Die Agonistenstimulation des β -adrenergen Rezeptors auf T-Zellen führt nach Carlson et al. (21, S. 40) zur cAMP-Produktion, die mit der Modulation der T-Zell-Funktion korreliert ist. Das Mitogen PHA z.B. kann synergistisch die Akkumulation von cAMP in T-Zellen steigern. Wenn die intrazellulären Kalzium-Spiegel steigen, steigt auch die Agonisten- (z.B. Isoproterenol, ISO) geförderte cAMP-Akkumulation in T-Zellen. Dagegen fördert PHA das ISO-induzierte cAMP in einem Kalzium-unabhängigen Mechanismus (gezeigt durch einen Vergleich mit einem Kalzium-freien Medium). PHA verhindert die Dissoziation des β -adrenergen Rezeptors vom Gs-Protein nach ISO-Stimulation, aber nicht die Trennung des beta-adrenergen Rezeptors von der Adenylatzyklase. Diese Studie erklärt einen potentiellen Mechanismus für eine Modulation der T-Zell-Funktion durch Katecholamine bzw. deren Blocker.

Cazaux et al. (22, S. 120) zeigen einen Rückgang beta-adrenerger Rezeptoren auf T-Zellen auf eine Stimulation mit Con A sowie eine verminderte Antwort auf spezifische Agonisten-Stimulation auf dem Höhepunkt der Proliferation. Die Blockade der Zell-Proliferation durch Tyrosinkinasen oder PKC-Inhibitoren kehren diesen Effekt um.

Die Effekte der Alloimmunisierung auf β -adrenerge Expression in Lymphozyten werden durch Genaro et al. (45, S. 115) folgendermassen erklärt: die beta-Adrenozeptor-Expression und intrazelluläre cAMP-Spiegel in B-Zell-Populationen variieren mit der Anzahl der Alloimmunisierungen. Außerdem ist die Antikörper-Synthese, induziert durch allogene Stimuli, umgekehrt proportional zur Anzahl der auf B-Zellen exprimierten β -Rezeptoren.

Die Downregulierung der β -adrenergen Rezeptor-Expression auf B-Zellen wird durch Aktivierung früher Signale bei der alloantigen-induzierten Immunantwort bewirkt: die in vitro-Stimulation von B-Zellen mit Mitomycin-behandelten allogenen Zellen induziert eine Reduktion der β -Rezeptoren. Das korreliert mit den

unterschiedlichen Spiegeln von basalem und Isoproterenol-stimuliertem cAMP. Der Kalzium-Anstieg und die Aktivierung der PKC nach direkter allogener Stimulierung führt zur Reduktion der beta-adrenergen Rezeptoren. Nach Bartik et al. (9, S. 415) gibt es bei der Modulation der T-Zell-Proliferation durch die Stimulation des beta-adrenergen Rezeptors keine Korrelation zwischen der Hemmung der T-Zell-Proliferation und des cAMP-Anstieges. Die proliferative Antwort der T-Zellen und ihrer Untergruppen wird durch dosisabhängiges ISO gehemmt (auch 70, S. 144).

Viel mehr immunsuppressiv wirkt Prostaglandin E₂. Es induziert einen größeren und länger anhaltenden Anstieg von cAMP als ISO.

PGE₂ wird von einer großen Vielzahl von Zellen in den meisten menschlichen Geweben und von Monozyten im peripheren Blut produziert; es steigt nach Zellaktivierung durch Mitogene, Endotoxine, Interferone und Antigen-Antikörper-Komplexe. Es fördert das intrazelluläre cAMP sowie die IL-10- und IL-5-Bildung, IFN- γ wird stark gehemmt. Die T-Zell-Mitogenese, die IL-2-Produktion sowie die Antikörpersynthese durch B-Zellen können ebenfalls blockiert werden. Th1 haben mehr Bindungsstellen für PGE₂ als Th2, dadurch kann es leichter die Hemmung der IL-2-Produktion induzieren. PGE₂ beeinflusst die IL-2-Produktion in einigen, aber nicht in allen Th0-Zellen; das kann bedeuten, dass die Antwort auf eine cAMP-Erhöhung eine Eigenschaft der Zelle und nicht der Lymphokine ist.

PGE₂ unterdrückt die Mitogen-induzierte Kalzium-Mobilisation in T-Zellen; die PGE₂-vermittelte Suppression der T-Zell-Proliferation z.B. während einer Sepsis könnte aus einem veränderten Kalzium-Signal-Weg resultieren. Nach Stimulation mit Con A zeigt sich nach Choudhry et al. (23, S. 1742) ein Kalzium-Anstieg bei 60 % der Zellen. Die Vorbehandlung mit PGE₂ hat keinen Effekt auf die Kalzium-Konzentration in den ruhenden Zellen; es supprimiert signifikant den Con A-induzierten Kalzium-Anstieg durch Hemmung des Kalzium-Einstromes und die Freisetzung aus intrazellulären Speichern. Generell sind Prostaglandine sicherlich mehr an der Immunantwort beteiligt als bisher angenommen.

Adenosin und cAMP sind nach Zidek et al. (121, S. 319) potente Modulatoren der Zytokinproduktion; ihre Effekte überlappen mit denen von TNF- α , IFN- γ , IL-10 und IL-12 (auch 36, S. 107). Sie können die Th2-Zytokine IL-6, IL-10 fördern und die Th1-Zytokine IL-2, IFN- γ hemmen. Außerdem werden IL-3 und IL-4 gehemmt, IL-5 gefördert, IL-1 bleibt unbeeinflusst.

Die Norepinephrin- (NE, als Agonist) vermittelte Hemmung der zytotoxischen T-Lymphozyten-Bildung involviert einen β -adrenergen Rezeptormechanismus sowie eine verminderte TNF- α -Expression: NE hemmt laut Kalinichenko (54, S. 2492) die in vitro-Generierung der ZTL sowie die TNF- α -Produktion; die NE-induzierte Hemmung der ZTL kann durch Zugabe von TNF- α überwunden werden (42, S. 70). Die Zugabe von Propranolol zu stimulierten T-Zellen in einer Konzentration, die die NE-induzierte cAMP-Erhöhung verhindert, kehrt den NE-vermittelten Abfall von TNF- α und NE-vermittelter Hemmung der ZTL um!

Nach Leposavic et al. (64, S. 83) hat die chronische Behandlung mit Propranolol verschiedene Effekte: das Thymusgewicht ist reduziert, das Verhältnis der CD4+8+ und CD4+8- Zellen wird verändert. CD4+8+ Zellen sind relativ unempfindlich gegenüber einer längeren Propranolol-Behandlung.

Propranolol lässt allgemein die Zahl der zirkulierenden T-Zellen steigen, aber nicht die der anderen weißen Blutzellen. Die Con A-stimulierte Lymphozyten-Proliferation und IL-2-Bildung werden gefördert; die Aktivität der NK ist reduziert.

Die oben aufgeführten Punkte könnten wichtige Faktoren zur Erklärung der in den Versuchen gezeigten Ergebnisse sein; die immunologische Wirkung von β -Adrenozeptor-Blockern muß sicherlich noch genauer und gezielter untersucht werden.

Kalziumantagonisten oder **Kalzium-Kanal-Blocker** wirken über Hemmung des Kalzium-Einstromes aus dem Extrazellulärraum und führen ganz generell zur Dilatation von Gefäßen.

Briede et al. (16, S. 105) zeigen in einer Studie, dass Kalzium-Antagonisten die Mitogen-Stimulation von Lymphozyten hemmen können und demonstrieren, dass z.B. Nifedipin, Nicardipin und Diltiazem den Kalzium-Transport in Lymphozyten hemmen. Außerdem wird die normale Antwort der Lymphozyten auf Mitogene und Antigene verändert und die IL-2-vermittelte Proliferation inhibiert. Laut D'Ambrosio ist die allgemeine immunsuppressive Wirkung in vitro und in vivo bereits bewiesen worden (29, S. 1413).

Nifedipin reduziert konzentrationsabhängig allgemein die Zellzahl; die normale Expression des IL-2-Rezeptors bleibt erhalten, die IL-2-Produktion wird gehemmt. Die proliferative Antwort Nifedipin-behandelter Zellen wird durch Zugabe von IL-2 bewahrt (82, S. 20).

Nifedipin und Nicardipin können die Proliferation von Lymphozyten aber auch stimulieren, allerdings erst nach Vorbehandlung mit Con A; Briede et al. sind der Meinung, dass diese Kalzium-Antagonisten einen Konzentrationsabfall von Kalzium wie auch eine Aktivierung der Phosphodiesterase bewirken, die die cAMP-Konzentration in Lymphozyten reduziert und dadurch evtl. den Kalzium-Transport in die Zelle fördert.

Nach Fukuzawa et al. (42, S. 74) erfolgt die immunologische Modulation der antihypertensiven Substanzen über TNF- α ; u.a. Nicardipin hemmt die TNF- α -Produktion, allerdings in zehnmal höheren Dosen als bei der Therapie sonst üblich.

D'Ambrosio et al. erklären die Wirkung von Diltiazem im MLC über Monokine: Förderung von IL-2 und die Hemmung der IL-6-Produktion; TNF- α bleibt unberührt. Der modulierende Effekt auf die in vitro- Alloreaktivität

wird oft bei Post-Transplantations-Behandlungen in Kombination mit anderen Immunsuppressiva genutzt. Diltiazem hat allerdings nur in hohen, nicht-therapeutischen Dosen einen suppressiven Effekt, daher erfolgt nur eine Kombinationstherapie- u.a. mit Kortison-Präparaten (31, S. 431 und 51, S. 130).

Über Cinnarizin existieren außer Nebenwirkungsprofilen wie z.B. Cholestase (24, S. 553) derzeit noch keine Daten zu seinem Einfluß auf das Immunsystem.

Organische Nitrate haben ihre Hauptwirkung in der Erschlaffung der glatten Muskulatur; dieser Effekt beruht auf der Wirkung der durch G-Proteine vermittelten Aktivierung der GC durch S-Nitrosothiole, Katalyse von cGMP und Aktivierung der Phosphokinase G mit der Folge einer Abnahme des intrazellulären Kalzium-Gehaltes. Die instabilen S-Nitrosothiole entstehen durch Abspaltung von NO aus Nitraten. NO ist der wichtigste Faktor bei der Modulation des Immunsystems, wie bereits viele Autoren gezeigt haben.

NO ist ein kurzlebiges Radikal und wird in Makrophagen induziert durch Zytokine wie TNF- α , IL-1 und IFN- γ ; das letztere ist ein potenter Ko-Stimulator der NOS (NO-Synthase)-Expression. Die NOS-Expression wird außerdem über die Aktivität der PKA kontrolliert, was eine Verbindung zwischen der NOS-Expression und der Empfindlichkeit von Th1 und Th2 gegenüber cAMP herstellen könnte. Th1, nicht Th2 können große Mengen NO bilden! Dieser Effekt wird die Aktivierung von Makrophagen über einen NO-abhängigen Mechanismus erklärt. Der Beweis wurde von Rodrigues et al. (84, S. 50) erbracht: nach Zusatz eines NOS-Inhibitors kommt es zur Suppression der antiparasitären Aktivität der Th1; dieselbe Wirkung ergibt sich durch Zugabe eines Antikörpers gegen IFN- γ .

Van der Veen et al. (117, S. 196) erkannten die Hemmung der Proliferation von Th1 und Th2 durch NO ohne Reduktion der Zytokin-Produktion; sie erfolgt dosisabhängig bereits bei niedrigen Spiegeln wahrscheinlich in der späten T-Zell-Aktivierung. Die Stimulation der T-Zellen in Anwesenheit von NO führt nicht zur Apoptose in der Konzentration, in der es die Proliferation hemmt, erst bei hohen NO-Konzentrationen. Die Sekretion von IFN- γ , IL-4 und IL-5 ist leicht gesteigert, IL-2 leicht gehemmt. Exogen zugeführtes IL-2 kann die NO-induzierte Hemmung der Zell-Proliferation *nicht* umkehren.

Badovinac et al. beschreiben, wie NO das Wachstum und die MHC-unrestringierte Zytotoxizität von IL-2-aktivierten Lymphozyten- allerdings bei Ratten- fördert. Alle NO-fördernden Substanzen blockieren in hoher Konzentration die IL-2-induzierte Proliferation, in niedrigen wird sie gesteigert (7, S. 63).

NO vermindert selektiv die IFN- γ -Expression durch aktivierte T-Lymphozyten durch einen cGMP-unabhängigen Mechanismus (91, S. 395): NO hemmt IL-4, IL-5 und IFN- γ zu 50 %; wenn man einen cGMP-Inhibitor dazu gibt, sieht man, dass die Hemmung von IL-4 und IL-5 cGMP abhängig ist, bei IFN- γ sind vermutlich mehrere Mechanismen beteiligt. NO kann die Balance zwischen Th1- und Th2-Zytokinen durch selektive und persistierende Hemmung der IFN- γ -Expression also durch einen cGMP-unabhängigen Mechanismus modulieren.

Niedbala, Huang et al. zeigen Erkenntnisse zur Induktion und Differenzierung von Th1 durch NO: in hohen Konzentrationen hemmt NO die IL-12-Synthese durch aktivierte Makrophagen und hemmt dadurch indirekt die Expansion von Th1. In niedrigen Konzentrationen fördert NO selektiv Th1 und hat keine Effekte auf Th2. NO wirkt direkt auf CD4+-T-Zellen, nicht über APZ. IL-12 ist ein Haupt-Förderer der Th1, die IFN- γ produzieren, das wiederum Makrophagen aktivieren kann, IL-12 zu produzieren. Über Hemmung der IL-12-Synthese könnte NO ein Hemmer dieses Kreislaufes sei, in dem es die exzessive Vermehrung von Th1 hemmt (76, S. 2505 und 48, S. 4070)!

Massari et al. machen Aussagen zu den quantitativen und qualitativen Modifikationen der Lymphozyten-Untergruppen nach sublingualer Applikation von ISDN: alle Untergruppen bis auf NK-Zellen steigen (68, S. 18)! Das bedeutet, dass ISDN nicht nur eine Rolle bei der Vasodilatation spielt, sondern wahrscheinlich auch im Immunsystem. Zur Auswirkung von Molsidomin existieren bislang noch keine Daten.

Mills et al. spekulieren mit der zusätzlichen Beteiligung von Makrophagen: sie fanden mögliche sogenannte „M1- und M2-Antworten“. Makrophagen aus der Th1-Linie könnten leichter zur NO-Produktion aktiviert werden als die aus der Th2-Linie. M1 und M2 könne man nicht einfach als „aktiviert“ oder „nicht-aktiviert“ bezeichnen, wahrscheinlich gibt es mehrere metabolische Programme (69, S. 6173).

3 Die beteiligten Lymphokine

Nicht unterschätzt werden darf die Rolle der an jeder Immunreaktion beteiligten Lymphokine. Die oben gezeigte β -adrenerge Modulation betrifft auch menschliche Typ 1/Typ 2-Zytokine, wie Agarwal et al. erklären (3, S. 98). Beta-adrenerge Agonisten vermindern die INF- γ -Produktion und haben steigernde Effekte auf die IL-4, IL-5 und IL-10-Produktion. Dies wird durch Propranolol z.B. umgekehrt. Beta-Agonisten führen zu einem Ungleichgewicht der Zytokin-Produktion zugunsten der Typ 2-Antwort.

IL-1 und IL-6 sind zusätzliche Signale bei der T-Zell-Aktivierung; IL-6 und PHA unterstützen gemeinsam die T-Zell-Proliferation. Dieses vermag IL-1 nicht, fördert aber etwas die IL-2-Produktion und in größerem Ausmaß die Proliferation in Anwesenheit von IL-6. Die Blockade des IL-2-Rezeptors hat keinen Einfluß auf die PHA/IL-6-geförderte Proliferation, hemmt aber den Effekt von IL-1. Die Hemmung von IL-4 hat keinen Einfluß auf die PHA/IL-6- oder die PHA/IL-6/IL-1-geförderte Stimulation. IL-1 und IL-6 haben unterschiedliche Effekt auf die PHA-geförderte Aktivierung.

IL-4 spielt außerdem eine entscheidende Rolle in der Unterscheidung zwischen den Untergruppen von CD4+ und CD8+, ist ein Hauptfaktor für Th2, hemmt die IL-2-Rezeptor-Expression, die IL-2-abhängige Proliferation

und die IFN- γ -Produktion in menschlichen PBL und ist ein starker Inhibitor der Makrophagen, indem es ihre TNF- α -, IL-1- und Prostaglandin-Produktion hemmt!

IFN- γ blockiert die Proliferation von Th2, die IL-2 oder IL-4 ausgesetzt sind, Th1 wird gefördert. IFN- γ lässt die Proliferation/Zytokin-Produktion durch Th1 oder andere CD4⁺, CD8⁺-Klone, die IFN- γ sezernieren, unberührt. IFN- γ hemmt die Proliferation nach Stimulation mit Antigenen oder Mitogenen über Hemmung der IL-4-induzierten Proliferation (117, S. 198).

Unter PHA als Mitogen hingegen entwickeln sich die meisten CD4⁺ T-Zellen in Richtung Th1, die IFN- γ , aber nicht IL-4 produzieren, PHA bewirkt einen Anstieg der IL-2-Spiegel und macht ruhende autologe T-Zellen extrem sensibel auf die NK-vermittelte Lyse.

Mitogene (hier verwendet Con A und PHA) spielen ebenfalls eine noch nicht ganz erklärte Rolle bei der Immunantwort, sind aber bei den hier durchgeführten Versuchen eindeutig beteiligt!

4 Ein Überblick über die Versuchsergebnisse

4.1 MLC

In Diagramm 3 sieht man einen Vergleich der verwendeten Einzelsubstanzen miteinander in Bezug auf die Stimulation von PBL; Propranolol ist der potenteste Stimulator, gefolgt von ISDN, Molsidomin und Cinnarizin. Auch bei Verwendung unterschiedlicher Konzentrationen bleibt diese Tendenz erhalten.

Möglicherweise ist die Rolle, die das oben beschriebene cAMP spielt etwas größer als die Auswirkungen von NO; der Kalzium-Antagonist wirkt am wenigsten immunmodulierend. Allerdings sind diese Effekte nur sehr gering ausgeprägt, so dass nur spekuliert werden kann.

Beim Vergleich von Zweier-Kombinationen in den Diagrammen 4-8 ist das Gemisch Propranolol/Nicardipin das effektivste, Nifedipin kommt in seiner Wirkung fast an diese Werte heran. Kombiniert man Molsidomin mit Propranolol, Nifedipin oder Cinnarizin, sieht man, dass auch diese Kombinationen an die Werte des Propranolol-Gemisches mit den Kalzium-Antagonisten Nicardipin und Nifedipin nicht heranreichen.

Die Dreier-Kombinationen (Diagramme 9 und 10) aus Propranolol, Nicardipin, Nifedipin, ISDN, Molsidomin, Diltiazem und Cinnarizin führen in jeder Kombination zu einer nicht so ausgeprägten PBL-Stimulation wie das Gemisch Propranolol/Nicardipin; möglicherweise kommt es hier zu einer wechselseitigen Hemmung der Signal-Wege und dadurch zu einer geringeren Aktivierung.

Die hier gezeigten Ergebnisse zeigen sich in denselben Tendenzen auch in den Versuchen nach Zugabe von Con A (Diagramme 11-17) oder PHA (Diagramme 18-24), wobei eine etwas geringere Stimulation durch PHA festgestellt werden konnte.

Ganz deutlich werden die mitogenen Effekte in den Diagrammen 25-33, wo Ergebnisse mit und ohne Vorinkubation durch Lektine in jeweils einem Versuch verglichen werden; neben der inzwischen bekannten Tatsache, dass Propranolol der stärkste und Cinnarizin der schwächste Aktivator ist, fällt auf, dass Lektine (Con A mehr als PHA) einen deutlichen Beitrag zur PBL-Stimulation leisten.

4.2 CML (modifiziert)

In den Diagrammen 34-36 werden die Einzelsubstanzen einander gegenüber gestellt; es zeigt sich, dass erneut Propranolol der stärkste Immunmodulator ist, es bewirkt die größte Zytolyse. ISDN und Molsidomin haben einen deutlich geringeren Einfluß, Cinnarizin überhaupt keinen; in höheren Konzentrationen liegt Molsidomin unter dem Referenzwert.

In Zweier-Kombinationen wirken die Testsubstanzen etwas deutlicher zytolytisch (Diagramme 37-41), das effektivste Substanzengemisch besteht auch hier aus Propranolol und Nicardipin. Interessanterweise bewirken höhere Verdünnungen eine Abschwächung des zytolytischen Effektes, die Dosierung der Medikamente kann also durchaus eine Rolle spielen. Cinnarizin erweist sich als eine Art „Blocker“, wird es dazu kombiniert, liegt der zytolytische Effekt unter dem des Referenzwertes (Diagramme 40 und 41).

Dreier-Kombinationen (Diagramme 42 und 43), unabhängig vom jeweiligen Substanzen-Gemisch, wirken noch deutlicher auf die Zytolyse von PBL, die Unterschiede der Wirkungen sind jedoch nicht groß. Die stärkste Kombination ist die aus Nicardipin, ISDN und Cinnarizin.

Lektine verändern die gezeigten Effekte in ihrer Tendenz nicht, sie verstärken sie jedoch. Ob man Vergleiche zweier Testsubstanzen (Diagramme 44 und 45), den Vergleich von vier Substanzen in einem Testansatz (Diagramm 46) oder Vergleiche von Kombinationen (Diagramme 47-50), jeweils nach Vorinkubation mit Con A, betrachtet, der Trend bleibt erhalten. Die zytolytischen Fähigkeiten der behandelten Zellen wird verstärkt. Die Diagramme 50-55 zeigen die Effekte der Vorinkubation durch PHA: diese bewirkt eine Steigerung des zytolytischen Effektes, der aber verglichen mit dem durch Con A geringer ist.

Um diese Tatsache noch genauer zu untersuchen, wurden noch Versuche mit dem direkten Vergleich der Testsubstanzen mit und ohne Lektine durchgeführt (Diagramme 56-65). Es erfolgte eine Bestätigung der bisher beobachteten Trends- Con A ist der etwas stärkere Aktivator als PHA.

VI ZUSAMMENFASSUNG

Die Untersuchung, ob eigentlich nicht-immunogene Substanzen oder Medikamente eine Auswirkung auf das Immunsystem haben und dort evtl. sogar therapeutisch wirken könnten, stand im Mittelpunkt dieser Arbeit.

Das Immunsystem mit seiner Vielzahl an Modulatoren ist sehr komplex und noch nicht endgültig entschlüsselt. Ein sehr wichtiger Schritt dabei war die Entdeckung der Th-Untergruppen, die bei den meisten Erkrankungen eine Rolle spielen. Obwohl zunächst die meisten alloreaktiven oder PHA-stimulierten menschlichen CD4+ T-Zellen aus dem peripheren Blut gesunder Spender sich nicht in Th1 oder Th2 aufteilen ließen, konnte doch gezeigt werden, dass Th1- oder Th2-Profile in verschiedenen Krankheitsstadien in Geweben oder peripherem Blut von Patienten akkumulierten. Die meisten Th1 (77 %) und nur sehr wenige Th2 (18 %) entwickeln laut Romagnani (88, S. 257) eine zytolytische Aktivität in einem vierstündigen PHA-Test.

Th1 repräsentieren aufgrund ihrer Lymphokin-gesteuerten Effektoraktivität und ihrer Fähigkeit, APZ zu töten, die wichtigsten Effektorzellen bei Entzündungsreaktionen, die assoziiert sind mit verzögerter Hypersensibilität und niedriger Antikörper-Produktion (z.B. Kontaktdermatitis, intrazelluläre bakterielle Infektionen). Patienten mit schweren atopischen Krankheiten oder defekter NK-Funktion haben geringere IFN- γ -Spiegel, d.h. bei ihnen überwiegt die Th2-Differenzierung.

Wie oben gezeigt, haben die meisten Substanzen Einfluß auf genau dieses System, sei es über cAMP, über das Kalzium oder über NO; alle diese Transmitter stehen in einem engen Zusammenhang und modulieren gemeinsam oder auch zum Teil in Konkurrenz die Immunantwort.

T-Zellen als wesentlicher Bestandteil des Immunsystems vor allem sind zur Bindung und Zerstörung von virusinfizierten Körperzellen fähig. Wachsende Aufmerksamkeit haben aber auch die Wechselwirkungen zwischen den Zellen erfahren- die Lymphokine vermitteln diese Kontakte. Den Mechanismen von Allergien ist man auf der Spur, untersucht die Ursachen und Konsequenzen von Störungen des Immunsystems, verfeinert die Diagnostik (MLC und CML sind dabei nach wie vor sehr wichtig!) und arbeitet klinisch an Abstoßungsreaktionen in der Transplantationsmedizin, an der Onkologie und an Autoimmunerkrankungen.

Die Organtransplantation ist heute eine vielfältig angewandte Therapieform; immer häufiger werden nicht nur Nieren, sondern auch Knochenmark, Hornhaut, Leber, Herz und Bauchspeicheldrüse mit Erfolg übertragen. Doch trotz der langjährigen Erfahrung ruft die Frage nach der klinischen Bedeutung des HLA-Systemes auch heute noch oft heftige Diskussionen hervor. Auf der einen Seite ist es unbestreitbar, dass Transplantate bei HLA-Identität eine viel bessere Prognose (also Überlebenswahrscheinlichkeit) besitzen. Auf der anderen Seite ließe sich der Einfluß auf die Überlebenszeit des Transplantats viel schwieriger nachweisen, wenn die Nierentransplantate von nicht-verwandten Spendern stammten.

Möglicherweise könnten die hier getesteten Substanzen z.B. an der Post-Transplantations-Medizin beteiligt werden (wie dies der Fall bei Diltiazem bereits ist!); ein großer Vorteil wäre, dass diese Medikamente schon lange auch hinsichtlich ihrer Nebenwirkungen bekannt sind. Allerdings müssten auch nicht-therapeutische Dosen getestet werden.

Die Abwehr gegen Krebs ist ein sehr komplexer Prozeß, in dem auch immunologische Faktoren eine Rolle spielen. Viele immunogene Tumore können trotz der Auslösung einer Immunreaktion ungehindert weiter wachsen, so dass der Patient schließlich stirbt. Der Tumor kann sich auf unterschiedliche Weise der Kontrolle durch den Wirt entziehen. Es ist nicht ausgeschlossen, dass diese Tumoren- die durch einen in mehreren Stufen verlaufenden Transformationsprozeß entstehen können- bereits darauf selektiert sind, nicht „erkannt“ zu werden. Über eine Rolle der getesteten Substanzen bei der Onkologie kann bisher nur spekuliert werden.

Die Ursache von Autoimmunkrankheiten ist noch nicht vollständig bekannt; es sieht so aus, als würden diejenigen B-Zellen, die Autoantikörper bilden können, hierzu vom T-Suppressor-System „freie Fahrt“ erhalten. Offensichtlich hat die Verminderung der Kontrolle durch die T-Suppressorzellen zur Folge, dass allerlei B-Zell-Klone aktiviert werden können. Daher besteht auch eine erhöhte Wahrscheinlichkeit, dass Patienten mit einer Autoimmunerkrankung auch noch an einer zweiten erkranken.

Die Erforschung der Mechanismen oder auch der Wirkung nicht-immunogener Pharmaka ist nicht nur für die Lösung des Problems der Autoimmunität von Bedeutung; sie sollte auch zu einem besseren Verständnis der Immunreaktivität überhaupt beitragen.

VII LITERATURVERZEICHNIS

- 1.) Abbas A.K., Murphy K.M., Sher A. Functional diversity of helper T lymphocytes. *Nature* 383 (1996) 787-793
- 2.) Abbas A.K., Lichtman A.H., Pober J.S.; übersetzt von Beda M. Stadler und Max Hess. „Immunologie“, Verlag Hans Huber, Bern, 1996
- 3.) Agarwal S.K., Marshall G.D. Jr. Beta-adrenergic modulation of human type-1/Type-2 cytokine balance. *J Allergy Clin Immunol* 105 (2000) 91-98
- 4.) Alberola-Ila J., Takaki S., Kerner J.D., Perlmutter R.M. Differential signaling by lymphocyte antigen receptors. *Annu Rev Immunol* 15 (1997) 125
- 5.) Aranami T. A study on T cell subsets responsible for syngeneic mixed lymphocyte reaction. *Hokkaido Igaku Zasshi* 75 (2000) 315-324
- 6.) Averill L.E., Stein R.L., Kammer G.M. Control of human T-lymphocyte interleukin-2 production by a cyclic AMP-dependent pathway. *Cell Immunol* 115 (1988) 88-99
- 7.) Badovinac V., Trajkovic V., Mostarica-Stojkovic M. Nitric oxide promotes growth and major histocompatibility complex-unrestricted cytotoxicity of interleukin-2-activated rat lymphocytes. *Scand J Immunol* 52 (2000) 62-70
- 8.) Baraz L., Kother M., Condiotti R., Nagler A. Sensitization of resting T cells to autologous natural-killer-cell-mediated lysis by phytohemagglutinin. *Cancer Immunol Immunother* 48 (1999) 507-516
- 9.) Bartik M.M., Brooks W.H., Roszman T.L. Modulation of T cell proliferation by stimulation of the beta-adrenergic receptor: lack of correlation between inhibition of T cell proliferation and cAMP accumulation. *Cell Immunol* 148 (1993) 408-421
- 10.) Benbernou N., Esnault H., Shin H.C.K., Fekkar H., Guenounou M. Differential regulation of IFN- γ , IL-10 and inducible nitric oxide synthase in human T cells by cyclic AMP-dependent signal transduction pathway. *Immunology* 91 (1997) 361-368
- 11.) Berger A. Th1 and Th2 responses: what are they? *BMJ* 321 (2000) 424
- 12.) Berke G., Rosen D., Ronen D. Mechanism of lymphocyte-mediated cytolysis: functional cytolytic T cells lacking perforin and granzymes. *Immunology* 78 (1993) 105-112
- 13.) Blaheta R.A., Hailer N.P., Brude N., Wittig B., Leckel K., Oppermann E., Bachmann M., Harder S., Cinatl J., Scholz M., Bereiter-Hahn J., Weber S., Encke A., Markus B.H. In vitro analysis of verapamil-induced immunosuppression: potent inhibition of T cell motility and lymphocytic transmigration through allogeneic endothelial cells. *Transplantation* 69 (2000) 588-597
- 14.) Bloom B.R., Salgame P., Diamond B. Revisiting and revising suppressor T cells. *Immunol Today* 13 (1992) 131-136
- 15.) Bradley L.M., Yoshimoto K., Swain S.L. The cytokines IL-4, IFN- γ , and IL-12 regulate the development of subsets of memory effector helper T cells in vitro. *J Immunol* 155 (1995) 1713-1724
- 16.) Briede J., Daija D., Bisenieks E., Makarova N., Uldrikis J., Poikans J., Durbus G. Effects of some 1,4-dihydropyridine Ca-antagonists on the blast transformation of rat spleen lymphocytes. *Cell Biochem Funct* 17 (1999) 97-105
- 17.) Brinkmann V., Kristofic C. TCR-stimulated naive human CD4+45R0-T cells develop into effector cells that secrete IL-13, IL-5, and IFN- γ , but no IL-4, and help efficient IgE production by B cells. *J Immunol* 154 (1995) 3078-3087
- 18.) Brosterhus H., Brings S., Leyendeckers H., Manz R.A., Miltenyi S., Radbruch A., Assenmacher M., Schmitz J. Enrichment and detection of live antigen-specific CD4(+) and CD8(+) T cells based on cytokine secretion. *Eur J Immunol* 29 (1999) 4053-4059

- 19.) Campbell S.B., Komata T., Kelso A. Differential effects of CD4 and CD8 engagement on the development of cytokine profiles of murine CD4+ and CD8+ T lymphocytes. *Immunology* 99 (2000) 394-401
- 20.) Cantrell D. T cell antigen receptor signal transduction pathways. *Annu Rev Immunol* 14 (1996) 259
- 21.) Carlson S.L., Trauth K., Brooks W.H., Roszman T.L. Enhancement of beta-adrenergic-induced cAMP accumulation in activated T-cells. *J Cell Physiol* 161 (1994) 39-48
- 22.) Cazaux C.A., Sterin-Borda L., Gorelik G., Cremaschi G.A. Down-regulation of beta-adrenergic receptors induced by mitogen activation of intracellular signaling events in lymphocytes. *FEBS Lett* 364 (1995) 120-124
- 23.) Choudhry M.A., Hockberger P.E., Sayeed M.M. PGE2 suppresses mitogen-induced Ca²⁺-mobilization in T cells. *Am J Physiol* 277 (1999) 1741-1748
- 24.) Colle I., Reynaert H., Naegels S., Hoorens A., Urbain D. Cinnarizine-induced cholestasis. *J Hepatol* 30 (1999) 553
- 25.) Cottrez F., Hurst S.D., Coffman R.L., Groux H. T regulatory cells inhibit a Th2-specific response in vivo. *J Immunol* 165 (2000) 4848-4853
- 26.) Cremaschi G.A., Sterin-Borda L. Biological effects and cyclic AMP production during molecular histocompatibility antigen and beta-adrenoceptor interactions. *Int J Immunopharmacol* 10 (1988) 569-578
- 27.) Crespo P., Cachero T.G., Xu N., Gutkind J.S. Dual effect of beta-adrenergic receptors on mitogen-activated protein kinase. Evidence for a beta gamma-dependent activation and a G alpha s-cAMP-mediated inhibition. *J Biol Chem* 270 (1995) 252-259
- 28.) Curtsinger J.M., Schmidt C.S., Mondino A., Lins D.C., Kedl R.M., Jenkins M.K., Mescher M.F. Inflammatory cytokines provide a third signal for activation of naive CD4+ and CD8+ T cells. *J Immunol* 162 (1999) 3256-3262
- 29.) D'Ambrosio A., Giacomini E., Camponeschi B., Quintieri F. Diltiazem modulates monokine production in human mixed lymphocyte culture. *Transplantation* 65 (1998) 1411-1413
- 30.) D'Ambrosio A., Giacomini E., Quaranta M.G., Quintieri F. Diltiazem modulates monokine production by isolated human monocytes. *Transplant Proc* 30 (1998) 4188-4190
- 31.) D'Ambrosio A., Segoloni G., Quintieri F. The modulatory effect of diltiazem on human in vitro alloreactivity when used alone or in combination with cyclosporin A and/or methylprednisolone. *Transpl Int* 10 (1997) 426-431
- 32.) Demeure C.E., Wu C.Y., Shu U., Schneider P.V., Heusser C., Yssel H., Delespesse G. In vitro maturation of human neonatal CD4 T lymphocytes. II. Cytokines present at priming modulate the development of lymphokine production. *J Immunol* 152 (1994) 4775-4782
- 33.) Demeure C.E., Yang L.P., Byun D.G., Ishihara H., Vezzio N., Delespesse G. Human naive CD4 T cells produce interleukin-4 at priming and acquire a Th2 phenotype upon repetitive stimulations in neutral conditions. *Eur J Immunol* 25 (1995) 2722-2725
- 34.) DeSilva D.R., Jones E.A., Favata M.F., Jaffe B.D., Magolda R.L., Trzaskos J.M., Scherle P.A. Inhibition of mitogen-activated protein kinase blocks T cell proliferation but does not induce or prevent anergy. *J Immunol* 160 (1998) 4175-4181
- 35.) Eberl G., Brawand P., MacDonald H.R. Selective bystander proliferation of memory CD4(+) and CD8(+) T cells upon NK T or T cell activation. *J Immunol* 165 (2000) 4305-4311
- 36.) Eigler A., Siegmund B., Emmerich U., Baumann K.H., Hartmann G., Endres S. Anti-inflammatory activities of cAMP-elevating agents: enhancement of IL-10 synthesis and concurrent suppression of TNF production. *J Leukoc Biol* 63 (1998) 101-107

- 37.) Erard F., Wild M.T., Garcia-Sanz J.A., Le Gros G., Switch of CD8 T cells to noncytolytic CD8- CD4- Cells that make Th2 cytokines and help B cells. *Science* 260 (1993) 1802-1805
- 38.) Fischer T.A., Palmetshofer A., Gambaryan S., Butt E., Jassoy C., Walter U., Sopper S., Lohmann S.M. Activation of cGMP-dependent protein kinase I (beta) inhibits IL-2 release and proliferation of T cell receptor-stimulated human peripheral T cells. *J Biol Chem* 9 (2000)
- 39.) Fomina A.F., Fanger C.M., Kozak J.A., Cahalan M.D. Single channel properties and regulated expression of Ca(2+) release-activated Ca(2+) (CRAC) channels in human T Cells. *J Cell Biol* 150 (2000) 1435-1444
- 40.) Forth W., Henschler D., Rummel W., Starke K. „Allgemeine und spezielle Pharmakologie“. 7. völlig neu bearbeitete Auflage. Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg Berlin Oxford, 1996
- 41.) Fowell D.J., Magram J., Turck C.W., Killeen N., Locksley R.M. Impaired Th2 subset development in the absence of CD4. *Immunity* 6 (1997) 559-569
- 42.) Fukuzawa M., Satoh J., Ohta S., Takahashi K., Miyaguchi S., Qiang X., Sakata Y., Nakazawa T., Takizawa Y., Toyota T. Modulation of tumor necrosis factor-alpha production with anti-hypertensive drugs. *Immunopharmacology* 48 (2000) 65-74
- 43.) Glabiati F., Adorni L. Protocol for division of a CD4+ response to the T-helper 2 cell pathway. *Methods Mol Biol* 156 (2001) 233-244
- 44.) Gemsa D. (Hrsg.), Kalden J. R., Resch K. „Immunologie“. 4. neubearbeitete und erweiterte Auflage. Thieme Verlag Stuttgart, 1997
- 45.) Genaro A.M., Cremaschi G.A., Gorelik G., Sterin-Borda L., Borda E. Downregulation of beta adrenergic receptor expression on B cells by activation of early signals in alloantigen-induced immune response. *Neuroimmunomodulation* 8 (2000) 114-121
- 46.) Giembycz M.A., Corrigan C.J., Barnes P.J. Inhibition of CD4 and CD8 T-lymphocytes (T-LE) proliferation and cytokine secretion by isoenzyme-selective phosphodiesterase (PDE) inhibitors: correlation with intracellular cyclic AMP (cAMP) concentration. *J All Clin Immunol* 93 (1994) 167
- 47.) Goodman and Gilman`s “The pharmacological basis of therapeutics”, 9. Auflage. The McGraw-Hill Company, 1995
- 48.) Huang F.P., Niedbala W., Wei X.Q., Xu D., Feng G.J., Robinson J.H., Lam C., Liew F.Y. Nitric oxide regulates Th1 cell development through the inhibition of IL-12 synthesis by macrophages. *Eur J Immunol* 28 (1998) 4062-4070
- 49.) Huang L.R., Chen F.L., Chen Y.T., Lin Y.M., Kung J.T. Potent induction of long-term CD8+ T cell memory by short-term IL-4 exposure during T cell receptor stimulation. *Proc Natl Acad Sci USA* 97 (2000) 3406-3411
- 50.) Hudrisier D., Kessler B., Valitutti S., Horvath C., Cerottini J. C., Luescher I. F. The efficiency of antigen recognition by CD8+CTL clones is determined by the frequency of serial TCR engagement. *J Immunol* 161 (1998) 553
- 51.) Imani S., Jusko W.J., Steiner R. Diltiazem retards the metabolism of oral prednisone with effects on T-cell markers. *Pediatr Transplant* 3 (1999) 126-130
- 52.) Innerhofer P., Tilz G., Fuchs D., Luz G., Hobisch-Hagen P., Schobersberger W., Nussbaumer W., Lochs A., Irschick E. Immunologic changes after transfusion of autologous or allogeneic buffy coat-poor versus WBC-reduced blood transfusions in patients undergoing arthroplasty. II. Activation of T cells, macrophages, and cell-mediated lympholysis. *Transfusion* 40 (2000) 821-827
- 53.) Jewett A., Bonavida B. MHC-Class I antigens regulate both the function and the survival of human peripheral blood NK cells: role of endogenously secreted TNF-alpha. *Clin Immunol* 96 (2000) 19-28
- 54.) Kalinichenko V.V., Mokyr M.B., Graf L.H. Jr., Cohen R.L., Chambers D.A. Norepinephrine-mediated inhibition of antitumor cytotoxic T lymphocyte generation involves a beta-adrenergic receptor mechanism and decreased TNF-alpha gene expression. *J Immunol* 163 (1999) 2492-2499

- 55.) Kalinski P., Smits H.H., Schuitemaker J.H., Vieira P.L., van Eijk M., de Jong E.C., Wierenga E.A., Kapsenberg M.L. IL-4 is a mediator of IL-12p70 induction by human Th2 cells: reversal of polarized Th2 phenotype by dendritic cells. *J Immunol* 15 (2000) 1877-1881
- 56.) Kelso A. Educating T cells: early events in the differentiation and commitment of cytokine-producing CD4+ and CD8+ T cells. *Springer Semin Immunopathol* 21 (1999) 231-248
- 57.) Kelso A. Th1 and Th2 subsets: paradigm lost? *Immunology Today* 16 (1995) 374-379
- 58.) Klein J. „Immunologie“. Übersetzung herausgegeben von Reinhold E. Schmidt. VCH Verlagsgesellschaft mbH Weinheim, 1991
- 59.) Krenger W., Ferrera J.L.M. The current Th1/Th2 paradigm. *Immunol Res* 15 (1996) 50-73
- 60.) Krieger N.R., Fathman C.G., Shaw M.K., Ridgway W.M. Identification and characterization of the antigen-specific subpopulation of alloreactive CD4+ T cells in vitro and in vivo. *Transplantation* 69 (2000) 605-609
- 61.) Kuwata S. Mixed lymphocyte culture. *Nippon Rinsho* 57 (1999) 693-697
- 62.) Laouar Y., Crispe I.N. Functional flexibility in T cells: independent regulation of CD4+ T cell proliferation and effector function in vivo. *Immunity* 13 (2000) 291-301
- 63.) Latouche J.B., Sadelain M. Induction of human cytotoxic T lymphocytes by artificial antigen-presenting cells. *Nat Biotechnol* 18 (2000) 405-409
- 64.) Leposavic G., Plecas B., Kosec D. Differential effects of chronic propranolol treatment on the phenotypic profile of thymocytes from immature and adult rats. *Immunopharmacology* 46 (2000) 79-87
- 65.) Lowenstein L.J., Dverman J.L., Snyder S. H. Nitric oxide: a physiologic messenger. *Annu Intern Med* 120 (1994) 227-237
- 66.) Maghazachi A.A. Chemokines, G protein and natural killer cells. *Arch Immunol Ther Exp (Warsz)* 48 (2000) 65-72
- 67.) Malarkannan S., Horng T., Eden P., Gonzalez F., Shih P., Brouwenstijn N., Klinge H., Christianson G., Roopenian D., Shastri N. Differences that matter: major cytotoxic T cell-stimulating minor histocompatibility antigens. *Immunity* 13 (2000) 333-344
- 68.) Massari F., D'Andrea L., Cervo M.A., Serra F.P., Covelli V., Buscaino G.A. Quantitative and qualitative modifications of lymphocyte subsets after sublingual administration of isosorbide dinitrate in migraineurs. Preliminary report. *Acta Neurol (Napoli)* 16 (1994) 11-18
- 69.) Mills C.D., Kincaid K., Alt J.M., Heiman M.J., Hill A.M. M-1/M-2 macrophages and Th1/Th2 paradigm. *J Immunol* 164 (2000) 6166-6173
- 70.) Mills P.J., Goebel M., Rehmann J., Irwin M.R., Maisel A.S. Leukocyte adhesion molecule expression and T cell naïve/memory status following isoproterenol infusion. *J Neuroimmunol* 102 (2000) 137-144
- 71.) Mosman T.R., Coffman R.L. Heterogeneity of cytokine secretion patterns and functions of helper T cells. *Adv Immunol* 46 (1989) 111-147
- 72.) Müller S., Demotz S., Bulliard C., Valitutti S. Kinetics and extent of protein tyrosine kinase activation in individual T cells upon antigenic stimulation. *Immunology* 97 (1999) 287-293
- 73.) Mustafa A.S., Al-Attayah R.J., Nath I., Chugh T.D. "T cell subsets and cytokine interplay in infectious diseases". Karger Verlag, 1996
- 74.) Mutschler E. „Arzneimittelwirkungen“. 7. völlig neu bearbeitete und erweiterte Auflage. Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft mbH Stuttgart, 1996
- 75.) Negrotti A., Calzetti S. Cinnarizine-induced parkinsonism: ten years later. *Mov Disord* 14 (1999) 534-535

- 76.) Niedbala W., Wei X.Q., Piedrafita D., Xu D., Liew F.Y. Effects of nitric oxide on the induction and differentiation of Th1 cells. *Eur J Immunol* 29 (1999) 2498-2505
- 77.) O`Donovan M.R., Jones D.R., Robins R.A., Li K.F., Shim H.K., Zheng Z., Arlett C.F., Capulas E., Cole J. Co-cultivation of CD4+ and CD8+ human T cells lead to the appearance of CD4 cells expressing CD8 through de novo synthesis of the CD8 alpha-subunit. *Hum Immunol* 60 (1999) 1018-1027
- 78.) O`Garra A., Arai N. The molecular basis of T helper 1 and T helper 2 cell differentiation. *Trends Cell Biol* 10 (2000) 542-550
- 79.) Ozaki M.E., Webb S.R. Controlling mature CD4+ T cell responses. *Immunol Res* 21 (2000) 345-355
- 80.) Paul W.E. (Editor) "Fundamental Immunology". Third Edition. Raven Press New York, 1993
- 81.) Paul W.E., Seder R.A. Lymphocytes responses and cytokines. *Cell* 76 (1994) 241-251
- 82.) Petrov V., Lijnen P. Inhibition of proliferation of human peripheral blood mononuclear cells by calcium antagonists. Role of interleukin-2. *Methods Find Exp Clin Pharmacol* 22 (2000) 19-23
- 83.) Pösch G., Juan H., Beubler E., Dittrich P. „Wirkungen von Pharmaka“. Thieme Verlag Stuttgart, 1990
- 84.) Rodrigues M.M., Ribeiro M., Boscardin S.B. CD4 Th1 but not Th2 clones efficiently activate macrophages to eliminate *Trypanosoma cruzi* through a nitric oxide dependent mechanism. *Immunol Lett* 73 (2000) 43-50
- 85.) Roitt I.M., Brostoff J., Male D.K. „Kurzes Lehrbuch der Immunologie“. Deutsche Übersetzung von Ihor Harabacz, 3. neu-bearbeitete Auflage. Thieme Verlag Stuttgart, 1995
- 86.) Romagnani S. T-cell subsets (Th1 versus Th2). *Ann Allergy Asthma Immunol* 85 (2000) 9-18
- 87.) Romagnani S. Th1/Th2 cells. *Inflamm Bowel Dis* 5 (1999) 285-294
- 88.) Romagnani S. Human Th1- and Th2-subsets: doubt no more. *Immunol Today* 12 (1991) 256-257
- 89.) Romagnani S. Lymphokine production by human T cells in disease states. *Annu Rev Immunol* 12 (1994) 227-257
- 90.) Roncarolo M., Leving M.K. The role of different subsets of T regulatory cells in controlling autoimmunity. *Curr Opin Immunol* 12 (2000) 676-683
- 91.) Roozendaal R., Vellenga E., Postma D.S., De Monchy J.G., Kauffman H.F. Nitric oxide selectivity decreases interferon-gamma expression by activated human T lymphocytes via a cGMP-independent mechanism. *Immunology* 98 (1999) 393-399
- 92.) Rote Liste^R GmbH ECV Aulendorf, 2000
- 93.) Salgame P., Abrams J.S., Clayberger C., Goldstein H., Convit J., Modlin R.L., Bloom B.R. Differing lymphokine profiles of functional subsets of human CD4 and CD8 T cell clones. *Science* 254 (1991) 279-282
- 94.) Salgame P., Modlin R.L., Bloom B.R. On the mechanism of human T cell suppression. *Int Immunol* 13 (1992) 131-136
- 95.) Sato E., Simpson K.L., Grisham M.B., Koyama S., Robbins R.A. Reactive nitrogen and oxygen species attenuate interleukin-8-induced neutrophil chemotactic activity in vitro. *J Biol Chem* 14 (2000) 10826-10830
- 96.) Scholz H., Schwabe U. „Angewandte Pharmakologie“. Taschenbuch der Arzneibehandlung. Gustav Fischer Verlag Lübeck Stuttgart Jena Ulm. Govi Verlag, 1997
- 97.) Shanafelt M.C., Soderberg C., Allsup A., Adelman D., Peltz G., Lahesmaa R. Costimulatory signals can selectively modulate cytokine production by subsets of CD4+ T cells. *J Immunol* 154 (1995) 1684-1690

- 98.) Shaw A S., Dustin M.L. Making the T cell receptor go the distance: a topological view of T cell activation. *Immunity* 6 (1997) 361
- 99.) Sherman L.A., Chattopadhyay S. The molecular basis of allorecognition. *Annu Rev Immunol* 11 (1993) 385-402
- 100.) Skea D., Hedge R., Dabek B., Wettlaufer B., Wong T., Bell D. The selective expansion of functional T cell subsets. *J Hematother Stem Cell Res* 8 (1999) 525-538
- 101.) Slifka M.K., Whitton J.L. Activated and memory CD8+ T cells can be distinguished by their cytokine profiles and phenotypic markers. *J Immunol* 164 (2000) 208-216
- 102.) Smith C.M., Reynard A.M. "Textbook of Pharmacology". W. B. Sanders Company, 1997
- 103.) Smith S.M., Dockrell H.M. Role of CD8 T cells in mycobacterial infections. *Immunol Cell Biol* 78 (2000) 325-333
- 104.) Smyth M.J., Johnstone R.W. Role of TNF in lymphocyte-mediated cytotoxicity. *Microsc Res Tech* 50 (2000) 196-208
- 105.) Spellberg B., Edwards Jr. J.E. Type 1/Type 2 Immunity in Infectious Diseases. *Clin Infect Dis* 32 (2001) 76-102
- 106.) Spencer J.V., Braciale T.J. Incomplete CD8(+) T lymphocyte differentiation as a mechanism for subdominant cytotoxic T lymphocyte responses to a viral antigen. *J Exp Med* 191 (2000) 1687-1698
- 107.) Sprent J., Zhang X., Sun S., Tough D. T-cell proliferation in vivo and the role of cytokines. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 29 (2000) 317-322
- 108.) Stam W.B., van Oosterhout A.J.M., Nijkamp F.P. Pharmacologic modulation of Th1- and Th2-associated lymphokine production. *Life Science* 53 (1993) 1921-1934
- 109.) Steinman R.M., Inaha K. Stimulation of the primary mixed lymphocyte reaction. *CRC Critical Review in Immunology* 5 (1985) 331-348
- 110.) Surman D.R., Dudley M.E., Overwijk W.W., Restifo N.P. Cutting edge: CD4+ T cell control of CD8+ T cell reactivity to a model tumor antigen. *J Immunol* 164 (2000) 562-565
- 111.) Tadaki D.K., Craighead N., Saini A., Celniker A., Burkly L.C., Lee. K.P., Chute J.P., Harlan D.M., Kirk A.D. Costimulatory molecules are active in the human xenoreactive T-cell response but not in natural killer-mediated cytotoxicity. *Transplantation* 70 (2000) 162-167
- 112.) Tominaga K., Saito S., Matsuura M., Funatogawa K., Matsumura H., Nakano M. Role of IFN-gamma on dissociation between nitric oxide and TNF/IL-6 production by murine peritoneal cells after restimulation with bacterial lipopolysaccharide. *J Leukoc Biol* 66 (1999) 974-980
- 113.) Unanue E.R., Benacerraf B. „Immunologie“, übersetzt von Helmut Hahn und Stefan Kaufmann. 2. Auflage. Walter de Gruyter Verlag, 1987
- 114.) Valette L., Prigert A.F., Nemoz G., Anker G., Macorschi O., Lagarde M. Concanavalin A stimulates the rolipram-sensitive isoforms of cyclic nucleotide phosphodiesterase in rat thymic lymphocytes. *Biochem Biophys Res Commun* 169 (1990) 864-872
- 115.) Valitutti S., Müller S., Salio M., Lanzavecchia A. Degradation of T cell receptor TCR/CD3-z complexes after antigenic stimulation. *J Exp Med* 185 (1997) 1859
- 116.) Van der Veen R.C., Dietlin T.A., Dixon Gray J., Gilmore W. Macrophage-derived nitric oxide inhibits the proliferation of activated T helper cells and is induced during antigenic stimulation of resting T cells. *Cell Immunol* 10 (2000) 43-49
- 117.) Van der Veen R.C., Dietlin T.A., Pen L., Gray J.D. Nitric oxide inhibits the proliferation of T-helper 1 and 2 lymphocytes without reduction in cytokine secretion. *Cell Immunol* 193 (1999) 194-201

-
- 118.) Wulfing C., Rabinowitz J.D., Beeson C., Sjaastad M.D., McConnell H.M., Davis M.M. Kinetics and extent of T cell activation as measured with the calcium signal. *J Exp Med* 185 (1997) 1815
- 119.) Yates A., Bermann C., Leo Van Hemmen J., Stark J., Callard R. Cytokine-modulated regulation of helper T cell populations. *J Theor Biol* 206 (2000) 539-560
- 120.) Zhang Z.X., Yang L., Young K.J., DuTemple B., Zhang L. Identification of a previously unknown antigen-specific regulatory T cell and its mechanism of suppression. *Nat Med* 6 (2000) 782-789
- 121.) Zidek Z. Adenosine-cyclic AMP pathways and cytokine expression. *Eur Cytokine Netw* 10 (1999) 319-328

VIII ANHANG

1 *Abbildungsverzeichnis*

Abbildung 1: Allgemeiner Überblick über Klasse I- und Klasse II-MHC-Moleküle (Jan Klein)	4
Abbildung 2: Zentrale Bedeutung der T-Helferzellen für die zellvermittelte Immunität (Ivan M. Roitt)	5
Abbildung 3: Selektion von Effektormechanismen durch Th1- und Th2-Zellen (Ivan M. Roitt)	7
Abbildung 4: T-Zell-Suppression der Immunreaktivität (Ivan M. Roitt)	7
Abbildung 5: Aktivierung über den TZR (Jan Klein)	9
Abbildung 6: Wirkung von IL-1 auf Zellen des Immunsystems (Ivan M. Roitt)	11
Abbildung 7: Wirkung von IL-2 (Ivan M. Roitt)	12
Abbildung 8: Die Messung der gemischten Lymphozytenkultur (Jan Klein)	19
Abbildung 9: Die Messung der zellvermittelten Lymphozytentoxizität (Jan Klein)	24

2 Abkürzungsverzeichnis

AC	Adenylatzyklase
ADDC	antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity
(m) AK	(monoklonale) Antikörper
APZ	Antigen-präsentierende Zellen
ATP	Adenosintriphosphat
Ca ²⁺	Kalzium
cAMP	zyklisches Adenosinmonophosphat
CD	cluster of differentiation
cGMP	zyklisches Guanosinmonophosphat
CML	cell-mediated lympholysis
Con A	Concanavalin A
DAG	Diacylglycerol
E	Extinktion
ELISA	enzyme-linked immunosorbent assay
ER	Endoplasmatisches Retikulum
Exp.	Experiment
GC	Guanylatcyclase
GvH	graft versus host
HLA	human leukocyte antigen
HZV	Herzzeitvolumen
IgA, D-, -E, -G-, M	Immunglobulin A, -D, -E, -G, -M
IL	Interleukin
INF	Interferon
IP ₃	Inositoltriphosphat
ISDN	Isosorbiddinitrat
ISO	Isoproterenol
LDA	limited delution analysis
LDCC	lectin-dependent cell-mediated cytotoxicity
LGL	large granular lymphocytes
LT	Lymphotoxin
LTF	lymphocyte transforming factor
10 ⁻⁷ M	10 ⁻⁷ molar
MG	Molekulargewicht
MHC	major histocompatibility complex
MLC/MLR	mixed lymphocyte culture / mixed lymphocyte reaction
NE	Norepinephrin
NK	Natürliche Killerzellen
NO	Stickstoffmonoxid
PBL	periphere Blutlymphozyten
PG	Prostaglandin
PHA	Phytohämagglutinin
Ref.	Referenzwert
Th 1 bzw. 2	T-Helferzellen 1 bzw. 2
TGF	transforming growth factor
TNF	Tumornekrosefaktor
Ts	T-Suppressorzellen
TSF	T-suppressor soluble factor
ZNS	zentrales Nervensystem
ZTL	zytotoxische T-Lymphozyten

3 Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich bei allen bedanken, die mit Rat und Tat diese Arbeit unterstützten und somit ihre Entstehung erst ermöglichten:

Herzlichen Dank an meinen Doktorvater und Direktor der Urologischen Klinik und Poliklinik Universitätsprofessor Dr. R. Hartung für die Überlassung des Themas sowie ganz besonders an meinen Betreuer Herrn Dr. Dr. habil. Peter Leskovar für viele wertvolle Tipps, lehrreiche Gespräche, die Weitergabe seiner riesigen Kenntnisse auf dem Gebiet der Immunologie und für die große Geduld während der langen Zeit des Promovierens.

Ebenso gilt mein Dank den Mitarbeitern des Labors im Keller der Urologischen Abteilung für die Bereitstellung der Laboratorien, Arbeitsbedingungen, Materialien und Geräte sowie für die jederzeit bereitwilligen Auskünfte auf alle Fragen.

Vielen Dank auch an meine Familie für die bedingungslose Unterstützung, die wiederholte Aufmunterung, das Durchhaltevermögen und fürs Daumendrücken.

Ganz besonders bedanken möchte ich mich bei meinem lieben Mann für seine Geduld, sein Zuhören und seine fachliche Unterstützung beim Layout; ohne ihn wäre diese Doktorarbeit so nicht zustande gekommen!

4 Lebenslauf

Persönliche Daten	Name	Ulrike Holzhey, geb. Schreiner
	Geburtsdatum/-ort	22. März 1972 in München
	Familienstand	verheiratet
	Ehemann	Bernd Holzhey, Dipl.-Informatiker
Schulbildung	1978 - 1980	Grundschule der Deutschen Schule Thessaloniki/ Griechenland
	1980 - 1982	Grundschule Baldham
	1982 – 1991	Gymnasium Vaterstetten (Abiturnote 1,3)
Freiwilliges Jahr	Soziales 1991 - 1992	Stiftsklinik Augustinum München
Hochschulbildung	1992 – 1999	LMU München
	1995	Erster Abschnitt der Ärztlichen Prüfung (Note 2,0)
	1998	Zweiter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung (Note 1,66)
	1999	Dritter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung (Note 1)
Famulaturen	1995 - 1997	Innere Medizin, Allgemeinchirurgie, Gynäkologie, Allgemeinmedizin
Praktisches Jahr	1998 – 1999	Krankenhaus München-Schwabing: Infektiologie Psychiatrische Klinik Innenstadt, München Krankenhaus München-Harlaching: Chirurgie
Ärztin im Praktikum	1999-2001	Krankenhaus München-Bogenhausen, 2. Med. Abteilung – Schwerpunkt Gastroenterologie/Hepatology sowie Gastroenterologische Onkologie
Assistenzärztin	Seit 1.2.2001	Krankenhaus München-Bogenhausen, 2. Med. Abteilung –
Interessen		Sängerin im Münchner MotettenChor Klavier, Theater, Badminton