

**Beeinflussung der PBMC-Aktivität durch verschiedene
Testsubstanzen unter Heranziehung eines modifizierten
MLC-Ansatzes**

Nafisa Asefi

2006

Urologische Klinik und Poliklinik rechts der Isar
der Technischen Universität München
(Direktor: Univ.-Prof. Dr. R. Hartung)

Beeinflussung der PBMC-Aktivität durch verschiedene Testsubstanzen unter
Heranziehung eines modifizierten MLC-Ansatzes

Nafisa Asefi

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. Priv.-Doz. Dr. R. Paul

Die Dissertation wurde am 03.04.2006 bei der Technischen Universität München
eingereicht und durch die Fakultät für Medizin am 14.06.2006 angenommen.

Gewidmet meinem Mann Hamid und meinem kleinen Sohn Matin

Danksagung

Herrn Prof. Dr. med. R. Hartung danke ich sehr herzlich für die Möglichkeit, die vorliegende Arbeit durchzuführen

Mein besonderer Dank gilt Herrn Dr. Dr. habil. Peter Leskovaar für die Betreuung dieser Promotionsarbeit, insbesondere für seine engagierte Förderung der Arbeit, für viele wertvolle Anregungen und wegweisende Ratschläge

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	(1)
1.1	Immunsuppression	(1)
1.2	Immunsuppressiva	(2)
1.2.1	Indikation für eine immunsuppressive Therapie	(3)
1.2.1.1	Transplantation	(3)
1.2.1.2	Autoimmunerkrankungen	(8)
1.2.2	Zytostatika	(10)
1.2.2.1	Zellzyklus und Wirkung von Zytostatika	(11)
1.2.2.2	Unerwünschte Wirkungen der Zytostatikatherapie	(12)
1.2.2.3	Einige wichtige Zytostatika, die als Immunsuppressiva eingesetzt werden	(13)
1.2.2.3.1	Cyclophosphamid	(13)
1.2.2.3.2	Methotrexat	(14)
1.2.2.3.3	6-Mercaptopurin	(15)
1.3	Mixed Lymphocyte Culture Test (klassischer MLC)	(16)
1.3.1	Anleitung zur Durchführung des klassischen MLC-Tests	(17)
1.4	Fragestellung der Versuche	(19)
2	Material und Methoden	(20)
2.1	Materialien in alphabetischer Reihenfolge	(20)
2.2	Methoden	(21)
2.2.1	Zellkultur	(21)
2.2.2	Versuchsaufbau	(23)
2.2.2.1	Modifizierter MLC ohne Testsubstanzen	(23)
2.2.2.2	Modifizierte MLC mit Testsubstanzzusatz	(25)
3	Ergebnisse	(26)
3.1	Ergebnisse der Zellreihen ohne Testsubstanz	(26)
3.1.1	MLC-Versuch 1 ohne Testsubstanz	(26)
3.1.1.1	Ergebnisse am Tag 0	(26)
3.1.1.2	Ergebnisse am Tag 6	(27)
3.1.1.3	Zusammenfassung der Ergebnisse von Tag 0 und Tag 6	(27)
3.1.2	MLC-Versuch 2 ohne Testsubstanz	(29)
3.1.2.1	Ergebnisse am Tag 0	(29)
3.1.2.2	Ergebnisse am Tag 6	(29)
3.1.2.3	Zusammenfassung der Ergebnisse von Tag 0 und Tag 6	(30)
3.2	Ergebnisse des modifizierten Mixed Lymphocyte Culture Tests mit Zytostatika in verschiedenen Konzentrationen	(32)
3.2.1	MLC-Versuch mit Cyclophosphamid in verschiedenen Konzentrationen am Tag 0 und 6	(32)

3.2.1.1	MLC-Versuch mit Cyclophosphamid (Konz. 1×10^{-5} mol/l)	(32)
3.2.1.1.1	Ergebnisse am Tag 0	(32)
3.2.1.1.2	Ergebnisse am Tag 6	(32)
3.2.1.2	MLC-Versuch mit Cyclophosphamid (Konz. 1×10^{-7} mol/l)	(35)
3.2.1.2.1	Ergebnisse am Tag 0	(35)
3.2.1.2.2	Ergebnisse am Tag 6	(35)
3.2.1.3	MLC-Versuch mit Cyclophosphamid (Konz. 1×10^{-9} mol/l)	(38)
3.2.1.3.1	Ergebnisse am Tag 0	(38)
3.2.1.3.2	Ergebnisse am Tag 6	(38)
3.2.1.4	MLC-Versuch mit Cyclophosphamid (Konz. 1×10^{-11} mol/l)	(41)
3.2.1.4.1	Ergebnisse am Tag 0	(41)
3.2.1.4.2	Ergebnisse am Tag 6	(41)
3.2.1.4.3	Zusammenfassung der Ergebnisse von Tag 0 und Tag 6	(41)
3.2.2	MLC-Versuch mit 6-Mercaptopurin in verschiedenen Konzentrationen am Tag 0 und am Tag 6	(44)
3.2.2.1	MLC-Versuch mit 6-Mercaptopurin (Konz. 1×10^{-5} mol/l)	(44)
3.2.2.1.1	Ergebnisse am Tag 0	(44)
3.2.2.1.2	Ergebnisse am Tag 6	(44)
3.2.2.2	MLC-Versuch mit 6-Mercaptopurin (Konz. 1×10^{-7} mol/l)	(47)
3.2.2.2.1	Ergebnisse am Tag 0	(47)
3.2.2.2.2	Ergebnisse am Tag 6	(47)
3.2.2.3	MLC-Versuch mit 6-Mercaptopurin (Konz. 1×10^{-9} mol/l)	(50)
3.2.2.3.1	Ergebnisse am Tag 0	(50)
3.2.2.3.2	Ergebnisse am Tag 6	(50)
3.2.2.4	MLC-Versuch mit 6-Mercaptopurin (Konz. 1×10^{-11} mol/l)	(53)
3.2.2.4.1	Ergebnisse am Tag 0	(53)
3.2.2.4.2	Ergebnisse am Tag 6	(53)
3.2.2.4.3	Zusammenfassung der Ergebnisse von Tag 0 und Tag 6	(53)
3.2.3	MLC-Versuch 3 mit Methotrexat als Testsubstanz in verschiedenen Konzentrationen am Tag 0 und am Tag 6	(56)
3.2.3.1	MLC-Versuch mit Methotrexat (Konz. 1×10^{-5} mol/l)	(56)
3.2.3.1.1	Ergebnisse am Tag 0	(56)
3.2.3.1.2	Ergebnisse am Tag 6	(56)
3.2.3.2	MLC-Versuch mit Methotrexat (Konz. 1×10^{-7} mol/l)	(59)
3.2.3.2.1	Ergebnisse am Tag 0	(59)
3.2.3.2.2	Ergebnisse am Tag 6	(59)
3.2.3.3	MLC-Versuch mit Methotrexat (Konz. 1×10^{-9} mol/l)	(62)
3.2.3.3.1	Ergebnisse am Tag 0	(62)
3.2.3.3.2	Ergebnisse am Tag 6	(62)
3.2.3.4	MLC-Versuch mit Methotrexat (Konz. 1×10^{-11} mol/l)	(65)
3.2.3.4.1	Ergebnisse am Tag 0	(65)
3.2.3.4.2	Ergebnisse am Tag 6	(65)
3.2.3.4.3	Zusammenfassung der Ergebnisse von Tag 0 und Tag 6	(65)

4	Diskussion	(68)
4.1	Diskussion der Ergebnisse der modifizierten MLC-Tests ohne Testsubstanz	(68)
4.1.1	Auswertung der Ergebnisse am Tag 0	(68)
4.1.2	Auswertung der Ergebnisse am Tag 6	(69)
4.2	Diskussion der Ergebnisse der modifizierte MLC-Tests mit Cyclophosphamid in verschiedenen Konzentrationen	(70)
4.2.1	Auswertung der Ergebnisse am Tag 0	(70)
4.2.2	Auswertung der Ergebnisse am Tag 6	(71)
4.3	Diskussion der Ergebnisse der modifizierten MLC-Tests mit 6- Mercaptopurin in verschiedenen Konzentrationen	(72)
4.3.1	Auswertung der Ergebnisse am Tag 0	(72)
4.3.2	Auswertung der Ergebnisse am Tag 6	(73)
4.4	Diskussion der Ergebnisse der modifizierten MLC-Tests mit Methotrexat in verschiedenen Konzentrationen	(74)
4.4.1	Auswertung der Ergebnisse am Tag 0	(74)
4.4.2	Auswertung der Ergebnisse am Tag 6	(75)
5	Zusammenfassung	(77)
6	Literaturverzeichnis	(78)

Abkürzungen

Ag	Antigen
APC	antigen presenting cell: antigenpräsentierende Zelle
CD	cluster of differentiation/cluster determinants: Leukozytendifferenzierungsantigene
CML	cell-mediated lympholysis assay
CTL	cytotoxic T lymphocyte: zytotoxischer T-Lymphozyt
DNA	Desoxyribonucleinsäure
ELISA	Enzyme-Linked-Immunsorbent Assay
GvHD	Graft-versus-Host Disease
HLA	humane Leukozytenantigene
HvGD	Host-versus-Graft Disease
IFN	Interferon
Ig	Immunglobulin
IL	Interleukin
L	Liter
MHC	major histocompatibility complex: Haupthistokompatibilitätskomplex
MHC-I	Haupthistokompatibilitätskomplex der Klasse I
MHC-II	Haupthistokompatibilitätskomplex der Klasse II
MLC	mixed leukocyte culture: gemischte Leukozytenkultur
MLR	mixed leukocyte reaction: gemischte Leukozytenreaktion
MMC	Mitomycin C
NK-Zellen	natural killer cells: natürliche Killerzellen
PBMC	peripheral blood mononuclear cells: mononukleäre Zellen des peripheren Blutes
RNA	Ribonucleinsäure
SLE	systemischer Lupus erythematodes
Th	T-Helferzelle
Th0	naive Typ-0 T-Helferzelle
Th1	Typ 1 T-Helferzelle
Th2	Typ 2 T-Helferzelle
TIL	Tumorinfiltrierende Lymphozyten
TNF	Tumornekrosefaktor
TSA	Tumorspezifische Antigene

1 Einleitung

1.1 Immunsuppression

Immunsuppression ist die Unterdrückung oder Abschwächung der Reaktivität des Immunsystems mit dem Ziel unerwünschte Immunreaktionen auszuschalten.

Der Begriff der Immunsuppression wird heute in vielen Zusammenhängen benutzt, v.a. aber im Sinne der therapeutischen Immunsuppression bei Autoimmunerkrankungen und allogenen Organtransplantationen (62: S. 47-53).

Bei ungewollten Immunantworten im Fall von Allergien, Autoimmunkrankheiten und Transplantatabstoßungen ist man mit unterschiedlichen Problemen konfrontiert. Entsprechend unterschiedlich sind die Ansätze zur Entwicklung einer erfolgreichen Therapie.

Bei einer allergischen Reaktion, zu denen auch Asthma gehört, binden die Allergene IgE-Antikörper auf Mastzellen und lösen so die typischen Symptome aus. Das Ziel einer Therapie ist die nachteiligen Auswirkungen der IgE-Reaktion zu behandeln oder die Produktion von IgE-Antikörpern gegen die allergischen Antigene zu induzieren. Eine Autoimmunerkrankung entsteht, wenn eine spezifische adaptive Immunantwort gegen körpereigene Antigene (Autoantigene) ausgelöst wird. Dadurch sind die Komponenten des Immunsystems in der Regel nicht imstande, das Antigen vollständig zu beseitigen, so dass es zu einer andauernden Immunreaktion kommt. Die Folge ist, dass die Immunreaktionen chronisch entzündliche Gewebeschädigungen hervorrufen, die tödlich enden können. Die Mechanismen, die bei Autoimmunkrankheiten die Gewebeschäden verursachen, sind im Wesentlichen dieselben wie bei der schützenden Immunität und bei Allergien (94: S. 1-314). Das Behandlungsziel besteht darin, die Immunantwort abzuschwächen (Immunsuppression), um so Gewebeschäden und Funktionsstörungen zu verhindern (45: S. 593-606).

Die Transplantatabstoßung wird von Immunantworten auf Alloantigene im Transplantat verursacht. Dabei handelt sich um Proteine, die sich bei den einzelnen Individuen innerhalb einer Spezies unterscheiden und deshalb vom Empfänger als fremd wahrgenommen werden. Hier ist das Behandlungsziel eine Hemmung von Immunreaktionen gegen das transplantierte Gewebe. Da wir die Immunreaktion gegen das transplantierte Gewebe nicht spezifisch hemmen können, ohne die Immunabwehr zu beeinträchtigen, ist für die meisten Transplantationen eine allgemeine Immunsuppression des Patienten notwendig.

Eine wirksame Immunsuppression erreicht man dadurch, dass man die Zahl der im Körper vorhandenen Lymphozyten vermindert. Dies kann durch physikalische Maßnahmen erreicht werden, wie die Entnahme von zirkulierenden Zellen (Lymphapherese). Eine weitere Möglichkeit ist die gezielte Bestrahlung von Lymphozyten und ihrer Vorläuferzellen im Knochenmark (Radiotherapie). Beide Methoden spielen wegen der schlechten Steuerbarkeit klinisch keine Rolle.

Im klinischen Alltag wird eine Immunsuppression vor allem durch die Immunsuppressiva herbeigeführt.

1.2 Immunsuppressiva

Als Immunsuppressiva bezeichnet man Substanzen, die die adaptive Immunantwort über drei verschiedene Wirkmechanismen unterdrücken können:

A: Inhibitoren der Interleukin-2-Synthese

B: Inhibitoren der Interleukin-2-induzierten Zellproliferation

C: Immunologische Immunsuppressiva

Interleukin-2 wird von einer Untergruppe von T-Helfer Lymphozyten, den Th-1-Lymphozyten gebildet. Die Synthese wird durch die Aktivierung der Zellen induziert und stellt für alle T-Lymphozyten einen Wachstumsfaktor dar.

A: Inhibitoren der Interleukin-2-Synthese

Pharmaka, die eine Hemmung des für T-Lymphozyten essentiellen Wachstumsfaktors Interleukin-2 bewirken, führen zu einer Arretierung der Zellen in der G₀-Phase des Zellzyklus. Zu dieser Gruppe gehören Glukocorticoide, Cyclosporin®, Tacrolimus® und Pimecrolimus® (9: S. 363-399).

B: Inhibitoren der Interleukin-2-induzierten Zellproliferation

Die Hemmung der Interleukin-2-induzierten Zellproliferation führt dagegen zu einer Inhibition des G₁-S-Übergangs des Zellzyklus. Zu der Gruppe der auf diesem Weg wirksamen Immunsuppressiva gehören die Zytostatika Cyclophosphamid, Azathioprin und Methotrexat, die auch bei der Chemotherapie maligner Tumoren angewandt werden (eine genauere Erläuterung zu den verschiedenen Zytostatika folgt in 1.2.2.1). Aufgrund ihres Wirkmechanismus schädigen zytotoxische Immunsuppressiva vor allem proliferierende Lymphozyten. Da auch die Vorläuferzellen geschädigt werden, wird die Lymphozytenzellzahl im Blut rasch abgesenkt. Sobald das therapeutisch notwendige Ausmaß der Immunsuppression erreicht ist, fehlen dem Patienten allerdings auch Lymphozyten für die notwendige Abwehrreaktion gegen Pathogene (9: S. 363-399).

Eine immunsuppressive Therapie bewegt sich daher auf einem schmalen Grat. Die unerwünschte Immunreaktion soll ausreichend eingedämmt werden und dabei die notwendige Schutzfunktion nicht zu sehr schwächen (107: S. 281-299).

C: Immunologische Immunsuppressiva

Bei der immunologischen Immunsuppression wird die Zahl der zirkulierenden Lymphozyten durch Infundierung von (gentechnisch hergestellten) Antikörpern vermindert, die sich gegen Lymphozyten typische Antigene richten. Nach Bindung der Antikörper an die Lymphozyten werden diese durch eine komplementvermittelte Lyse zerstört. Zu dieser Gruppe der Immunsuppressiva gehören Muromonab CD3, Basiliximab und Daclizumab (9: S. 363-399).

1.2.1 Indikation für eine immunsuppressive Therapie

1.2.1.1 Transplantation

Unter Transplantation versteht man die Verpflanzung von Zellen, Geweben oder Organen, den so genannten Transplantaten, von einem Spender auf einen Empfänger zu therapeutischen Zwecken.

Die Grundregeln der Gewebeübertragung wurden zunächst anhand von Hauttransplantationen zwischen verschiedenen Mäuseinzuchtstämmen aufgeklärt. Mit einer Erfolgsquote von 100 Prozent lässt sich Haut von einer Stelle an eine andere Stelle desselben Tieres oder Menschen (autogene oder autologe Transplantation) oder zwischen genetisch identischen Individuen transplantieren (syngene Transplantation). Die derzeit häufigste Form der Organtransplantation ist jedoch die allogene oder Allotransplantation, d.h. die Übertragung zwischen genetisch unterschiedlichen Individuen derselben Spezies. Außerdem finden auch Transplantationen zwischen verschiedenen Spezies statt, sog. xenogene Transplantationen oder Xenotransplantationen (116: S. 4051-4056).

Entwicklungsgeschichtlich gehen Gewebetransplantationen auf das 7. Jh v. Chr. zurück. Ein chirurgisch tätiger Hindu namens Sushrutu deckte durch ein Stirnlappentransplantat einen durch eine amputierte Nase entstandenen Substanzdefekt (109: S. 75). Im 15. Jahrhundert n. Chr. begannen italienische Chirurgen Rhinoplastiken mittels verschiedener Lappentechniken durchzuführen. Dabei wurden die Entnahmestellen für die Hautlappen auf den Arm des betroffenen Patienten ausgedehnt. Im Jahr 1503 wurde erstmals von einer allogenen Hauttransplantation berichtet. Der Besitzer eines Leibeigenen soll durch dessen Haut eine neue Nase erhalten haben. Ende des 19. Jahrhunderts entwickelten sich Hauttransplantationen zur gängigen Praxis ohne dabei zwischen autogener und allogener Form zu unterscheiden. Selbst xenogene Transplantationen fanden ihre Anwendung, indem Patienten aus Fröschen und Schweinen stammende Transplantate verpflanzt wurden (66: S. 234). Ein russischer Arzt namens Sergeij Voronoff gelangte in Europa zu beträchtlichem Ansehen, als er einem Mann die Hoden eines Affen transplantierte, um ihm Jugend und Vitalität wiederzugeben (130). Die Transplantation innerer Organe war jedoch abhängig von dem Stand der chirurgischen Operationstechniken, wie der Entwicklung der Gefäßanastomose. 1908 berichtet Alexis Carrel, einer der Pioniere der Gefäßchirurgie, über eine „en bloc-Allotransplantation“ beider Nieren einer Katze. Teilweise wiesen die Katzen eine Harnproduktion über 25 Tage auf. Im Verlauf verstarben jedoch alle Katzen. Im Verlauf weiterer drei Jahrzehnte wurden keine entscheidenden Fortschritte zum Verständnis der auftretenden Komplikationen bei den beschriebenen Transplantationsversuchen gemacht. Gleichzeitig erhielt jedoch das verwandte Gebiet der „Tumortransplantation“ Aufmerksamkeit. 1902 beschrieb Jensen die Übertragung eines Mäusetumors auf 19 nachfolgende Generationen. Bei 50 % der injizierten Mäuse konnte er Tumorwachstum beobachten.

1936 führte der russische Chirurg Voronoy die erste allogene Nierentransplantation

klinisch durch, die jedoch vermutlich wegen Blutgruppenunverträglichkeit zum Scheitern verurteilt war (134). Erst 1952 erfolgte in Boston die erste erfolgreiche Nierentransplantation zwischen eineigenen Zwillingen (78: S. 327-382). Einen der wichtigsten Beiträge zum Verständnis der Transplantation in jener Zeit lieferte Sir Peter Medawar, der 1943 zusammen mit Gibson über ihre gemeinsamen Erfahrungen mit autologen und allogenen Hauttransplantationen an einer Frau, die ausgedehnte Verbrennungen dritten Grades erlitten hatte, berichtete (67: S. 299). Der Spender der allogenen Hauttransplantate war in diesem Fall ein Geschwister. Das größte Hindernis für eine erfolgreiche Übertragung ist die Transplantatabstoßung, die in Form der „Host-versus-Graft“-Reaktion, der „Graft-versus-Host“-Reaktion und dem „Graft-versus-Leukemia“-Effekt auftritt. Als Host-versus-Graft-Reaktion, HvGR oder Wirt-gegen-Transplantat-Reaktion bezeichnet man eine Immunreaktion des Empfängerorganismus auf bestimmte Spenderantigene im Rahmen von Allo- und Xenotransplantationen (15: S. 1190). Durch den Zeitpunkt, zu dem diese Reaktion auftritt, den klinischen Verlauf im Anschluss an eine Transplantation, die involvierten Zelltypen und Reaktionsabläufe lassen sich eine hyperakute Abstoßung, eine beschleunigte Abstoßung, eine akute Abstoßung und die chronische Abstoßung charakterisieren. Die hyperakute Abstoßungsreaktion führt zur Nekrose des Organs innerhalb von Minuten bis Stunden nach der Transplantation (50: S. 1611-1615). Es gibt bisher keine bekannten Therapiemöglichkeiten, die eine einmal in Gang gebrachte hyperakute Abstoßungsreaktion zum Stillstand bringen kann. Deshalb ist es notwendig, die Umstände, die sie initiieren, unbedingt zu vermeiden. Nicht alle Gewebe und Organe sind in gleicher Weise von einer hyperakuten Abstoßung betroffen. Primär handelt es sich um vaskularisierte Organe wie die Niere und das Herz. Bei Lebertransplantationen tritt jedoch trotz extrem guter Vaskularisation eher selten diese Form der Abstoßung auf (56: S. 168-177). Die beschleunigte Abstoßung tritt typischerweise innerhalb der ersten fünf Tage nach erfolgter Transplantation auf und wird durch Antikörper, die sehr schnell innerhalb dieses Zeitraumes induziert werden, vermittelt. Diese Form der Abstoßung ist bei allogenen Transplantationen selten, da die Antikörperantwort noch vor einer T-Zell-vermittelten Immunantwort benötigt wird. Wie bei der hyperakuten Abstoßungsreaktion wird die beschleunigte Abstoßung durch Antikörper ausgelöst, die an Antigenstrukturen des Spender-Gefäßendothels binden. Demnach gibt es eine Reihe von wichtigen Unterschieden zwischen der hyperakuten und der beschleunigten Abstoßung. Die hyperakute Abstoßung wird primär durch eine Komplementaktivierung vermittelt, während dies für die beschleunigte Abstoßung nicht notwendig ist. Letztere kann sogar verschiedene Zweitmediatoren wie Makrophagen und Monozyten involvieren. Der zweite wichtige Unterschied bezieht sich auf die Therapie. Hat eine hyperakute Abstoßungsreaktion einmal begonnen, ist die Transplantationsabstoßung durch keine Therapie mehr aufzuhalten, wohingegen die beschleunigte Abstoßung durch eine rigorose Therapie aufgehoben werden kann. Dazu zählen die Plasmapherese zur Entfernung von Spender-spezifischen Antikörpern aus dem Empfängerplasma und die medikamentöse Behandlung mit Anti-B-Zell-Reagenzien wie

Cyclophosphamid (135: S. 828-834). Diese Reagenzien haben vermutlich einen direkten Effekt auf das Spenderendothel, indem sie den Vorgang der Typ II-Endothelaktivierung blockieren. Obwohl für die beschleunigte Abstoßung eine Behandlungsmöglichkeit existiert, ist diese nicht immer erfolgreich.

Gegen Ende der ersten Wochen nach erfolgter Transplantation treten jedoch trotz immunsuppressiver Therapie des Empfängers Abstoßungsepisoden auf, die sich durch ihr späteres Auftreten, die Abwesenheit von Spender-spezifischen Antikörpern beim Empfänger und das Vorkommen von Zellinfiltraten in davon betroffenem Biopsiematerial von den bisher beschriebenen humoralen Abstoßungsformen unterscheiden. Es handelt sich dabei um akute Abstoßungsepisoden, die im Anschluss an die ersten Tage nach Transplantation jederzeit auftreten können, jedoch nimmt ihre Häufigkeit nach den ersten Monaten ab. Bevorzugt nach dem Absetzen einer immunsuppressiven Therapie kann selbst nach Jahren noch eine akute Abstoßung erfolgen.

Die akute Abstoßungsreaktion wird über T-Lymphozyten vermittelt. Sie zu verhindern bzw. zu therapieren erfolgt mit Hilfe zunächst erhöhter Dosen von Standard Immunsuppressiva, wie Cyclosporin A, Azathioprin, Glucokortikoide, FK-506 und Rapamycin sowie mittels monoklonaler Antikörper gegen T-Lymphozyten bzw. polyklonaler Antikörper im Rahmen einer Induktionstherapie. Im Rahmen der Erhaltungstherapie werden die Immunsuppressiva mit deutlich reduzierter Dosis eingesetzt (114: S. 66).

Statistiken bezüglich der Überlebenszeiten von Transplantaten zeigen, dass die Abstoßung transplantiert Organe selbst nach dem Erreichen einer einjährigen Überlebenszeit mit einer Rate von 3 % bis 5 % pro Jahr fortschreitet. Für den Großteil dieser Abstoßung werden immunologische Mechanismen verantwortlich gemacht. Dabei wird der Begriff chronische Abstoßung als Beschreibung für diese späten Prozesse der Transplantaterstörung verwendet. Aufgrund der zunehmenden Kontrollierbarkeit akuter Abstoßungsreaktionen durch immer effektivere immunsuppressive Therapien ist die chronische Abstoßung als eines der wichtigsten Probleme im Klinikalltag hervorgetreten. Die Ursachen der chronischen Abstoßung sind nicht immer immunologischen Ursprungs. Als potentielle Faktoren werden ein initialer ischämischer Insult, die reduzierte Masse des transplantierten Gewebes (v.a. im Fall von Nierentransplantaten kann dies zu Hyperfiltrationsschäden führen) und die Denervierung des Organs in Betracht gezogen. Hyperlipidämie und Hypertonie, die in Verbindung mit Immunsuppressiva auftreten, aber auch die Immunsuppressiva selbst und Schäden durch chronische Virusinfektionen werden als Ursache für Abstoßungsreaktionen erachtet (117: S. 222-228.)

Neben den o.g. Abstoßungsreaktionen gibt es prinzipiell auch die Möglichkeit einer Graft-versus-Host-Reaktion oder Transplantat-gegen-Wirt-Reaktion. Dabei geht man davon aus, dass reife T-Zellen des Spenders in der Lage sind, Gewebe des Empfängers nicht nur als fremd zu erkennen, sondern auch anzugreifen. Es wird eine akute GvHR von einer chronischen GvHR unterschieden. Im akuten Fall vermutet man einen Angriff auf körpereigene Zellen des Empfängers durch transplantierte T-Lymphozyten. Dieser Gewebsschädigung können sekundär

Infektionen folgen, an denen der Patient versterben kann. Eine chronische GvHR zeigt hingegen ähnliche klinische Symptome, die bei Kollagenosen und systemischen Gefäßerkrankungen auftreten können (113: S. 65, 61: S. 1091-1112). Bei dem Graft-versus-Leukemia-Effekt handelt es sich um eine durch Zellen des Spender-Immunsystems vermittelte Immunantwort, die zum Zustand einer kontinuierlichen Remission nach durchgeführter allogener Knochenmarktransplantation bei hämatologischer Malignität führt (24: S. 337-355). Die beteiligten Reaktionsmechanismen sind nicht vollständig bekannt. Eng in Verbindung mit dem GvL-Effekt steht die GvHR. Ähnliche Mechanismen sollen beide kontrollieren. Sowohl der GvL als auch die GvHR bedürfen der Erkennung von Empfänger-Alloantigenen durch T-Zellen des Spenders (30: S. 371-380, 49: S. 391-395).

Da die Transplantatabstoßung eine immunologische Reaktion ist, die von T-Zellen vermittelt wird, werden im Folgenden T-Zellen und ihre Interaktion mit anderen Zellen beschrieben.

T-Zellen werden über Zellen aktiviert, die körperfremde Proteine an ihrer Zelloberfläche präsentieren. Zu diesen Zellen zählen die so genannten Antigenpräsentierten Zellen (APC), Dendritische Zellen und Makrophagen, die durch den Körper patrollieren und Krankheitserreger phagozytieren. Peptidfragmente dieses Krankheitserregers werden an die Zelloberfläche transportiert und präsentiert. Cytotoxische T-Zellen und T-Helferzellen interagieren mit diesen Antigenen und werden so aktiviert.

Die Moleküle, die den T-Zellen Peptidantigene präsentieren, sind membrangebundene Glykoproteine, die von einer Gruppe von Genen mit der Bezeichnung Haupthistokompatibilitätskomplex, kurz MHC-Antigene (engl. Major Histocompatibility Complex), codiert werden.

Es gibt zwei Klassen von MHC-Molekülen (I und II), die sich in einigen Feinheiten unterscheiden. Die wichtigen Unterschiede zwischen den Molekülen der beiden MHC-Klassen bestehen nicht in ihrer Struktur, sondern in der Herkunft der Peptide, die sie präsentieren.

MHC-Klasse-I-Moleküle binden stabil an Peptide von Proteinen, die im Cytosol synthetisiert und abgebaut werden, während MHC-Klasse-II-Moleküle stabile Bindungen mit Peptiden von Proteinen eingehen, die im endocytotischen Vesikel abgebaut werden (40: S. 167-179, 131: S. 103-107).

MHC-Moleküle I und II unterscheiden sich auch in ihrer Bindung an T-Zellen.

T-Helferzellen, die typischerweise CD4 exprimieren, lagern mit MHC-II-Molekülen. Cytotoxische T-Zellen dagegen binden über CD8 an MHC-I-Moleküle. T-Helferzellen und Cytotoxische T-Zellen unterscheiden sich in ihrer Effektorfunktion (91: S. 1-17).

Es gibt für jede Klasse von MHC-Molekülen mehrere Gene, die in Gruppen innerhalb einer größeren Region angeordnet sind, dem so genannten Haupthistokompatibilitätskomplex (MHC). Die menschlichen MHC-Moleküle wurden entdeckt, als man Verbrennungsoptionen im Zweiten Weltkrieg mit Hauttransplantaten helfen wollte. Die Patienten stießen das übertragene Gewebe ab, das als „fremd“ erkannt wurde. Bald vermutete man aufgrund von

Untersuchungen an Mäusen, dass die Abstoßung die Folge einer Immunantwort war, und spätere genetische Experimente an Stämmen von Inzuchtmäusen zeigten, dass die schnelle Abstoßung von Hauttransplantaten durch Unterschiede in einer einzigen genetischen Region entsteht. Da diese Gene die Verträglichkeit (Kompatibilität) von Gewebstransplantaten bestimmen, nannte man sie „Histokompatibilitätsgene“.

Später stellte man fest, dass mehrere eng gekoppelte, polymorphe Gene die Histokompatibilität festlegen; so entstand schließlich die Bezeichnung Histokompatibilitätskomplex (27: S. 305-308). Innerhalb des MHC liegen die Gene für die MHC-Moleküle eng gekoppelt vor mit Genen, die am Abbau von Proteinen zu Peptiden, an der Bildung des Komplexes aus Peptid und MHC-Molekül und am Transport dieser Komplexe an die Zelloberfläche beteiligt sind. Weil die verschiedenen Gene für die MHC-I- und MHC-II-Moleküle hochpolymorph sind und kodominant exprimiert werden, exprimiert jedes Individuum eine Anzahl verschiedener MHC-I- und MHC-II-Moleküle. Jedes einzelne MHC-Molekül kann stabil eine Reihe von unterschiedlichen Peptiden binden, sodass das MHC-Repertoire jedes Individuums viele verschiedene Peptidantigene erkennen und binden kann. Da der T-Zell-Rezeptor einen Peptid-MHC-Komplex bindet, zeigen T-Zellen eine MHC-abhängige Antigenerkennung. Eine bestimmte T-Zelle ist damit spezifisch für ein bestimmtes Peptid im Komplex mit einem bestimmten MHC-Molekül (41: S. 180-194).

Die Gene, die die T-Zell-Rezeptoren codieren, haben sich offensichtlich im Laufe der Evolution auf die Erkennung der MHC-Moleküle hin entwickelt. So erklärt sich die große Zahl von T-Zellen, die auf Antigen-MHC-Moleküle reagieren. So wie sie beispielsweise auf einem Organtransplantat von einem nicht verwandten Spender vorkommen. Das heißt, wenn sich Spender und Empfänger in ihren MHC-Molekülen unterscheiden, lösen die fremden MHC-Moleküle des Transplantats eine Immunreaktion aus. Diese bezeichnet man als alloreaktive Immunreaktion, da sie sich gegen Antigene (Alloantigene) richtet, die sich bei verschiedenen Individuen derselben Spezies unterscheiden. Das Vorhandensein von alloreaktiven Zellen lässt sich leicht im Experiment durch die gemischte Lymphozytenreaktion (mixed lymphocyte reaction, MLR) nachweisen (2: S. 371-373).

Als klar wurde, dass die Erkennung fremder Proteine bei der Transplantatabstoßung eine wichtige Rolle spielt, unternahm man große Anstrengungen, die MHC-Typen von Spender und Empfänger aufeinander abzustimmen. Dadurch gelang es, die Erfolgsquote von Organverpflanzungen signifikant zu erhöhen. Aber selbst bei übereinstimmenden HLA-Typen sind Abstoßungsreaktionen nicht ausgeschlossen (20: S. 1211-1216).

Für diese Abstoßungsreaktionen gibt es zwei wichtige Gründe: Erstens ist die HLA-Typisierung aufgrund der polymorphen Natur und der Komplexität der menschlichen MHCs nie ganz exakt. Das heißt, dass nicht miteinander verwandte Personen, deren HLAs man aufgrund der Typisierung mit Antikörpern gegen MHC-Proteine für identisch erklärt, selten tatsächlich genau dieselben MHC-Genotypen aufweisen (65: S. 5380-5383).

Bei HLA-identischen Geschwistern sollte dies jedoch kein Problem sein. Da

Geschwister ihre MHC-Gene als Haplotypen erben, sollte eines von Vieren tatsächlich in Bezug auf den HLA-Typ mit dem des Empfängers übereinstimmen. Dennoch werden auch Transplantate von HLA-identischen Geschwistern generell abgestoßen, solange es sich bei Empfänger und Spender nicht um eineiige Zwillinge handelt. Die Abstoßung erfolgt hier etwas langsamer. Sie beruht auf so genannten Nebenhistokompatibilitätsantigenen (Peptide aus polymorphen zellulären Proteinen, die an MHC-Klasse-I-Moleküle gebunden sind). Diese bilden die zweite Ursache für das Versagen einer HLA-Abstimmung zur Verhinderung von Abstoßungsreaktion.

Da wir die Immunreaktion gegen das transplantierte Gewebe nicht spezifisch hemmen können, ist für die meisten Transplantationen eine allgemeine Immunsuppression notwendig.

Alle Transplantatempfänger müssen also immunsuppressive Medikamente erhalten, um die Abstoßung zu verhindern, wenn die Transplantation nicht zwischen eineiigen Zwillingen erfolgt. Vor dreißig Jahren erlitt die Mehrheit der Transplantatempfänger eine oder mehrere akute Abstoßunsepisoden und nur die Hälfte der Empfänger konnte ihr Transplantat für ein volles Jahr behalten. Heute lässt sich bei bis zu 80 % der Nieren-transplantierten Patienten keine akute Abstoßungsreaktion mehr verzeichnen (125: S. 1029-1037) und nur sehr selten wird ein Organtransplantat aufgrund einer Zell-vermittelten Abstoßung im Verlauf des ersten Jahres nach Transplantation verloren. Dies ist dem Einsatz neuerer Immunsuppressiva und monoklonaler Anti-T-Lymphozyten-Antikörper zu verdanken.

In der Tat sind die klinischen Erfolge bei der Transplantation von Organen gegenwärtig eher auf Fortschritte in der Immunsuppressionstherapie zurückzuführen als auf eine verbesserte Abstimmung der Gewebetypen von Spender und Empfänger. Heute ist die Gewebetransplantation zum Ersatz erkrankter Organe eine wichtige Behandlungsmethode und stellt eine absolute Indikation für eine immunsuppressive Therapie dar.

1.2.1.2 Autoimmunerkrankungen

Eine Autoimmunerkrankung entsteht, wenn eine spezifische adaptive Immunantwort gegen körpereigene Antigene (Autoantigenität) ausgelöst wird. Normalerweise ist das Ergebnis einer adaptiven Immunreaktion gegen ein Fremdenantigen die Beseitigung des Antigens aus dem Körper. Virusinfizierte Zellen werden beispielsweise durch cytotoxische T-Zellen zerstört, während lösliche Antigene durch die Bildung von Immunkomplexen aus Antikörper und Antigen beseitigt werden, die von Zellen des mononucleären Phagozytensystems, beispielsweise den Makrophagen, aufgenommen werden. Wenn sich dagegen eine adaptive Immunantwort gegen Autoantigene entwickelt, sind die Komponenten des Immunsystems in der Regel nicht mehr imstande, das Antigen vollständig zu beseitigen, sodass es zu einer andauernden Immunreaktion kommt. Die Folge ist, dass die Immunreaktion chronisch entzündliche Gewebeschädigungen hervorrufen

kann, die tödlich enden können (94: S. 1-314). Die Mechanismen, die bei Autoimmunerkrankungen die Gewebeschäden verursachen, sind im Wesentlichen dieselben wie bei der schützenden Immunität und bei Allergien. Die Gewebeschädigung kann auf einem direkten Angriff der antigenpräsentierenden Zellen, der Bildung von Immunkomplexen sowie auf lokalen Entzündungsreaktionen beruhen. Von Antikörpern gegen zelluläre Rezeptoren verursachte Autoimmunerkrankungen fallen in eine besondere Gruppe. Sie können entweder eine Überaktivierung oder eine Hemmung der Rezeptorfunktion verursachen. Es werden zwei Hauptgruppen von Autoimmunerkrankungen unterschieden: zum einen die Krankheiten, bei denen der Ausbruch der Autoimmunität auf bestimmte Organe im Körper beschränkt bleibt und die man als „organspezifische“ Autoimmunerkrankungen bezeichnet; und zum anderen die „systemischen“ Autoimmunerkrankungen, bei denen im Körper zahlreiche Gewebe betroffen sind (21: S. 353-355). Beispiele für organspezifische Autoimmunerkrankungen sind die Hashimoto-Thyreoiditis und die Basedow-Krankheit, die vor allem die Schilddrüse angreifen, sowie der insulinabhängige Diabetes mellitus Typ I, von dem die pankreatischen Inseln betroffen sind. Beispiele für systemische Autoimmunerkrankungen sind der systemische Lupus erythematoses (SLE) und das Sjögren-Syndrom I, bei denen verschiedene Gewebe wie Haut, Nieren und Gehirn betroffen sind. Die Autoantigene, die bei den Krankheiten dieser beiden Gruppen erkannt werden, sind selbst organspezifisch beziehungsweise systemisch. Die Basedow-Krankheit ist durch die Erzeugung von Antikörpern gegen den Rezeptor der schilddrüsenstimulierenden Hormone (TSH) in der Schilddrüse gekennzeichnet, die Hashimoto-Thyreoiditis durch Antikörper gegen die Schilddrüsen-Peroxidase und Diabetes mellitus Typ I durch Anti-Insulin-Antikörper. Im Gegensatz dazu treten bei SLE Antikörper gegen Antigene auf, die allgemein vorkommen und in jeder Körperzelle zahlreich vorhanden sind, beispielsweise Anti-Chromatin-Antikörper und Antikörper gegen Proteine des prä-mRNA-Spleißapparats (des Spleißosomenkomplexes) in der Zelle (84: S. 863-871). Autoimmunerkrankungen stellen eine Indikation für eine Therapie mit Immunsuppressiva dar, wenn sie entweder systemisch auftreten oder wenn schwer- wiegende organspezifische Störungen auftreten, die nicht anders behandelt werden können. Wichtige Beispiele für organspezifische Autoimmunerkrankungen, bei denen Immunsuppressiva indiziert sind, sind Autoimmunhämolytische Anämien, Goodpasture-Syndrom, Autoimmunhepatitis, Colitis ulcerosa, Myasthenia gravis, Basedow-Orbitopathie, sympathische Ophthalmie, Uveitis und einige bullöse Dermatosen, z.B. Pemphigus.

Aus der pathophysiologischen Erkenntnis, dass Autoimmunreaktionen für die Perpetuation von Entzündungen verantwortlich sind, werden bei chronisch-entzündlichen Erkrankungen auch Immunsuppressiva eingesetzt. Da die hierfür zur Verfügung stehenden Arzneimittel starke unerwünschte Wirkungen haben, bleibt die Therapie auf schwere Verlaufsformen beschränkt. Als Beispiel werden bei der rheumatoiden Arthritis neben dem Methotrexat die zytotoxischen Immunsuppressiva Azathioprin und Cyclophosphamid eingesetzt, um bei starker

Progression den Krankheitsprozess zu unterbrechen. Es sei angemerkt, dass bei einigen Pharmaka eine antiphlogistische Wirkung nur schwer von der immunsuppressiven abzugrenzen ist. Dies trifft z.B. für Glucocorticoide oder Methotrexat zu (90: S. 1227-1233).

Zusammenfassend stellen wir Folgendes fest:

Die heutigen Methoden zur Behandlung von unerwünschten Immunreaktionen wie Allergien, Autoimmunkrankheiten und Transplantatabstoßung beruhen zum großen Teil auf drei Arten von Medikamenten.

Entzündungshemmende Medikamente, unter denen die Corticosteroide am wirksamsten sind, werden bei allen drei Reaktionstypen eingesetzt. Sie haben ein breites Wirkungsspektrum, aber auch entsprechend viele toxische Nebenwirkungen. Ihre Dosierung muss deshalb sorgfältig kontrolliert werden. Üblicherweise werden sie deshalb in Kombination mit zytotoxischen oder immunsuppressiven Mitteln eingesetzt (23: S. 557-572).

Zytotoxische Medikamente töten alle Arten sich teilender Zellen. Sie verhindern zwar die Proliferation von Lymphozyten, unterdrücken aber auch alle übrigen Immunreaktionen und sind auch für andere sich teilende Zelltypen toxisch.

Immunsuppressive Medikamente wirken auf die intrazellulären Signalwege der T-Zellen. Ihre Allgemeintoxizität ist geringer als die der cytotoxischen Medikamente, aber auch sie unterdrücken unterschiedslos alle Immunreaktionen.

Bei der Behandlung von Patienten nach Organtransplantationen sind Immunsuppressiva heute die Mittel der Wahl. Hier kann man sie einsetzen, bevor die Immunreaktion auf das Transplantat erfolgt. Autoimmunkrankheiten sind dagegen zum Zeitpunkt der Diagnose bereits etabliert und infolgedessen sehr viel schwieriger zu behandeln. Auf Immunsuppressiva sprechen sie deshalb nicht so gut an, und man behandelt sie aus diesem Grund meist mit einer Kombination von Corticosteroiden und Zytostatika.

1.2.2 Zytostatika

Zytostatika (vom Griechischen Zyto = Zelle und Statik = anhaltend) sind natürliche oder synthetische Substanzen, die das Zellwachstum bzw. die Zellteilung hemmen. Sie werden vor allem zur Behandlung von Tumoren (Tumorchemotherapie) und teilweise auch bei der Behandlung von Autoimmunerkrankungen eingesetzt.

Obwohl beachtliche Fortschritte in der Tumorchemotherapie erreicht wurden, ist die Heilung bzw. eine deutliche Verlängerung der Überlebenszeit durch Anwendung von Zytostatika (kurative Chemotherapie) nur bei wenigen Tumoren möglich. Oftmals werden durch die Chemotherapie nur eine Teilremission, eine Linderung tumorbedingter Symptome und eine begrenzte Lebenszeitverlängerung erreicht (palliative Chemotherapie). Dies gilt besonders bei metastasierenden Neoplasien. Die Chemotherapie hat jedoch große Bedeutung nach einer erfolgreichen chirurgischen Entfernung des Tumors oder nach Bestrahlung, um restliche Tumorzellen zu eliminieren (adjuvante Chemotherapie). Von einer

neoadjuvanten Chemotherapie wird gesprochen, wenn Cytostatika vor dem chirurgischen Eingriff gegeben werden, um die Chancen einer radikalen Operation zu verbessern (31: S. 251-261).

Grundlage einer Chemotherapie von Tumoren ist heute nahezu in allen Fällen die Anwendung verschiedener Typen von Zytostatika als Kombinationstherapie.

Durch die Identifikation der „molekularen Ursachen der Fehlfunktion der Tumorzelle“ können spezifische Angriffspunkte für neue Zytostatika beschrieben werden, die dann – so hofft man – mit wesentlich höherer Selektivität als die meisten herkömmlichen Zytostatika wirksam sind.

Die Wirksamkeit der Chemotherapeutika bei schnell wachsenden Tumoren weist darauf hin, dass wachstumskinetische Aspekte von Tumorzellen für die Tumorchemotherapie von großer Bedeutung sind. Vereinfacht kann man die Zellen eines Tumors in drei unterschiedliche Populationen einteilen. Die erste Population bildet Zellen, die gerade proliferieren (Wachstumsfraktion). Die zweite Population bildet zeitweise nicht proliferierende Zellen. Diese Zellen können jedoch prinzipiell in die Wachstumsfraktion zurückkehren. Bei einer dritten Zellpopulation handelt es sich um differenzierte Zellen, die dauerhaft die Fähigkeit verloren haben zu proliferieren. Für die Chemotherapie sind die proliferierenden und ruhenden Zellen, die in die Proliferationsphase zurückkehren können, von Bedeutung.

1.2.2.1 Zellzyklus und Wirkung von Zytostatika

Bei proliferierenden Zellen sind verschiedene Zellzyklusphasen zu unterscheiden. Als G1 (Gap) wird die Phase zwischen Abschluss der Mitose und Beginn der DNA-Synthese bezeichnet. In der S-Phase findet die DNA-Synthese statt und in der G2-Phase wird die DNA-Verdoppelung überprüft. Die eigentliche Mitose findet in der M-Phase statt. Beim Übergang von der G1-zur S-Phase und von der G2-zur M-Phase wird an Kontrollpunkten (R, check points) geprüft, ob die Zelle in die nächste Phase des Zellzyklus eintreten kann.

An den Kontrollpunkten wirken extrazelluläre Wachstumssignale, aber auch „pathogene“ Signale von Onkogenprodukten fördernd auf die Zellzyklusprogression. Andererseits können hier eine Arretierung des Zellzyklus und die Eliminierung einer geschädigten Zelle durch Tumorsuppressoren (z.B. durch das Protein p53) eingeleitet werden.

Nach erfolgter Mitose können die Zellen erneut in den Zellzyklus eintreten, in die Ruhe-Phase (G0) gelangen oder durch terminale Differenzierung die Zellteilungsfähigkeit verlieren. Aus der G0-Phase können die Zellen erneut in den Zellzyklus eintreten (10: S. 921-925).

Alle Zytostatika wirken selektiv auf proliferierende Zellen.

Dies erklärt die gute Wirksamkeit der Chemotherapie bei Tumoren, die kurze Verdoppelungszeiten, d.h. eine große Wachstumsfraktion, haben. In der G0-Phase sind die Zellen meistens unempfindlich gegenüber Chemotherapeutika. Man kann danach wenigstens zwei Gruppen von Chemotherapeutika unterscheiden:

Die erste Gruppe bilden Zytostatika, die phasenspezifisch wirken. Hierzu gehören

die meisten Antimetaboliten und Mitosehemmstoffe. Die Antimetabolite, welche die Synthese von DNA-Bausteinen hemmen, wirken verständlicherweise in der S-Phase, während z.B. die Vinca-Alkaloide und Taxane in der späten G2- und M-Phase wirksam sind (133: S. 30-45).

Phasenspezifisch wirken Antrazykline, Alkylantien und Cisplatin. Dennoch wirken auch diese Chemotherapeutika besonders effektiv auf proliferierende Zellen. Man klassifiziert sie deshalb auch als zyklusspezifische Substanzen. Durch Einsatz von Zytostatikakombinationen werden die an sich asynchronen Tumorzellen gleichzeitig in unterschiedlichen Zyklusphasen abgetötet.

Viele Zytostatika, die primär auf unterschiedliche Weise wirken (Alkylantien, interkalierende Substanzen, Topisomerasehemmstoffe, Antimetaboliten), führen zur Elimination von Tumorzellen, indem sie Apoptose induzieren. Die Apoptose ist der programmierte Zelltod um geschädigte oder störende Zellen zu beseitigen. Dieser Prozess ist in vielen Fällen ebenfalls abhängig vom Tumorsuppressorprotein p53. Mutationen oder Fehlen von p53 können folglich zu Tumorresistenz gegen Zytostatika führen (98: S. 355-365).

1.2.2.2 Unerwünschte Wirkungen der Zytostatikatherapie

Auch gesunde Zellen werden durch Zytostatika geschädigt. Insbesondere betroffen sind Zellen und Gewebe mit einer hohen Proliferationsrate, wie das Knochenmark, das Epithel des Gastrointestinaltrakts sowie die Haarfollikel.

Zytostatische Wirkung auf diese Gewebe führt typischerweise zu Knochenmarksuppression, Mucositis und Stomatitis sowie zu Haarausfall. Zusammen mit Übelkeit und Erbrechen sind dies die häufigsten unerwünschten Wirkungen vieler Tumorchemotherapeutika.

Fast alle Zytostatika führen mehr oder minder ausgeprägt zu einer Knochenmarksuppression. Zu den wenigen Ausnahmen gehören Bleomycin, Asparaginase und Vincristin, die nur eine geringe Knochenmarksuppression zeigen. Zytostatika sind teratogen, mutagen und onkogen, d.h., durch die Therapie kann ein Zweitumor entstehen. Solche Sekundärneoplasien sind maligne Erkrankungen, die nach Strahlen- und/oder Chemotherapie mit einer zeitlichen Latenz von 2 bis 30 Jahren auftreten können und dann meist therapieresistent sind. Vor allem Alkylantien und Nitrosharnstoffe haben ein hohes kanzerogenes Potential.

Weitere häufige Nebenwirkungen sind Leberschädigung, Hyperurikämie durch Tumorzerfall sowie Sterilität und Wachstumshemmung bei Kindern. Einige Zytostatika zeigen spezifische Komplikationen, die dosislimitierend sind, wie z.B. die kardiotoxizität bei Doxorubicin und Daunorubicin oder die Neurotoxizität bei Vinca-Alkaloiden, Platinderivaten und Taxanen.

Bei der Kombinationschemotherapie wird versucht, durch Auswahl geeigneter Zytostatika mit unterschiedlichen dosislimitierenden Nebenwirkungen die Antitumorwirkung, aber nicht die toxischen Wirkungen zu erhöhen (74).

1.2.2.3 Einige wichtige Zytostatika, die als Immunsuppressiva eingesetzt werden

1.2.2.3.1 Cyclophosphamid

Das am häufigsten als Immunsuppressivum verwendete zytotoxische Medikament ist Cyclophosphamid.

Historisch leitet sich die Substanz vom Schwefellost (Senfgas, nach dem senfartigen Geruch) und Stickstofflost ab. Dies sind ölige Flüssigkeiten mit einem relativ hohen Dampfdruck. Eine Exposition kann über Dampf oder Aerosol erfolgen, die Warnwirkung durch Geruch oder eine Schleimhautreizung ist gering. Im Ersten Weltkrieg wurde Schwefellost als Gelbkreuzkampfstoff eingesetzt. Beim Einsatz des Kampfstoffs wurde beobachtet, dass neben den toxischen Wirkungen von Schwefellost auf Augen, Respirationstrakt und Haut eine Schädigung des blutbildenden und lymphatischen Systems sowie der Magenschleimhaut auftrat. Doch war zunächst eine therapeutische Anwendung von Schwefellost aufgrund seiner hohen Toxizität nicht möglich.

Stickstofflost erwies sich als geringer toxisch. Bereits 1942 wurden die ersten klinischen Studien mit dieser Substanz durchgeführt. Danach wurden Hunderte von Substanzen synthetisiert, die alle auf Stickstofflost zurückgingen. Nur sehr wenige Substanzen erwiesen sich als therapeutisch brauchbar (137).

Cyclophosphamid wurde 1958 als Tumorthapeutikum eingeführt. Nach Aktivierung in der Leber durch Hydroxylierung zu 4-Hydroxy-Cyclophosphamid gelangt es über das Blut zum eigentlichen Wirkort. Dort erfolgt eine nicht enzymatische Spaltung in Acrolein und das eigentliche alkylierende Agens Chlorethylphosphorsäureamid. Die hochtoxischen Wirkungen von Cyclophosphamid sind ein Zeichen seiner Herkunft; unter anderem ruft es Entzündungen und Blutungen der Harnblase, die so genannten hämorrhagische Cystitis, sowie Blasenkrebs hervor (138: S. 1082-1090).

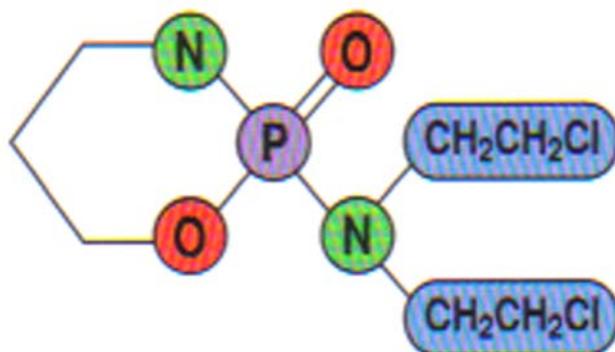


Abb. 1: Struktur des zytotoxischen Immunsuppressivums Cyclophosphamid

1.2.2.3.2 Methotrexat

Methotrexat ist ein Antimetabolit, das als Folsäure-Antagonist bevorzugt in der S-Phase des Zellzyklus wirkt. Methotrexat unterscheidet sich von Folsäure durch eine 4-NH₂-Gruppe und eine Methylgruppe am N10-Atom. Hierdurch bindet Methotrexat mit 10⁵fach höherer Affinität als das natürliche Substrat Dihydrofolat an das katalytische Zentrum der Dihydrofolat-Reduktase und blockiert seine Aktivität. Dadurch vermindert sich vor allem die Bildung von Thymidin und von Purinbasen, die für die DNA- und RNA-Synthese notwendig sind und so zu einem Funktionsverlust und dem Tod der Zelle führt (12: S. 930-937). Methotrexat ist eines der ersten erfolgreich eingesetzten Tumorchemotherapeutika. B-Lymphozyten scheinen gegenüber Methotrexat empfindlicher zu sein als T-Lymphozyten. Entsprechend wurde klinisch eine größere Empfindlichkeit bei der Antikörperbildung als bei zellulären Immunreaktionen beobachtet (107: S. 281-299).

Methotrexat wird bei zahlreichen Tumoren eingesetzt. Kurativ ist die Monotherapie beim Chorionkarzinom. Weitere Indikationen sind unter anderem das Osteo- und das Mammakarzinom. Zur Immunsuppression wird Methotrexat in einer mittleren Tagesdosis verabreicht. In einer niedrigeren Dosierung, d.h. ein Fünftel bis ein Zehntel der Immunsuppression-Dosis, wirkt Methotrexat hemmend auf die Aktivität von Entzündungszellen und damit antiinflammatorisch, ohne messbar Immunreaktionen zu beeinflussen. In dieser Weise wird es als langfristig wirksames Antirheumatikum bei der rheumatoiden Arthritis und schweren Formen der Psoriasis eingesetzt.

Zur kurativen Behandlung des Chorionkarzinoms, des Osteosarkoms und des Mammakarzinoms wird Methotrexat in hohen Konzentrationen eingesetzt. Die Aufnahme in Tumorzellen erfolgt aktiv über einen Transporter oder passiv durch Diffusion. Um höhere zelluläre Konzentrationen an Methotrexat zu erreichen, werden hohe Dosen des Antimetaboliten zusammen mit Formyltetrahydrofolsäure (Leukovorin) eingesetzt (12: S. 930-937). Bei hohen Dosen an Methotrexat erfolgt die Aufnahme in die Tumorzelle bei defektem Transporter auch durch Diffusion. Leukovorin, das gleichzeitig oder kurz nach Methotrexat gegeben wird, kann nicht in die Tumorzelle diffundieren. Es blockiert aber effektiv die Wirkung von Methotrexat in den gesunden Zellen, in die es über den aktiven Transport gelangt (Rescue-Therapie).

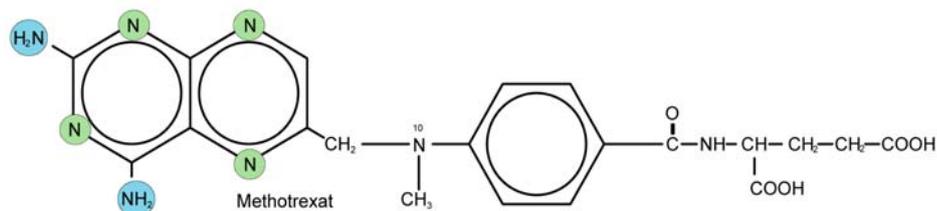


Abb. 2: Struktur des zytotoxischen Immunsuppressivums Methotrexat

1.2.2.3.3 6-Mercaptopurin

6-Mercaptopurin wird bei der Zellteilung anstelle der Purinbasen Adenin und Guanin in die DNA und RNA eingebaut. Nach Einbau in die DNA und RNA stört es zudem als falscher Baustein deren Funktion. Dies führt zu Funktionsverlust und schließlich zum Tod der Zelle (1: S. 3-7).

6-Mercaptopurin beeinträchtigt die Funktion von T-Lymphozyten stärker als die von B-Lymphozyten; daher hemmt es bevorzugt zelluläre Immunreaktionen. Auf die Antikörpersynthese hat es nur einen geringen Einfluss, der in mehreren klinischen Studien nicht nachweisbar war.

6-Mercaptopurin entsteht nach oraler Einnahme in der Leber aus dem Prodrug Azathioprin durch Verstoffwechselung in der Leber. Es wird bei Leukämien eingesetzt und als Immunsuppressivum zur Verhütung der Abstoßungsreaktion beim Transplantatempfänger und in niedrigerer Dosierung auch bei chronischen Entzündungen wie Morbus Crohn und rheumatoider Arthritis. Die wichtigsten Nebenwirkungen sind die Knochenmarksuppression und eine reversible Hepatotoxizität (59: S. 570-581).

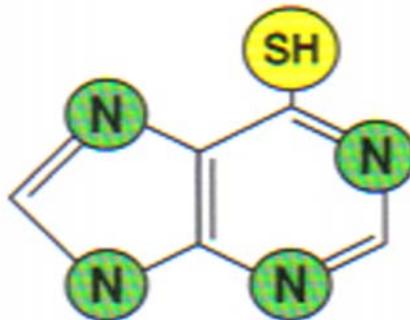


Abb. 3: Struktur des zytotoxischen Immunsuppressivums 6-Mercaptopurin

1.3 Mixed Lymphocyte Culture Test (klassischer MLC)

Der Mixed Lymphocyte Culture-(MLC-)Test ist ein in-vitro-Modell zum besseren Verständnis zellulärer Vorgänge bei der Erkennung von Alloantigenen durch verschiedene T-Zellsubpopulationen. Darin wird eine gemischte Leukozytenreaktion (MLR) ausgelöst, indem mononukleäre Leukozyten wie T- und B-Lymphozyten, NK-Zellen, mononukleäre Phagozyten und dendritische Zellen eines Individuums A (Empfänger) mit mononukleären Leukozyten eines anderen Individuums B (Spender) derselben Spezies zusammen kultiviert werden. Mit Hilfe der gemischten Lymphozytenreaktion lässt sich eine Gewebeunverträglichkeit feststellen. Dies ist bei (zellvermittelten) Abstoßungsreaktionen von Allotransplantaten infolge der Erkennung von transplantiertem Gewebe, d.h. fremden MHC-Genprodukten, durch $CD4^+$ - und $CD8^+$ -T-Zellen des Empfängers von entscheidender Bedeutung (14: S. 560-569).

Historisch war es ein wichtiger Schritt, als man 1960 entdeckte, dass periphere Leukozyten in Kultur durch Koinkubation mit Leukozyten eines anderen Spenders zur Mitose stimuliert werden können, und dass dieser Effekt bei eineiigen Zwillingen ausblieb (122: S. 1733-1736). Fritz Bach und Kurt Hirschhorn beschrieben 1964 erstmal den Zweiweg-MLR zur Evaluation der Spender-Kompatibilität vor Organspenden (19: S.813-814). Zwei Jahre später veröffentlichte Fritz Bach die Einweg-MLR mit Inaktivierung der Stimulatorzellen durch Mitomycin C, einer Mitose hemmenden Substanz (20: S. 545-547).

Wie sich später zeigte, waren es T-Zellen, die dort proliferierten und das umso mehr, je verschiedener die MHC-Moleküle der beiden Spender waren. D.h. bei Unterschieden in den Allelen der MHC-Gene zwischen den beiden Individuen beginnt ein Großteil der mononukleären Zellen über einen Zeitraum von 4 bis 7 Tagen zu proliferieren. Diese proliferative Reaktion ausgelöst durch MHC-Strukturdisparitäten lässt sich durch die Aufnahme von radioaktivem Tritium-Thymidin in die DNS bei der Zellreplikation quantifizieren und wird als allogene MLR bezeichnet. In dieser Zellkultur reagieren sowohl Zellen des Empfängers als auch des Spenders aufeinander und proliferieren (Zweiweg-MLR). Wird die Zellteilung der einen der beiden mononukleären Zellpopulationen durch Mitomycin C oder Gammabestrahlung gehemmt, meist die von B (sog. Responderzellen), dann können nur noch die Zellen (sog. Effektorzellen) des anderen Spenders proliferieren (Einweg-MLR). Das Maximum der Reaktion ist bei Verwendung niedriger Responderzellkonzentrationen (250.000/ml) am Tag 6 oder später, bei hohen Konzentrationen (1000000 /ml) einige Tage früher erreicht. In einer allogenen MLR kommt es zur Stimulation von zwei verschiedenen Populationen alloreaktiver T-Zellen, den $CD8^+$ -T-Zellen und den $CD4^+$ -T-Zellen. $CD8^+$ -Zellen treten normalerweise als zytolytische T-Lymphozyten auf (CTL) und erkennen MHC-Klasse-I-Moleküle wie HLA-A, HLA-B oder HLA-C beim Menschen und H-2K, H-D oder H-L bei Mäusen als Zielstruktur. Jede einzelne CTL ist spezifisch für eine bestimmte MHC-Klasse I-Genprodukt, die Mehrheit der CTLs richtet sich jedoch gegen alle MHC-Klasse-I-Allelunterschiede zwischen ursprünglicher

Stimulator-und Responderzellpopulation. In einem „one-way primary MLR“ lassen sich CD8⁺-CTLs des Individuums A anhand eines speziellen Lyse-Tests, dem CML, mithilfe von Targetzellen, die MHC-Klasse-I-Moleküle des Spenders B exprimieren, nachweisen.

Der Vollständigkeit halber ist zu erwähnen, dass die funktionelle Unterteilung der CD4⁺-und CD8⁺-alloreaktiven T-Zellen in Helferzellen und CTLs nicht als absolut zu betrachten ist. Vor allem beim Menschen ließen sich in der MLR ebenso CD4⁺-MHC-Klasse-II-spezifische CTLs sowie einige CD8⁺-T-Zellen mit einem Zytokinprofil wie IL-2, γ -IFN, TNF bzw. Lymphotoxin ähnlich dem vieler CD4⁺-Zellen nachweisen (6: S. 205-221).

1.3.1 Anleitung zur Durchführung des klassischen MLC-Tests

Der erste Schritt bei dem klassischen MLC-Test ist die Isolierung von Lymphozyten. Menschliche Lymphozyten lassen sich am leichtesten aus dem peripheren Blut mithilfe von Ficoll-Hypaque Flotationssystemen aus heparinisiertem Blut gewinnen und anschließend in Rundboden-Mikrotiterplatten in einer Zelldichte von 5×10^4 Zellen je Zellfraktion kultivieren (58: S. 289-299). Die Zellen werden in einem Gesamtvolumen von 0,2 ml pro Well in supplementiertem RPMI 1640 inkubiert. Die Anzahl der Testansätze hängt von der Testart und der Fragestellung ab. Es werden Referenzkulturen angelegt, die aus dem Medium allein sowie Kulturen aus Zellen nicht verwandter Individuen bestehen. Zusätzlich können potentielle Spenderzellen B, welche als Stimulatorzellen agieren, in ihrer mitogenen Aktivität inaktiviert werden. Dies geschieht entweder durch Bestrahlung mit 1200 bis 1300 Gy oder durch Vorbehandlung mit Mitomycin C, einem zytostatisch wirksamen Antibiotikum aus *Streptomyces caespitosus*. Anschließend werden die gemischten Zellkulturen in befeuchteter und mit 5 % CO₂ angereicherter Atomsphäre bei 37,5 °C über 5 Tage (ca. 120 h) inkubiert. Es folgt eine radioaktive Markierung mit ³H-Thymidin in Höhe von 1 bis 2 μ Ci und eine weitere Inkubation über 18 h.

Nach insgesamt 138 Stunden Inkubationszeit werden Mikrotiterplatten aus dem Brutschrank entnommen und die Kulturen anhand eines automatisierten „Zellerntegeräts“ eingeholt. Der Rückstand einer jeden Kultur, welcher in Glasfaserfiltern während des „Erntevorgangs“ aufgegangen wird, wird einem β -Zähler zugeführt und die gemessene Radioaktivität als cpm pro Kultur ausgedrückt. Zur Herstellung eines Zusammenhangs zwischen der Höhe an Zellaktivität im Sinne einer zellulären Transformation einer jeden Zellkultur und dem Grad an Gewebeverträglichkeit (Histokompatibilität) zwischen den beiden Zellpopulationen gibt es zwei Methoden. Der Stimulationsindex wird nach $\text{cpm test culture} / \text{cpm autologous control}$ ermittelt und die Bestimmung des RR-Wertes nach $[(\text{cpm test culture} - \text{cpm autologous control}) / (\text{cpm unrelated culture} - \text{cpm autologous control})] \times 100$. Letzterer Wert dient vor allem zur Untersuchung der HLA-D-Region-Kompatibilität. RR-Werte von HLA-identischen Geschwistern sind annähernd 0.

Bei der Testung von Patienten, bei denen eine mögliche Knochenmarktransplantation durchgeführt werden soll, gilt ein besonderes Augenmerk den ungewöhnlichen MLC-Reaktionen, die aufgrund der Erkrankung des Patienten auftreten können. Zu dieser Grunderkrankung gehören aplastische Anämien sowie akute und chronische Leukämieformen.

Zellen von Patienten mit aplastischer Anämie können beispielsweise in einer MLR entweder nur noch sehr reduziert stimuliert werden oder aber erhöhte bis stark erhöhte Zellaktivitäten aufweisen, infolge einer Stimulation durch Zellen von HLA-identischen Geschwistern (92: S. 90-95). Die Gründe für solch gestörte Aktivitätsverhaltensmuster sind unklar und nur schwer kontrollierbar. Sie sollten jedoch bei der Interpretation von Aktivitätsverhalten gemischter Zellkulturen beachtet werden.

Die Gründe für abnorme MLC-Reaktionen in Zellkulturen von Patienten mit akuter oder chronischer Leukämie lassen sich leichter finden. Tumorzellen im peripheren Blut eines erkrankten Patienten mit lymphozytotoxischen Substanzen oder Bestrahlung, Leukämie bedingte Veränderungen der zellulären Blutbestandteile des Empfängers, die Beeinflussung einer in vitro Immunreaktion durch die Anwesenheit von Suppressorzellen und die vollständige Unterdrückung einer jeglichen Lymphozytenreaktion durch Chemotherapeutika wie Cyclophosphamid, L-Asparaginase und Daunrubicin können als Gründe genannt werden. Eine erhöhte Antwortaktivität ähnlich wie bei Patienten mit aplastischer Anämie ist möglicherweise das Ergebnis krankheitsbedingter Imbalancen zwischen Regulatorzellen des Immunsystems. Einige Veränderungen an der MLC-Technik können helfen, solche Probleme zu umgehen. Die Durchführung des MLC-Tests bei Patienten mit Erkrankungsrückfall sollte verschoben werden, bis eine Remission erreicht und die Chemotherapie für mindestens ein bis zwei Wochen abgeschlossen wurde. Das Plasma des Patienten sollte vor Anlegung einer Zellkultur durch NHS ersetzt werden. Zellkulturen sollten in verschiedenen Zellkonzentrationen angesetzt werden.

1.4 Fragestellung der Versuche

Der Begriff der Immunsuppression wird heute in vielen Zusammenhängen benutzt, v.a. aber im Sinne der therapeutischen Immunsuppression bei Autoimmunerkrankungen und allogenen Organtransplantationen. Doch es waren immer auch die Phänomene bekannt, die zur Unterdrückung der Immunfunktionen führen. Diese Unterdrückung ist ein wichtiger und essentieller Aspekt im Gleichgewicht des Immunsystems – im Sinne der Eigentoleranz gegen Autoantigene, im Sinne der Beendigung von Immunreaktionen oder krankhaft bei Immundefizienzen. Es gibt Daten, die zeigen, dass es neben den Suppressorzellen auch Suppressionsinduktionszellen gibt, die selbst nicht suppressiv sind, aber Suppressorzellen aktivieren können. Aus vielen Versuchen ist bekannt, dass durch starke Aktivierung von Lymphozyten, durch Alloantigene (in einer MLR), eine unspezifische Suppression induziert werden kann.

Die Zielsetzung dieser Arbeit war die Testung des immunsuppressiven Effektes einiger klinisch eingesetzter Chemotherapeutika in Abhängigkeit von deren Konzentration, wobei der niedrige und extrem niedrige Konzentrationsbereich von besonderem Interesse war, sowie die experimentelle Überprüfung der theoretisch abgeleiteten immunmodulatorischen Wirkung einiger Zytostatika bei subtoxischen Dosierungen, speziell jener, deren katabolische Intermediate semichinon-artige Strukturen enthalten. Dazu wurden verschiedene Zytostatika (Methotrexat, 6-Mercaptopurin und Methotrexat) in unterschiedlich hohen Konzentrationen getestet. Die Methode der gemischten Leukozytenreaktion (MLR) wurde modifiziert, aber in Grundzügen wie vorher beschrieben durchgeführt.

2 Material und Methoden

2.1 Materialien in alphabetischer Reihenfolge

Laborinventar: Absauggerät (Atmolit 16N, Atmos), Autoclav (2540 EL, Tuttnauer), Brutschrank (CO₂-Auto-Zero, Heraeus), Bunsenbrenner (Fireboy[®] eco, IBS), Mehrkanalpipetten für 10-100 µl und 20-200µl (Transferpette-8[®], Brand), Mikroliterpipetten 10-100 µl, 20-200 µl, 100-1000 µl (Transferpette[®], Brand), Mikroskop (Axiovert, Zeiss), Spektrophotometer (THERMOmax[®], Molecular Devices), Spektrophotometer-Steuerungssoftware (SOFTmaxPRO[®] für PowerMacintosh 7300/200, Molecular Devices), Pipettiergerät (Pipetboy[®] acu, IBS), Reinluft-Sicherheitswerkbank (LaminAir HB 2448, Heraeus), Waage (AT 250, Mettler), Zentrifuge (Rotina 48 und Rotanta/RP, Hettich).

Verbrauchsmaterial: Einfrier-Röhrchen (Nunc Cryo Tubes, Nunc Brand), Filter (Minisart, Porengröße 0,20 µl, Sartorius), Mikrotiterplatten für Suspensionskulturen mit 96, 24, 12 Wells (Brand), Pipettenspitzen 2-200 µl und 50-1000 µl (Sarstedt), Plastikpipetten 1 ml, 2 ml, 5ml, 10 ml, 25 ml (Greiner), Transferpipetten (BD-Falcon), Wägebapier (NeoLab), Zentrifugenröhrchen 12 ml und 50 ml (Greiner), Combitips plus 2,5 ml (Eppendorf).

Chemikalien: Antibiotic Antimycotic Solution (Penicillin, Streptomycin, Amphotericin B, Sigma), Cyclophosphamid, Dimethylsulfoxid (Merck), L-Glutamin (Biochrom), Methotrexat, 6-Mercaptopurin, Mitomycin C, nichtessentielle Aminosäuren (Biochrom), DMPX (RBI), Gentamicin (Sigma), Pyruvat (Biochrom), Cell Proliferation Reagent WST-1, Boehringer, RPMI 1640 (Sigma), RPMI 1640 ohne Phenolrot (Sigma), stabiles Glutamin (N-Ac-L-Ala-L-Gln, Biochrom), Tolbutamid (RBI), Trennmedium zur Dichtezentrifugation (Accuspin-Histopaque[®]-1077, Sigma), Triton[®] X-100 (Sigma). Falls nichts anderes angegeben, wurden die Chemikalien in physiologischer Kochsalzlösung (0,9 %) aufgelöst, im Wasserbad auf 37 °C erwärmt und mittels steriler Membranfilter (Porengröße 0,20 µm) steril filtriert.

Blutprodukte: Als Beobachtungseinheit wurden mononukleäre Zellen des peripheren Blutes (PBMC) gewählt, weil sie ausreichend das spezifische Immunsystem repräsentieren. Dafür wurden vom Blutdepot der Chirurgischen Klinik des Klinikums rechts der Isar und des bayerischen Roten Kreuzes Erythrozytenkonzentrate bezogen und daraus die Buffy Coats (Blutleukozyten) nach einer Standardvorschrift hergestellt.

2.2 Methoden

2.2.1 Zellkultur

Suspensionskultur mononukleärer Zellen des peripheren Blutes (PBMC)

In Anlehnung an die von Boyum im Jahr 1968 beschriebene Methode über die Isolierung von Lymphozyten und anderen mononukleären Zellen aus Vollblut und Knochenmark (32: S. 77) wurden mittels Dichtezentrifugation in Ficoll-Histopaque-Technik aus den Buffy Coats von Blutkonserven die mononukleären Zellen des peripheren Blutes (PBMC) verschiedener Spender gewonnen (118). Durch Zentrifugation der Blutkonserven trennen sich die Erythrozyten von den Schichten, in denen sich die Granulozyten befinden. Eine solche Buffy Coat enthaltende Konserve wird unter sterilen Bedingungen mit einer sauberen Schere geöffnet und umgehend in einen dafür ausreichend großen sterilen Behälter umgefüllt. Der Inhalt wird anschließend langsam und gleichmäßig auf drei ACCUPIN™ System-HISTOPAQUE®-1077-Röhrchen mit je 15 bis 20 ml Blut aufgeteilt. Darunter versteht man ein strahlensterilisiertes Polypropylenröhrchen, das mit einer Niederdruckpolyethylen-Trennschicht „Fritte“ ausgestattet und aseptisch mit dem Trennmedium HISOPAQUE®-1077 gefüllt ist. Dieses Trennmedium ist eine wässrige Lösung aus 5,7 g/dl Polysaccharose mit hohem Molekulargewicht und 9,0 g/dl Natriumdiazoat, einer nichtionogenen Jodverbindung, mit einer Dichte von 1,077 bei +25 °C. Das ACCUSPIN™-Röhrchen wird durch die poröse Trennschicht in zwei Kammern unterteilt. Mit Antikoagulanzen versetztes Vollblut kann in die obere Kammer des Röhrchens gegeben werden, ohne dass es zu einer Durchmischung mit HISOPAQUE® in der Kammer unterhalb der Fritte kommt. Beim Zentrifugieren (laut folgendem Programm: Bremse 2, Beschleunigung bei 800 g, (r/min) bei 152, Zeitdauer 15 min.) tritt das Vollblut durch die Fritte und kommt so mit HISTOPAQUE®-1077 in Kontakt. Die Zellelemente mit höherer Dichte verdrängen eine bestimmte Menge HISTOPAQUE®-1077 in den Bereich über der Fritte, wodurch eine klare Trennung der Blutkomponenten erfolgt. Durch ein Anhäufen der Erythrozyten und eine leichte Erhöhung des osmotischen Druckes der Granulozyten steigt die Sedimentationsgeschwindigkeit und die Zellen setzen sich schließlich am Boden des ACCUSPIN™-Röhrchens ab. Lymphozyten und andere mononukleäre Zellen verbleiben in der Plasma-HISTOPAQUE®-1077-Interphase überhalb der Trennschicht. Der über dieser mononukleären Zellschicht liegende Plasmaüberstand wird mit einer sterilen Pasteur-Pipette abgesaugt. Die Schicht mononukleärer Zellen kann entweder durch Abgießen oder Abpipettieren entnommen werden. Eine Erythrozytenkontamination wird aufgrund der Trennschicht zwischen den beiden Kammern vermieden (118). Der über dieser mononukleären Zellschicht liegende Plasma-Überstand wird mit einer sterilen Pasteur-Pipette abgesaugt. Anschließend erfolgt die Übertragung der weißlichen Schicht mittels einer sterilen Pipette in ein neues steriles leeres „Cup“. In dieser

übertragenen weißlichen Zellsuspension sind sog. periphere Blutlymphozyten (abgekürzt PBLs oder PBMCs). Dieser Cup wird nun mit einer 10:1 Mischung aus einem Phosphatpuffer (PBS) und fetalem Kälberserum (FKS) auf ein Volumen von 25 ml aufgefüllt. Bei der Verwendung von FKS ist es wichtig, das tiefgefroren gelagerte FKS bereits 24 h vor Gebrauch aus dem Gefrierschrank zu nehmen und im vollständig aufgetauten Zustand für 20 Minuten bei +56 °C zu „inaktivieren“.

Diese Zellsuspension wird gewaschen. Nach einer Zentrifugation (Bremsen 5, 400 g für 5 Minuten) wird der Überstand vorsichtig abgesaugt. Das Röhrchen wird erneut mit der PBS-FKS-Lösung auf 20 ml aufgefüllt. Dieser Vorgang wird zweimal wiederholt.

Es folgt die Einstellung der gewünschten Zellkonzentration auf 2×10^7 Zellen/ml. Die Anzahl vitaler Zellen pro Milliliter wurde mittels Trypanblaufärbung der Zellen und Zellzählung in einer Neubauer-Zählkammer doppelt bestimmt (104: S. 347-348). Die so eingestellten Zellsuspensionen wurden tiefgefroren. In jedes Einfrier-Röhrchen wurden 1 ml Zellsuspension und 1 ml der Gefrierlösung pipettiert. Die Zusammensetzung der Gefrierlösung bestand aus 16 Teilen FKS, 5 Teilen Dimethylsulfoxid und 4 Teilen RPMI 1640. Die Gefäße wurden dann in Styropor verpackt möglichst langsam in einem -70°C -Gefrierschrank eingefroren, um den Bedingungen des kontrollierten Tieffrierens gerecht zu werden und die Zellen nicht zu schädigen. Die Einstellung der gewünschten Zellkonzentration erfolgt mithilfe einer Neubauer-Zählkammer.

Tab. 1: Pipettierschema zur Herstellung der verwendeten Kulturmedien. Da RPMI 1640 ohne Phenolrot kein L-Glutamin enthält, wurde dieses in entsprechender Menge substituiert.

Standard-Zellkulturmedium		
500,00	ml	RPMI 1640
50,00	ml	FKS (fetales Kälberserum)
5,00	ml	nichtessentielle Aminosäuren
5,00	ml	Pyruvat (100 mM)
2,50	ml	stabiles Glutamin (200 mM)
2,50	ml	antimikrobielle Kombination
2,00	ml	Gentamicin (12,5 mg/ml)

2.2.2 Versuchsaufbau

2.2.2.1 Modifizierter MLC ohne Testsubstanzen

Bei diesen zwei Versuchen wurden in Anlehnung an die klassische MLC-Immunreaktion allogene Zellen ohne Zusatz von Testsubstanz überprüft und somit eine unbehandelte Referenzgruppe hergestellt.

Zur Herstellung der erforderlichen Zellsuspension wurden die zuvor tiefgefrorenen Zellsuspensionen zweier verschiedener Individuen zum raschen Auftauen in ein Wasserbad (37 °C) gebracht und sofort nach Verflüssigung die aufgetaute Zellsuspension jedes Individuums in ein steriles Reagenzglas mit einem max. Volumen von 50 ml überführt. Vor dem Waschvorgang wurden die Zellsuspensionen mit einem Kulturmedium verdünnt, dabei wurden zu 2 ml aufgetaute Zellsuspensionen 10 ml Kulturmedium gegeben. Wurden mehrere Gefriercup des gleichen Individuums aufgetaut, wurde die Menge des Kulturmediums entsprechend der Anzahl verändert. Das verwendete Standardmedium enthält Phenolrot, welche eine Extinktion im Messbereich des Formazan bei 450 nm verursacht, sowie fetales Kälberserum (FKS), welches eine nicht definierte Laktatdehydrogenaseaktivität besitzt. Da diese Inhaltsstoffe bei der Quantifizierung stören, mussten sie nach Ablauf der Inkubationszeit der gemischten Lymphozytenkultur (MLC) und vor Quantifizierung des Standardmediums gegen ein FKS- und Phenolrot-freies Medium ausgetauscht werden. Der Zusatz von Antibiotika entspricht internationalen Empfehlungen (127: S. 507-525).

Die verdünnte Zellsuspension wird nach dem bekannten Programm zentrifugiert, der Überstand abgesaugt, das Röhrchen wieder mit 50 ml mit Medium gefüllt und die Zellen werden mittels Transferpipette vorsichtig raussuspendiert. Um das toxische DMSO zu entfernen wurde dieser Vorgang zweimal wiederholt und abschließend in Kulturmedium suspendiert.

Nach Abschluss der Waschvorgänge erfolgte die Einstellung der Zellsuspensionen d.h. für Person A und Person B getrennt, auf die für alle weiteren Schritte benötigte Zellkonzentration von 2×10^6 Zellen/ml Suspensionslösung. Um die Zellsuspension eines 2 ml Gefriercups mit einer ursprünglichen Zellkonzentration von 1×10^7 Zellen/ml auf diese Konzentration einzustellen, benötigt man ca. 6 ml Kulturmedium. Dies ist ein Erfahrungswert, der jedes Mal neu überprüft werden musste, indem anhand einer Zellzählung in einer Neubauer-Zählkammer die nach Mediumszugabe entstandene Zellkonzentration errechnet werden musste. Hierzu entnimmt man mithilfe einer Eppendorf-Pipette und einer sterilen Spitze 50 µl aus der einzustellenden Zellsuspension und mischt diese mit 50 µl Trypanblau in einem 1 ml-Cup. Anschließend wird mit dieser Mischung eine Neubauer-Zählkammer gefüllt. Die gezählte Zellzahl in 25 Kästchen der Zählkammer muss bei mindestens 60 Zellen liegen, um die erforderliche Konzentration zu erzielen. Mit dieser Methode lassen sich frische, unbeeinflusste Zellsuspensionen aus peripheren Lymphozyten der Person A und Person B gewinnen. Mit der Abkürzung Bm werden inaktivierte PBLs der Person B bezeichnet. Durch das Zytostatikum

Mitomycin C werden diese Zellen in ihrer mitogenen Aktivität gehemmt. Für diese Inaktivierung wird das Zytostatikum Mitomycin C verwendet. Hierzu wird zunächst eine frische PBL-Suspension des Individuums B auf die bekannte Konzentration eingestellt, wobei ihr Volumen dem Endbedarf an PBLs der Zellreihe Bm entsprechen soll. Die Inaktivierung erfolgt nun durch den Zusatz von Mitomycin C (MMC) in gelöster Form. Für die Herstellung der Mitomycin-Lösung werden fertige, d.h. im Handel erhältliche Substanzflacons verwendet, die 2 mg Mitomycin C in Pulverform enthalten. 2mg MMC wurden in 4,5 ml physiologischer NaCl-Lösung aufgelöst und steril filtriert. Diese Lösung wurde im Verhältnis 1:10 mit der Zellsuspension 20 Minuten in Brutschrank bei 37 °C inkubiert. Durch das oben genannte Mischungsverhältnis betrug die Konzentration von MMC 40 µg MMC/ml Zellsuspension. Anschließend wurde die nun inaktivierte Zellsuspension dreimal gewaschen und in Kulturmedium resuspendiert und auf die erforderliche Zellkonzentration von 2×10^6 Zellen/ml Suspensionslösung durch Zugabe von Kulturmedium eingestellt. Die Inkubationsplatten (96-Well-Mikrotiter-Platte mit flachem Boden) wurden gemäß dem folgendem Schema beschriftet. Das Zielvolumen einer Vertiefung der Mikrotiter-Platte beträgt 200µl:

A: 5 x 1 Well: 100µl PBLs - A + 100µl Medium

B: 5 x 1 Well: 100µl PBLs - B + 100µl Medium

Bm: 5 x 1 Well: 100µl PBLs- Bm + 100µl Medium

A+B: 5 x 1 Well: 50µl PBLs- A + 50µl PBLs - B + 100µl Medium

A+Bm: 5 x 1 Well: 50µl PBLs- A + 50µl PBLs - Bm + 100µl Medium

Insgesamt wurden zwei 96-Well-Mikrotiter-Platten beschickt. Je eine Platte diente am Tag 0 und am Tag 6 zur Bestimmung der Zellproliferation. Die Zellproliferation und Zellaktivität wurden durch quantitative Messungen der Aktivität des mitochondrialen Atmungskettenenzymes Succinat-Tetrazol-Reduktase bestimmt. Die Aktivität dieses Enzyms korreliert direkt und linear mit der Zahl metabolisch aktiver Zellen (26: S. 1-4).

Bei dieser Reaktion wird das Terazolsalz WST-1(4-[3-(4-Iodophenyl)-2-(4-nitrophenyl)-2H-5-tetrazolio]-1,3-benzol-disulfonat) durch eine ringöffnende Dehydrierung in das bei einer Wellenlänge von 450 nm absorbierende Formazan umgewandelt. Eine Zunahme der Anzahl vitaler Zellen führt zu einem Anstieg der Gesamtaktivität der mitochondrialen Dehydrogenasen in der untersuchenden Zellkultur. Dieser Anstieg der Enzymaktivität führt wiederum zu vermehrt umgesetztem Formazan. Das dunkelrote Formazan lässt sich mithilfe eines Multiwell-Spektrophotometers/ELISA-Reader) durch die Messung seiner Absorption bei entsprechender Wellenlänge gemäß dem Lambert-Beerschen Gesetz $E = \epsilon \cdot c \cdot d$ quantitativ erfassen.

Für die Ermittlung der einzelnen Absorptionswerte und somit die quantitative Darstellung des proliferativen Verhaltens der verschiedenen Zellkulturen muss am Ende der Inkubationszeit zu den jeweils 200 µl Testsubstanz/Well je 20 µl WST-1 pipettiert werden und der Ansatz im Brutschrank 2 Stunden bei 37 °C inkubiert werden. Die Extinktionswerte werden mithilfe eines ELISA-Endpoint-Reader-Messgerätes bei einer Wellenlänge von 450 nm gegen eine Referenzextinktion von 650 nm gemessen.

Anhand der gemessenen Absorptionswerte lassen sich direkte Rückschlüsse auf das Proliferations- und Wachstumsverhalten der untersuchten Zellkulturen zum jeweiligen gemessenen Zeitpunkt ziehen. Die Ergebnisse dieser Versuchsreihe sind im Kapitel 3 zusammengestellt.

2.2.2.2 Modifizierte MLC mit Testsubstanzzusatz

Die Methode der gemischten Leukozytenreaktion wurde bis auf geringe Modifikationen wie in Punkt 1.3 beschrieben durchgeführt. Allerdings wurde der Einfluss verschiedener Zytostatika (Cyclophosphamid, 6-Mercaptopurin und Methotrexat) in unterschiedlichen Konzentrationen (1×10^{-5} , 1×10^{-7} , 1×10^{-9} und 1×10^{-11} mol/l) auf PBLs von Person A (As1, As2, As3, As4) untersucht.

Der Ansatz der neuen Zellreihe erfolgte zunächst durch die bekannte Aufbereitung von tiefgefrorenen peripheren Lymphozyten der Person A mit einer Konzentration von 2×10^6 Zellen/ml Suspensionslösung. Im Unterschied zu Zellreihe A sind jedoch die unter Einfluss der Testsubstanzen stehenden PBLs derselben Person nicht ausschließlich in Nährmedium gelöst, so wird nach erneutem Zentrifugieren das danach entstandene Zellsediment im Verhältnis 1:1 mit Nährmedium und einer Lösung mit der doppelten Substanzkonzentration der jeweiligen Testsubstanz auf das bekannte Endvolumen aufgefüllt. Dieser Vorgang erfolgt unter sterilen Bedingungen unter Verwendung von Lösungsfiltern. Durch die 1:1-Verdünnung mit Kulturmedium erhalten die so entstandenen Zellkulturen As1, As2, As3 und As4 die endgültige Substanzkonzentration.

Auch bei diesem Versuch wurden das Proliferations- und das Wachstumsverhalten anhand von Absorptionmessungen angesetzten Zellkulturen untersucht. Die Messung der Absorption erfolgte wie bereits beschrieben.

3 Ergebnisse

Im Verlauf dieses Kapitels werden die Messergebnisse der einzelnen Versuchsreihen vorgestellt.

In dem Experiment wurde die PBL-Aktivität von zwei Individuen in einem modifizierten Mixed Lymphocyte Culture Test (MLC) untersucht. Die Aktivität der Zellen wurde anhand der enzymatischen Umsetzung von WST-1 zu Formazan gemessen.

Zunächst wurde der Einfluss von Mitomycin C auf die Zellaktivität am Tag 0 und am Tag 6 gemessen. In weiteren Experimenten wurde die Wirkung von den Zytostatika Cyclophosphamid, 6-Mercaptopurin und Methotrexat auf die PBL untersucht. Dabei wurden verschiedene Konzentrationen der Zytostatika am Tag 0 und 6 untersucht.

Bei den in Form von Graphiken dargestellten Messwerten handelt es sich um fünf unabhängige Experimente, von denen der Mittelwert abgebildet ist.

Es besteht eine direkte Korrelation zwischen dem gemessenen Absorptionswert und der metabolischen Aktivität, die anhand der Enzymaktivität lebensfähiger Zellen durch den Umsatz von hellrotem WST-1 zum dunkelroten Formazan messbar gemacht wurde.

3.1 Ergebnisse der Zellreihen ohne Testsubstanz

3.1.1 MLC-Versuch 1.1 ohne Testsubstanz

3.1.1.1 Ergebnisse am Tag 0

Die Graphik des MLC-Versuchs am Tag 0 ergibt Folgendes:

Die Ausgangsaktivität der Person A ist im Vergleich zu Person B in nicht inaktiviertem Zustand um 7,2 % erhöht.

Die Ausgangsaktivitäten der PBLs von Person A sind im Vergleich zu Person B um 7,2 % erhöht. Nach Behandlung der PBLs mit Mitomycin C ist die Ausgangsaktivität von Person A um 7,3 % erhöht verglichen mit Person B. Also sind die nicht inaktivierten PBLs von Person B um 0,1 % aktiver als die PBLs in inaktiviertem Zustand.

Die Exposition der PBL-A mit PBL-B in unbehandeltem bzw. inaktiviertem Zustand (Bm), führt im Vergleich zu den homogenen Zellkulturen A, B und Bm zu einer Erhöhung der Aktivitäten.

Die PBL-Aktivität der A+B ist um 15,8 % erhöht gegenüber A und um 24,2 % gegenüber B in nicht inaktiviertem Zustand.

Die Aktivität von A+Bm zeigt eine Steigerung um 24,2 % gegenüber A und um 33,2 % gegenüber B. Die Aktivität von A+B ist um mehr als 7 % gegenüber A+Bm erhöht.

3.1.1.2 Ergebnisse am Tag 6

Nach sechs Tagen Inkubation ergibt der Vergleich der homogenen Zellsuspensionen eine Mehraktivität der PBLs der Person A gegenüber Person B um 44 % bzw. Bm um 234,4 %. Die Aktivität der Zellsuspension B ist im Vergleich zu inaktiven Bx um 132,1 % erhöht.

Die PBL-Aktivitäten der heterogenen Zellkulturen sind im Vergleich zur Aktivität der Person A allein erniedrigt und zwar bei A+B um 3 % und bei A+Bm um 9 %.

Im Gegensatz dazu ist die Aktivität der A+B und A+Bm deutlich höher als B und Bm. Bei B beträgt die Mehraktivität von A+B 39,7 % und von A+Bm 31,1 %.

Besondere Aufmerksamkeit verdient jedoch die deutliche Mehraktivität um 224,4 % von A+B und um 204,4 % von A+Bm gegenüber inaktivierten peripheren Lymphozyten der Person B bei identischen Zellzahlen.

Im direkten Vergleich kann A+B eine um 6,5 % stärkere Aktivität als A+Bm verzeichnen.

3.1.1.3 Zusammenfassung der Ergebnisse von Tag 0 und Tag 6

Die Betrachtung der Messergebnisse der Zellreihen A, B, Bm, A+B und A+Bm am Tag 0 und nach sechs Tagen Inkubation zeigt folgende Entwicklung:

Mit Ausnahme von Bm kommt es nach sechs Tagen Inkubation bei allen genannten Zellkulturen zu einer Aktivitätszunahme.

Im Vergleich zum Ausgangswert zeigen A 41,1 %, B 4,9 %, A+B 18 % und A+Bm 3,2 % mehr Aktivität, wohingegen bei Bm eine Aktivitätsabnahme von 54,7 % zu beobachten ist.

Tab. 2: Mittelwerte von homogenen und heterogenen Zellreihen am Tag 0 und am Tag 6. Dargestellt sind die Mittelwerte aus fünf unabhängigen Experimenten.

	A	B	Bm	A+B	A+Bm
Tag 0	0,951	0,887	0,886	1,102	1,182
Tag 6	1,342	0,931	0,401	1,301	1,221

A: periphere Lymphozyten (PBLs) der Testperson A

B: periphere Lymphozyten der Testperson B

Bm: mit Mitomycin C inaktivierte periphere Lymphozyten der Person B

A+B: periphere Lymphozyten der Person A und B im Verhältnis 1:1
(Gesamtlymphozytenzahl wie bei A, B und Bm)

A+Bm: PBLs der Person A und mit MMC inaktivierte PBLs der Person B im Verhältnis 1:1 (Gesamtzellzahl wie bei A, B, Bm und A+B)

MLC-Versuch 1.1 ohne Testsubstanz am Tag 0

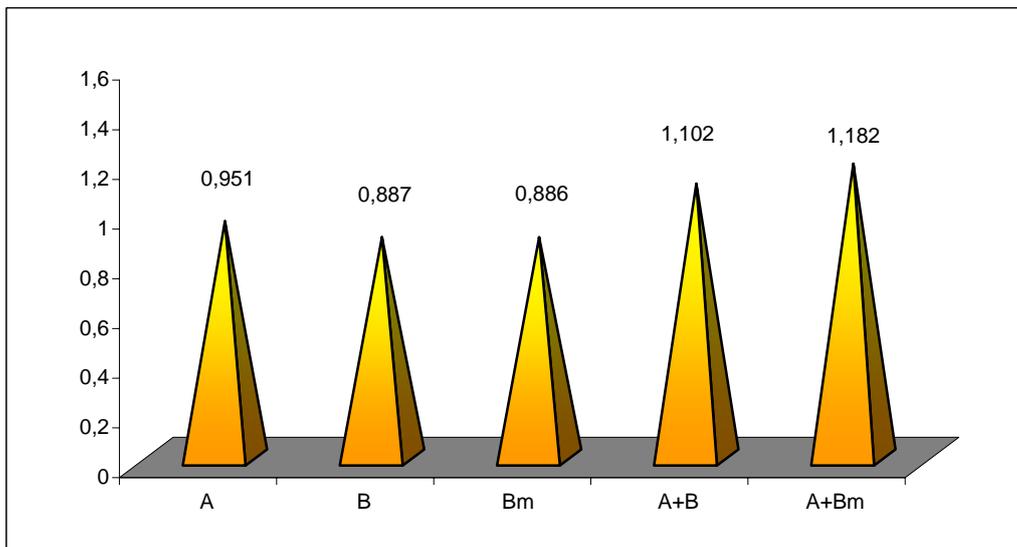


Abb. 1: Vergleich der PBL-Aktivitäten der Individuen A und B und B inaktiviert mit Mitomycin C als Bm in einfachen und gemischten Zellkulturen am Tag 0.

MLC-Versuch 1.1 ohne Testsubstanz am Tag 6

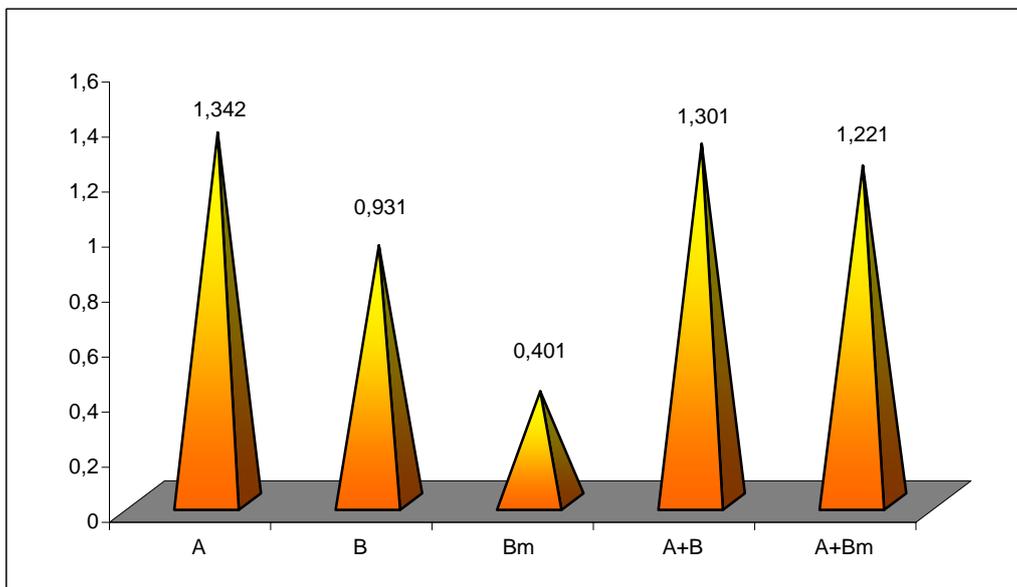


Abb. 2: Graphische Darstellung der PBL-Aktivitäten zweier Individuen A und B sowie B auch inaktiviert mit Mitomycin C (Bm) allein und in Kombination nach sechs Tagen Inkubation.

3.1.2 MLC-Versuch 1.2 ohne Testsubstanz

3.1.2.1 Ergebnisse am Tag 0

Die Ausgangsaktivitäten der PBLs der Person A sind im Vergleich zur Person B im unbehandelten Zustand um 14,8 % bzw. nach Inaktivierung mit Mitomycin C um 13,7 % vermindert.

Die Aktivität der Person B ist am Tag 0 um 1,3 % höher als die in ihrer mitogenen Aktivität gehemmte Zellsuspension.

Die gemischten Zellkulturen A+B und A+Bm zeigen im Vergleich zu den homogenen Zellsuspensionen A, B und Bm eine Erhöhung ihrer Aktivität bei gleicher Gesamtzellzahl.

Die PBL-Aktivität der Zellkulturen A+B ist im Vergleich zu A um 19,7 %, im Vergleich zu B um 2 % und im Vergleich zu Bm um 3,3 % erhöht. Dasselbe Verhältnis ergibt sich für A+Bm: Die Aktivität zeigt trotz Inaktivierung von B eine Steigerung gegenüber A von 18,1 %, gegenüber B von 0,69 % und gegenüber Bm von 1,9 %.

Der direkte Vergleich von A+B und A+Bm zeigt eine geringfügig verminderte Aktivität der A+Bm um 1,3 %

3.1.2.2 Ergebnisse am Tag 6

Am Tag 6 ist die Ausgangsaktivität der peripheren Lymphozyten von Person B um 8,3 % höher als von Person A.

Gegenüber Bm zeigt A eine um 138,5 % höhere Aktivität.

Auch die Aktivität frischer PBMCs im Vergleich zu in ihrer mitogenen Aktivität gehemmten PBMCs von Person B ist um 160 % deutlich erhöht.

Die primären MLC-Ansätze A+B und A+Bm weisen wie am Tag 0 eine parallele Verhaltensweise auf. Dabei ist festzustellen, dass die PBL-Aktivitäten der heterogenen Zellkulturen im Vergleich zur Aktivität der Person A allein um 7 % bei A+B und 4,6 % bei A+Bm erniedrigt sind. Es handelt sich also in beiden Fällen um eine Suppression.

Auch der Vergleich der PBL-Aktivität von Person B mit den heterogenen Zellkulturen A+B und A+Bm zeigt verminderte Aktivität: 14,7 % bei A+B und 12,6 % bei A+Bm.

Das Gegenteil ist jedoch bei einem Vergleich der Aktivitäten von A+B und A+Bm zu Bm zu verzeichnen. Gegenüber Bm liegt eine gesteigerte PBL-Aktivität von A+B um 121,8 % sowie bei A+Bm um 127,4 % vor. Der direkte Vergleich von A+B und A+Bm zeigt eine geringfügig verminderte Aktivität der unvorbehandelten Zellen A+B um 2,4 %.

3.1.2.3 Zusammenfassung der Ergebnisse von Tag 0 und Tag 6

Der bereits unter 3.1.1.3 beschriebene Aktivitätsverlauf lässt sich auch hier für die PBLs bei den Zellreihen A, B, A+B und A+Bm erkennen.

Es kommt zu einer Zunahme der Gesamtzellaktivität aller genannten Zellkulturen, für A um 74,7 %, für B um 62,4 %, für A+B um 35,7 % sowie für A+Bm um 41 %. Diese Entwicklung trifft jedoch für Bm nicht zu. Hier kommt es zu einer Abnahme der PBL-Aktivität um 36,8 %.

Tab. 3: Vergleich der PBL-Aktivitäten der Individuen A und B (ohne Zusatz sowie inaktiviert mit MMC (Bm)) in einfachen und gemischten Zellkulturen.
Dargestellt sind Mittelwerte aus fünf individuellen Proben.

	A	B	Bm	A+B	A+Bm
Tag 0	0,751	0,881	0,87	0,899	0,887
Tag 6	1,312	1,431	0,55	1,22	1,251

A: periphere Lymphozyten (PBLs) der Testperson A

B: periphere Lymphozyten der Testperson B

Bm: mit Mitomycin C inaktivierte periphere Lymphozyten der Person B

A+B: periphere Lymphozyten der Person A und B im Verhältnis 1:1
(Gesamtzahl wie bei A, B und Bm)

A+Bm: PBLs der Person A und mit MMC inaktivierte PBLs der Person B im Verhältnis 1:1 (Gesamtzellzahl wie bei A, B, Bm und A+B)

MLC-Versuch 1.2 ohne Testsubstanz am Tag 0

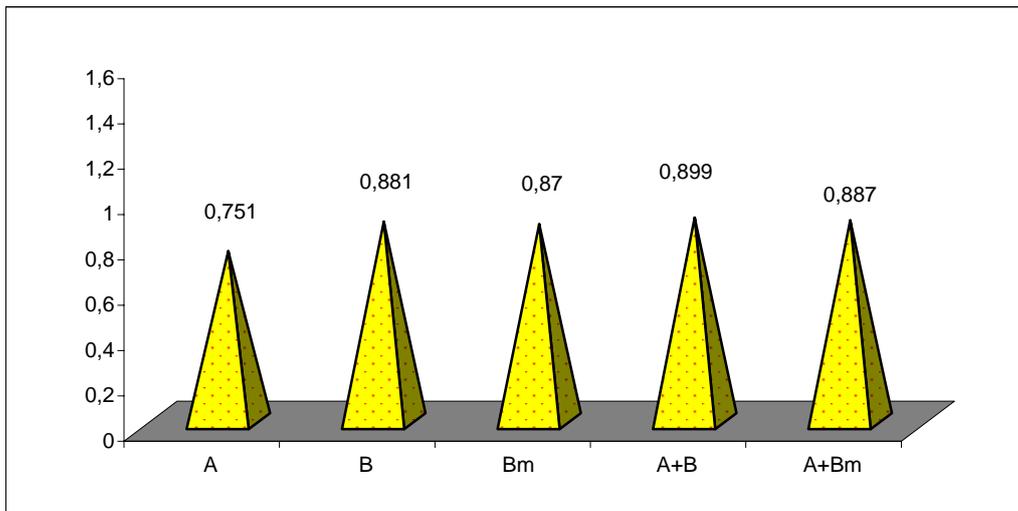


Abb. 3: Dargestellt ist ein Vergleich der PBL-Aktivitäten der Individuen A und B und zusätzlich B inaktiviert mit Mitomycin C (Bm) in einfachen und gemischten Zellkulturen am Tag 0

MLC-Versuch 1.2 ohne Testsubstanz am Tag 6

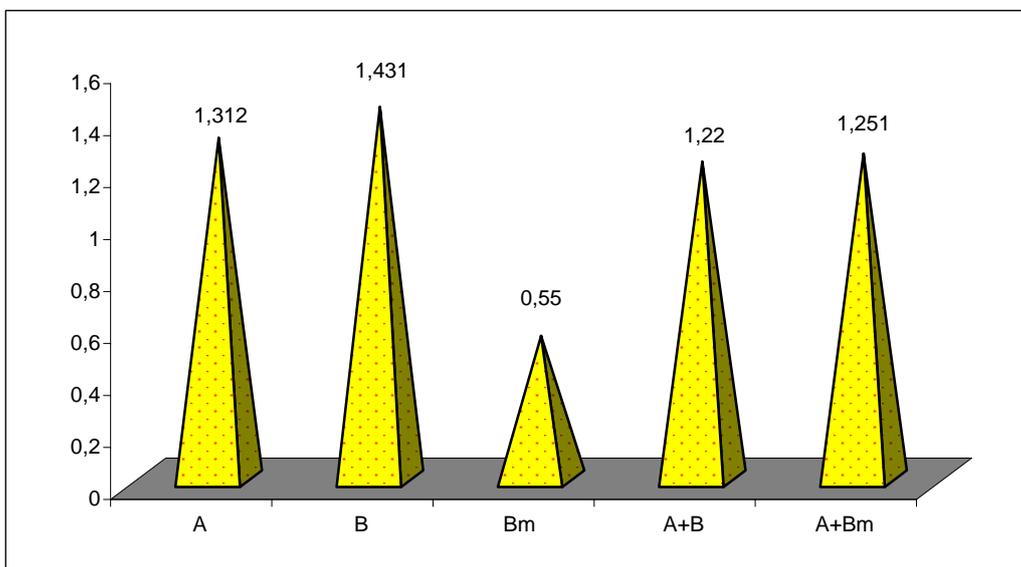


Abb. 4: Graphische Darstellung der PBL-Aktivitäten zweier Individuen A und B sowie B auch inaktiviert mit Mitomycin C (Bm) als Monokulturen und gemischten Kulturen nach sechs Tagen Inkubation.

3.2 Ergebnisse des modifizierten Mixed Lymphocyte Culture Tests mit Zytostatika in verschiedenen Konzentrationen

In folgenden Experimenten wurde der Einfluss von verschiedenen Zytostatika auf die Aktivität der PBLs mittels einer modifizierter Form des Mixed Lymphocyte Culture Tests untersucht. Dabei wurden die unter 3.1 erklärten Ergebnisse zu Grunde gelegt. Die Zytostatika Cyclophosphamid, 6-Mercaptopurin und Methotrexat wurden in den Konzentrationen 1×10^{-5} , 1×10^{-7} , 1×10^{-9} und 1×10^{-11} mol/l eingesetzt.

3.2.1 MLC-Versuch 2.1 mit Cyclophosphamid in verschiedenen Konzentrationen am Tag 0 und 6

3.2.1.1 MLC-Versuch mit Cyclophosphamid (Konzentration 1×10^{-5} mol/l)

3.2.1.1.1 Ergebnisse am Tag 0

Zu Beginn dieses Versuches führt die Behandlung der PBLs von Person A mit Cyclophosphamid in einer Konzentration von 1×10^{-5} mol/l (As1) zu einer Abnahme der Zellaktivität um 4,5 % verglichen mit unbehandelten PBLs derselben Person.

Die MLC-Ansätze As1+B und As1+Bm lassen beide im Vergleich zu As1 eine Suppression von 3,3 % bzw. 10,9 % erkennen.

Die Suppression von A+B im Vergleich zu B beträgt 0,68 % und von As1+Bm im Vergleich mit Bm 7,4 %.

Der direkte Vergleich von As1+B und As1+Bm mit A+B und A+Bm zeigt, dass Cyclophosphamid in einer Konzentration von 1×10^{-5} mol/l sowohl bei As1+B als auch bei As1+Bm, verglichen mit ihren nicht unter Cyclophosphamideinfluss stehenden Äquivalente, zu einer Suppression ihrer Aktivitäten führt. Für As1+B gegenüber A+B liegt diese Aktivitätsabnahme bei 20 % und für As1+Bm gegenüber A+Bm liegt sie bei 30,6 %.

Die Inaktivierung der PBMCs der Person B führt bei As1+Bm verglichen mit As1+B zu einem Aktivitätsrückgang um 6,9 %.

3.2.1.1.2 Ergebnisse am Tag 6

Unter Einfluss von Cyclophosphamid in einer Konzentration von 1×10^{-5} mol/l kommt es bei peripheren Lymphozyten der Person A nach sechs Tagen Inkubation zu einer deutlichen Suppression von 53,6 %.

As1+B zeigt eine Mehraktivität von 28,8 % im Vergleich zu As1, jedoch eine Suppression von 40,3 % und 13,9 % im Vergleich zu A bzw. B.

Bei As1+Bm verhält es sich ähnlich: Es kommt zu einer Mehraktivität von 27,2 % im Vergleich zu As1 und zu einer Suppression von 41,1 % gegenüber A und 15 % gegenüber peripheren Lymphozyten der Person B.

Verglichen mit der stark reduzierten PBL-Aktivität von Bm besteht jedoch ein Aktivitätsüberschuss von 99,7 % bei As1+B und 97,2 % bei As1+Bm.

Der Aktivitätsrückgang von As1+Bm im Vergleich zu As1+B beträgt am Tag 6 nur noch 1,2 %.

As1+B zeigt am Tag 6 eine geringere Aktivität von 38,4 % im direkten Vergleich zu seinem nicht unter Cyclophosphamideinfluss stehenden Pendant A+B. Dies gilt ebenso für As+Bm und A+Bm.

Bei beiden Gegenüberstellungen betragen die Differenzen ihrer PBL-Aktivitäten mehr als 35 %.

As1+Bm weist, verglichen mit As1+B, eine verminderte Aktivität von 1,2 % auf.

Tab. 4: Vergleich der PBL-Aktivitäten von Person A und B nach Behandlung mit 1×10^{-5} mol/l Cyclophosphamid (As1) am Tag 0 und Tag 6. Dabei dienten die Aktivitäten von nicht mit Cyclophosphamid behandelten PBLs als Referenzwert. Dargestellt sind Mittelwerte aus fünf individuellen Proben.

	A	As1	B	Bm	A+B	As1+B	A+Bm	As1+Bm
Tag 0	0,951	0,91	0,887	0,886	1,102	0,881	1,182	0,82
Tag 6	1,342	0,931	0,931	0,401	1,221	0,622	0,801	0,791

A: periphere Lymphozyten (PBLs) der Testperson A

As1: periphere Lymphozyten der Person A inkubiert mit 1×10^{-5} mol/l Cyclophosphamid

B: periphere Lymphozyten der Testperson B

Bm: mit Mitomycin C inaktivierte periphere Lymphozyten der Person B

A+B: periphere Lymphozyten der Person A und B im Verhältnis 1:1 (Gesamtzellzahl wie bei A, B und Bm)

A+Bm: PBLs der Person A und mit MMC inaktivierte PBLs der Person B im Verhältnis 1:1 (Gesamtzellzahl wie bei A; B, Bm und A+B)

As1+B: mit 1×10^{-5} mol/l Cyclophosphamid inkubierte PBLs der Person A mit PBLs der Person B im Verhältnis 1:1 (Gesamtzellzahl wie bei A, B, Bm, As1, A+B und A+Bm)

As1+Bm: mit 1×10^{-5} mol/l Cyclophosphamid inkubierte PBLs der Person A mit inaktivierten PBLs der Person B im Verhältnis 1:1 (Gesamtzellzahl wie o.g. Zellreihen)

MLC-Versuch 2.1 mit Cyclophosphamid

MLC mit 1×10^{-5} mol/l Cyclophosphamid am Tag 0

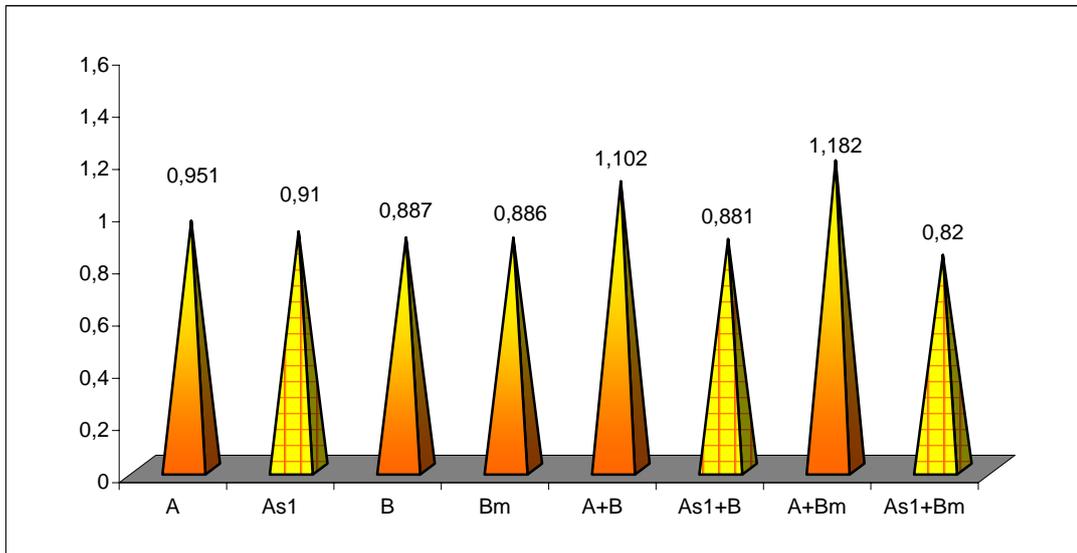


Abb. 5: Auswirkung von Cyclophosphamid auf die PBMC-Aktivität des Individuums A in homologen- und gemischten Zellkulturen verglichen mit PBL-Aktivitäten von A und B ohne Cyclophosphamideinfluss am Tag 0

MLC mit 1×10^{-5} mol/l Cyclophosphamid am Tag 6

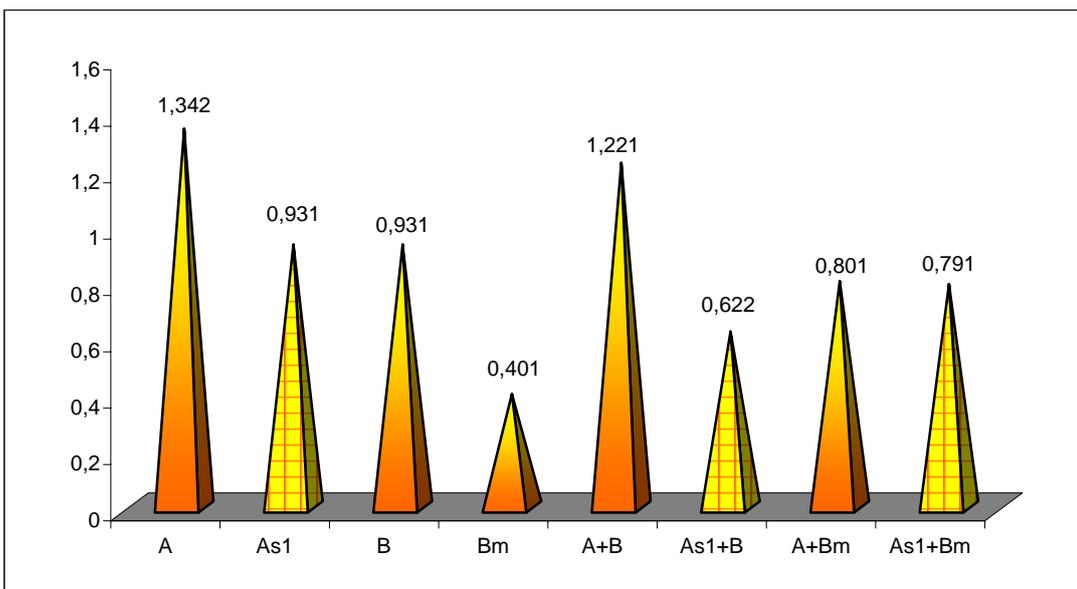


Abb. 6: Grafisch dargestellte Mittelwerte von jeweils 5 individuellen Proben von Lymphozyten der Person A und B vorliegend in Einzel- und gemischten Zellkulturen mit und ohne Cyclophosphamid

3.2.1.2 MLC-Versuch mit Cyclophosphamid (Konzentration 1×10^{-7} mol/l)

3.2.1.2.1 Ergebnisse am Tag 0

Die Behandlung der PBLs von Person A mit 1×10^{-7} mol/l Cyclophosphamid (As2) führt zu einer Suppression der Zellaktivität um 2,1 % gegenüber den unbehandelten PBLs derselben Person.

Beim Vergleich der As2+B und As2+Bm mit den homogenen Zellreihen ist eine Mehraktivität der gemischten Zellreihen zu beobachten. Die PBL-Aktivität von As2+B ist im Vergleich zu A um 15,8 %, im Vergleich zu As2 um 18,3 %, im Vergleich zu B um 24,1 % und im Vergleich zu Bm um 24,3 % erhöht.

Bei As2+Bm beträgt diese Mehraktivität etwas weniger, und zwar im Vergleich zu A 4,2 %, zu As2 6,4 %, zu B 11,7 % und zu Bm 11,8 %.

Für A+B macht das Beisein im Vergleich zur Abwesenheit von Cyclophosphamid keinen Unterschied. Bei As2+Bm macht sich die Anwesenheit von Cyclophosphamid in Form einer Suppression um 16,2 % bemerkbar.

Im direkten Vergleich mit As2+B zeigt As2+Bm eine um 9,9 % verminderte Aktivität.

3.2.1.2.2 Ergebnisse am Tag 6

Am Tag 6 ist die Aktivitätsabnahme der Zellkulturen unter Cyclophosphamideinfluss sowohl in homogener Form als auch in gemischter Form auffälliger.

Die Aktivitätssenkung der PBL-Aktivität von Person A unter Cyclophosphamideinfluss beträgt 47,8 % gegenüber der PBL-Aktivität von Person A ohne Cyclophosphamideinfluss.

Die erhöhte Aktivität der heterogenen Zellkulturen As2+B und As2+Bm haben sich gegenüber den homogenen Zellreihen As2 und Bm bestätigt.

Verglichen mit As2 ist As2+B um 42,9 % und As2+Bm um 22,1 % aktiver.

Der erhöhte Aktivität von As2+B im Vergleich zu Bm beträgt 149,1 % und von As2+Bm im Vergleich zu Bm 112,9 %. As2+B zeigt nach sechs Tagen Inkubation mit 1×10^{-7} mol/l Cyclophosphamid eine Mehraktivität von nur 7,3 % verglichen mit B und einen Aktivitätsrückgang von 25,4 % verglichen mit A. Am Tag 6 konnte bei As2+Bm eine verminderte Aktivität gegenüber A und B beobachtet werden.

As2+Bm weist eine Suppression von 33,7 % im Vergleich zu A und 4,5 % im Vergleich zu B auf.

Deutlich ist auch die Aktivitätsabnahme von As2+B um 23,2 % gegenüber A+B und um 30,1 % von As2+Bm gegenüber A+Bm.

Die inaktivierte Zellreihe As2+Bm zeigt gegenüber As2+B eine Aktivitätssuppression von 14,5 %.

Tab. 5: Vergleich der Aktivitäten der peripheren Lymphozyten von A und B unter Einfluss von Cyclophosphamid in einer Konzentration von 1×10^{-7} mol/l mit Referenzwerten ohne Cyclophosphamid am Tag 0 und Tag 6.
Dargestellt sind die Mittelwerte aus fünf individuellen Proben.

	A	As2	B	Bm	A+B	As2+B	A+Bm	As2+B
Tag 0	0,951	0,931	0,887	0,886	1,102	1,101	1,182	0,991
Tag 6	1,34	0,699	0,931	0,401	1,301	0,999	1,221	0,854

- A:** periphere Lymphozyten (PBLs) der Testperson A
As2: periphere Lymphozyten der Person A inkubiert mit 1×10^{-7} mol/l Cyclophosphamid
B: periphere Lymphozyten der Testperson B
Bm: mit Mitomycin C inaktivierte periphere Lymphozyten der Person B
A+B: periphere Lymphozyten der Person A und B im Verhältnis 1:1 (Gesamtzellzahl wie bei A, B und Bm)
A+Bm: PBLs der Person A und mit MMC inaktivierte PBLs der Person B im Verhältnis 1:1 (Gesamtzellzahl wie bei A; B, Bm und A+B)
As2+B: mit 1×10^{-7} mol/l Cyclophosphamid inkubierte PBLs der Person A mit PBLs der Person B im Verhältnis 1:1 (Gesamtzellzahl wie bei A, B, Bm, As2, A+B und A+Bm)
As2+Bm: mit 1×10^{-7} mol/l Cyclophosphamid inkubierte PBLs der Person A mit inaktivierten PBLs der Person B im Verhältnis 1:1 (Gesamtzellzahl wie bei Zellreihen A, As2, B, Bm, A+B, A+Bm und As2+Bm)

MLC mit 1×10^{-7} mol/l Cyclophosphamid am Tag 0

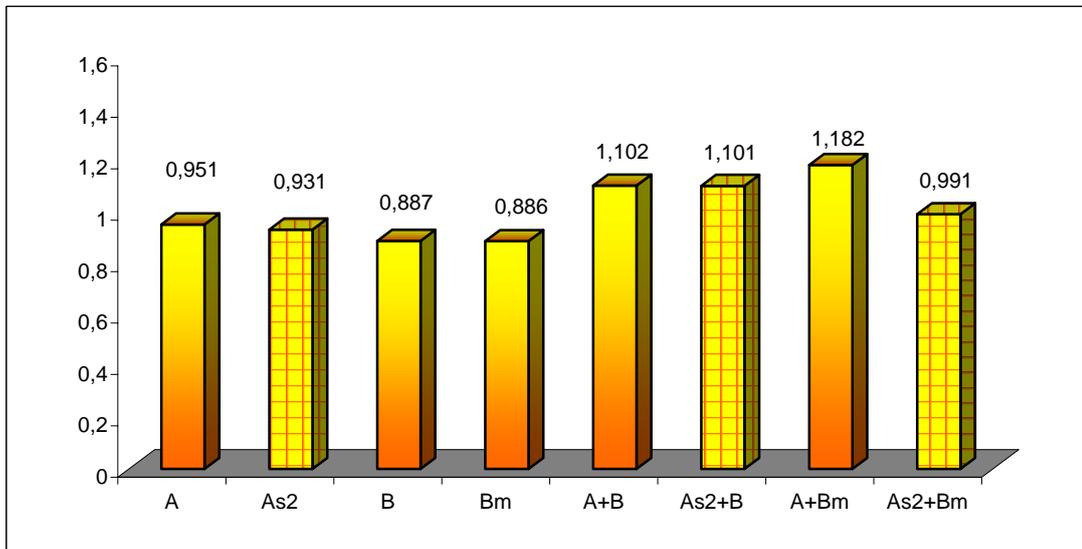


Abb. 7: Auswirkung von 1×10^{-7} mol/l Cyclophosphamid auf die Aktivitäten der PBLs von Person A in homo- und heterogenen Zellkulturen am Tag 0 bezogen auf Referenzwerte ohne Cyclophosphamid

MLC mit 1×10^{-7} mol/l Cyclophosphamid am Tag 6

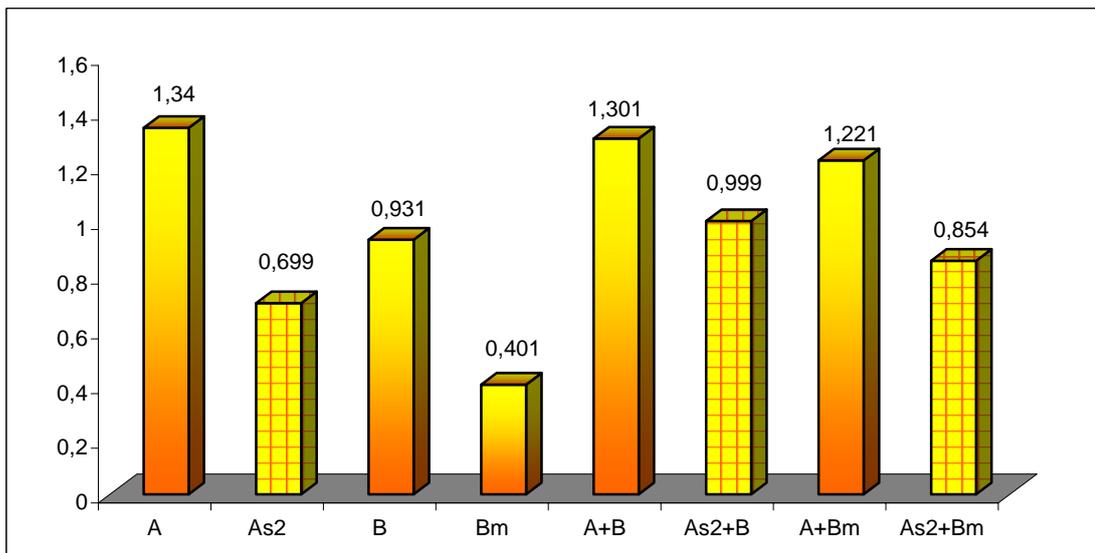


Abb. 8: Einfluss von 1×10^{-7} mol/l Cyclophosphamid auf die Aktivitäten der PBLs von Person A und B am Tag 0 bezogen auf Referenzwerte ohne Cyclophosphamid

3.2.1.3 MLC-Versuch mit Cyclophosphamid (Konzentration 1×10^{-9} mol/l)

3.2.1.3.1 Ergebnisse am Tag 0

Auch bei der Behandlung der PBLs mit 1×10^{-9} mol/l Cyclophosphamid ist ein Aktivitätsverlust zu beobachten.

PBLs der Person A zeigen in Anwesenheit von 1×10^{-9} mol/l Cyclophosphamid (As3) einen Aktivitätsverlust von 14,6 %.

Beim Vergleich der gemischten Zellreihen As3+B und As3+Bm mit den homogenen Zellkulturen ist Folgendes zu beobachten:

As3+B ist um 15,9 % aktiver als A, um 35,7 % aktiver als As3, um 24,2 % aktiver als B und um 24,3 % aktiver als Bm.

Die Mehraktivität von As3+Bm beträgt gegenüber A 3,9 %, gegenüber As3 21,9 %, gegenüber B 11,5 % und gegenüber Bm 11,6 %.

Die Cyclophosphamidzugabe führt am Tag 0 bei A+B zu keinem Aktivitätsunterschied, bei A+Bm führt sie zu einer Suppression von 16,3 %.

Die Inaktivierung von B mit Mitomycin C in As3+Bm führt zu einem Aktivitätsverlust von 10,3 % im Vergleich zu nicht inaktiviertem B in As3+B.

3.2.1.3.2 Ergebnisse am Tag 6

Wie zu Beginn dieses Versuches am Tag 0 ist auch am Tag 6 eine Suppression bei As3 im Vergleich zu A um 24,9 % zu beobachten.

Die Mehraktivitäten von As3+B und As3+Bm bleiben gegenüber As3 und Bm bestehen. As3+B zeigt eine erhöhte Aktivität im Vergleich zu As3 um 5,6 % und verglichen mit Bm um 124,2%.

As3+Bm weist eine Mehraktivität von 5,9 % und 124,7 % im Vergleich zu As3 und Bm auf.

Die erhöhten Aktivitäten von As3+B und As3+Bm werden gegenüber A und B nach sechs Tagen Inkubation in Aktivitätsverlusten von jeweils 20,7 % und 3,4% bei As3+B und 20,5% bzw. 3,2 % bei As3+Bm umgewandelt.

Der Aktivitätsgleichstand von As3+B mit A+B verwandelt sich nach sechs Tagen Inkubation in ein Aktivitätsdefizit von 30,9 % für As3+B.

Das Aktivitätsniveau von As3+Bm im Vergleich zu A+Bm sinkt nach Inkubation mit 1×10^{-9} mol/l Cyclophosphamid um 26,2 %.

Die Suppression durch Cyclophosphamid ist bei As3+B genauso wie bei As3+Bm.

Tab. 6: Mittelwerte aus fünf individuellen Proben peripheren Lymphozyten der Person A und B einzeln und in Kombination nach Behandlung mit 1×10^{-9} mol/l Cyclophosphamid am Tag 0 und Tag 6

	A	As3	B	Bm	A+B	As3+B	A+Bm	As3+Bm
Tag 0	0,951	0,812	0,887	0,886	1,102	1,102	1,182	0,989
Tag 6	1,342	0,851	0,931	0,401	1,301	0,899	1,221	0,901

- A:** periphere Lymphozyten (PBLs) der Testperson A
As3: periphere Lymphozyten der Person A inkubiert mit 1×10^{-9} mol/l Cyclophosphamid
B: periphere Lymphozyten der Testperson B
Bm: mit Mitomycin C inaktivierte periphere Lymphozyten der Person B
A+B: periphere Lymphozyten der Person A und B im Verhältnis 1:1 (Gesamtzellzahl wie bei A, B und Bm)
A+Bm: PBLs der Person A und mit MMC inaktivierte PBLs der Person B im Verhältnis 1:1 (Gesamtzellzahl wie bei A, B, Bm und A+B)
As3+B: mit 1×10^{-9} mol/l Cyclophosphamid inkubierte PBLs der Person A mit PBLs der Person B im Verhältnis 1:1 (Gesamtzellzahl wie bei A, B, Bm, As1, A+B und A+Bm)
As3+Bm: mit 1×10^{-9} mol/l Cyclophosphamid inkubierte PBLs der Person A mit inaktivierten PBLs der Person B im Verhältnis 1:1 (Gesamtzellzahl wie bei Zellreihen A, As3, B, Bm, A+B, A+Bm und As3+Bm)

MLC mit 1×10^{-9} mol/l Cyclophosphamid am Tag 0

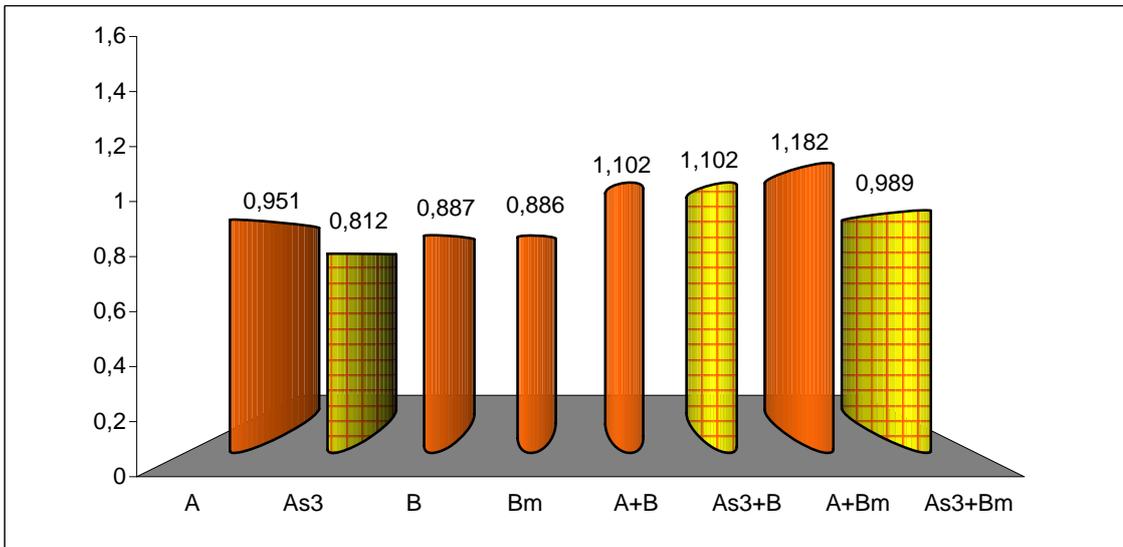


Abb. 9: Aktivitäten der peripheren Lymphozyten von Person A und B (B z.T. in der inaktivierten Form Bm) einzeln und in Kombination mit 1×10^{-9} mol/l am Tag 0 bezogen auf Referenzwerte ohne Cyclophosphamid

MLC mit 1×10^{-9} mol/l Cyclophosphamid am Tag 6

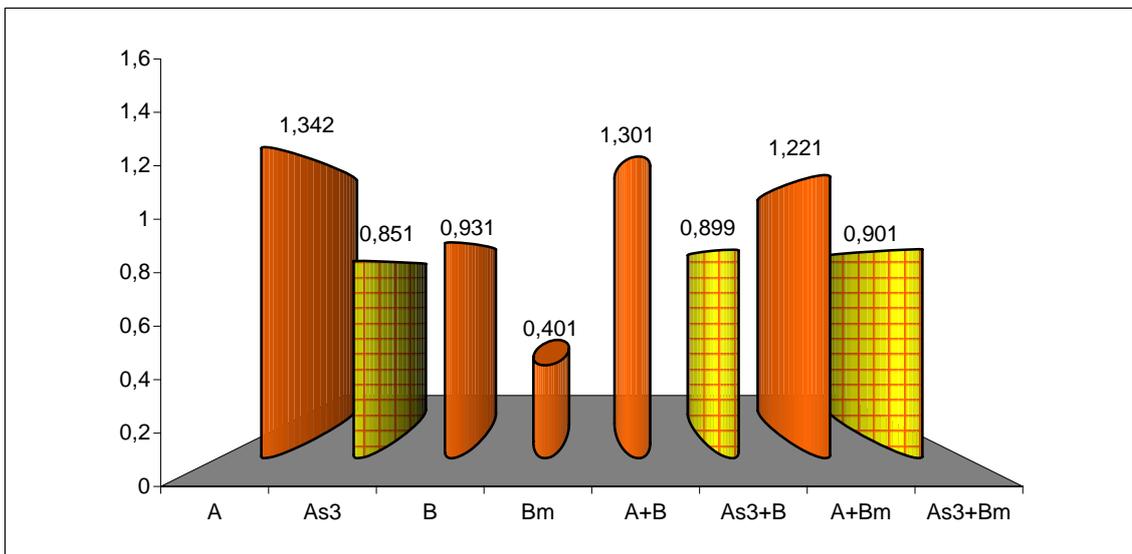


Abb. 10: Beeinflussung der PBL-Aktivitäten von Person A und Person B (allein und in Kombination) durch Zusatz von Cyclophosphamid in einer Konzentration von 1×10^{-9} mol/l.

3.2.1.4 MLC-Versuch mit Cyclophosphamid (Konzentration 1×10^{-11} mol/l)

3.2.1.4.1 Ergebnisse am Tag 0

Mit 1×10^{-11} mol/l Cyclophosphamid behandelte PBLs der Person A (As4) zeigen eine Suppression von 1,9 % gegenüber naiven PBLs der Person A.

Setzt man die Aktivität heterogener Zellkulturen zu homogenen Zellkulturen in Relation, fällt auf, dass die heterogenen Zellreihen einheitlich auch unter Substanzeeinfluss aktiver als die homogenen Zellreihen sind.

As4+B ist gegenüber A, As4, B und Bm um 15,8 %, 18,1 %, 24,1 % bzw. 24,3 % aktiver. Die Mehraktivität von As4+Bm beträgt in Relation zu B und Bm jeweils 3,7 % und 3,8 %. Im Gegensatz dazu zeigt As4+Bm eine um 3,2 % geringere Aktivität als A und um 1,3 % als As4.

Die suppressive Wirkung von Cyclophosphamid auf A+Bm beträgt 22,2 %.

Bei A+B gibt es keine Mehraktivität im Vergleich zu As4+B.

Die Inaktivierung der peripheren Lymphozyten von Person Bm scheint bei As4+Bm verglichen mit As4+B der Grund für einen Aktivitätsrückgang um 7,4 % zu sein.

3.2.1.4.2 Ergebnisse am Tag 6

Die Aktivitätssuppression von As4 steigt im Vergleich zu A ohne Cyclophosphamideinfluss am Tag 6 auf 18,1 %.

Während As4+B zu Beginn aktiver ist als die homogenen Zellreihen A, As4, B und Bm, wandelt sich die Aktivität nach sechs Tagen Inkubation in Bezug auf A in eine Suppression um und beträgt am Tag 6 5,6 %, 5,4 % und 144,6 %. Auch As4+Bm zeigt verglichen mit Bm eine Mehraktivität von 129,9 %, verglichen mit A, As4 und B aber eine Suppression um 18,7 %, 0,8 % und 0,9 %.

As4+B zeigt eine Aktivitätsabnahme von 13,5 %. Die Mehraktivität von As4+B gegenüber As4, B und Bm besteht bezogen auf A+B um 29,1%. Die Aktivitätsabnahme von As4+Bm beträgt im Vergleich zu A+Bm etwa 24,5 %.

Der Aktivitätsrückgang von As4+Bm erhöht sich verglichen mit As4+B auf 6,1 %.

3.2.1.4.3 Zusammenfassung der Ergebnisse von Tag 0 und Tag 6

Cyclophosphamid hat in den verschiedenen Konzentrationen sowohl auf die homogenen wie auch die gemischten Zellkulturen eine suppressive Wirkung. Dieser Effekt wird nach sechs Tagen Inkubation noch deutlicher.

Der Aktivitätsrückgang ist bei As4 um 10,5 % niedriger als bei As3, 12,2 % niedriger als bei As2 und 17,4 % niedriger als bei As1.

Das Aktivitätsdefizit bei As4+B ist um 3,7 %, 3,8 % und 18,2 % schwächer als bei A3+B, As2+B und As1+B.

Im Vergleich zu As3+Bm, As2+Bm und As1+Bm ist die Suppression von As4+Bm um 2,7 %, 4,1 % und um 14,1 % weniger ausgeprägt.

Der Aktivitätsrückgang von As+Bm gegenüber As+B unter Einfluss der verschiedenen Konzentrationen von Cyclophosphamid ist sehr heterogen.

Tab. 7: Mittelwert von jeweils fünf individuellen Proben von homogenen und heterogenen Zellreihen am Versuchstag 0 und am Tag 6 unter Einfluss von 1×10^{-11} Cyclophosphamid bezogen auf Referenzwerte (Zellreihen ohne Cyclophosphamideinfluss)

	A	As4	B	Bm	A+B	As4+B	A+Bm	As4+Bm
Tag 0	0,951	0,932	0,887	0,886	1,102	1,101	1,182	0,92
Tag 6	1,342	0,929	0,931	0,401	1,301	0,981	1,221	0,922

A: periphere Lymphozyten (PBLs) der Testperson A

As4: periphere Lymphozyten der Person A inkubiert mit 1×10^{-11} mol/l Cyclophosphamid

B: periphere Lymphozyten der Testperson B

Bm: mit Mitomycin C inaktivierte periphere Lymphozyten der Person B

A+B: periphere Lymphozyten der Person A und B im Verhältnis 1:1 (Gesamtzellzahl wie bei A, B und Bm)

A+Bm: PBLs der Person A und mit MMC inaktivierte PBLs der Person B im Verhältnis 1:1 (Gesamtzellzahl wie bei A, B, Bm und A+B)

As4+B: mit 1×10^{-11} mol/l Cyclophosphamid inkubierte PBL's der Person A mit PBLs der Person B im Verhältnis 1:1 (Gesamtzellzahl wie bei A, B, Bm, As1, A+B und A+Bm)

As4+Bm: mit 1×10^{-11} mol/l Cyclophosphamid inkubierte PBLs der Person A mit inaktivierten PBLs der Person B im Verhältnis 1:1 (Gesamtzellzahl wie bei Zellreihen A, As4, B, Bm, A+B, A+Bm u. As4+B)

MLC mit 1×10^{-11} mol/l Cyclophosphamid am Tag 0

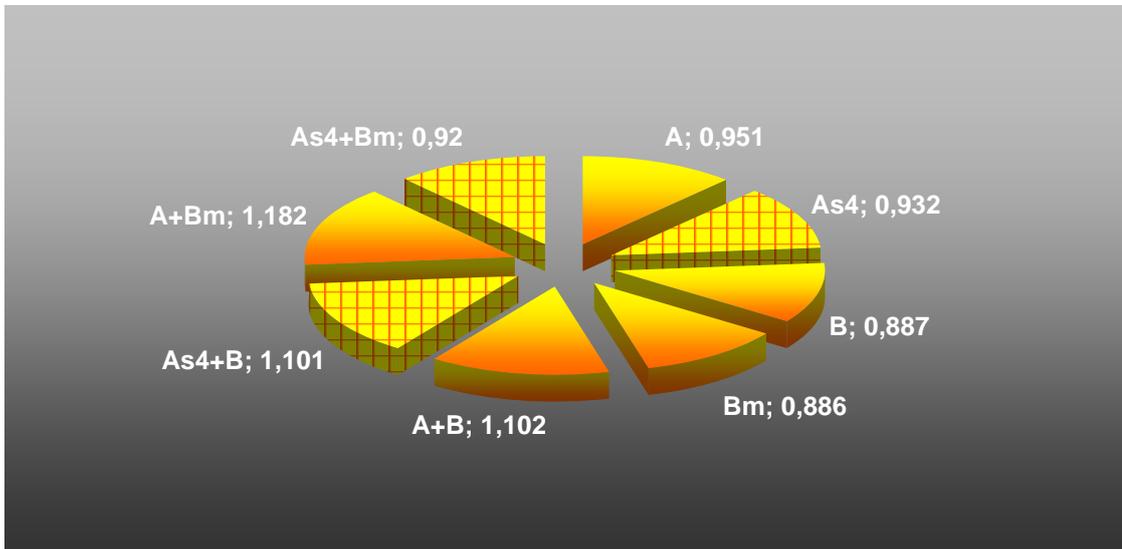


Abb. 11: Beeinflussung der PBL-Aktivitäten der Person A und B, allein und in Kombination mit 1×10^{-11} mol/l Cyclophosphamid bezogen auf Referenzwerte ohne Cyclophosphamid

MLC mit 1×10^{-11} mol/l Cyclophosphamid am Tag 6

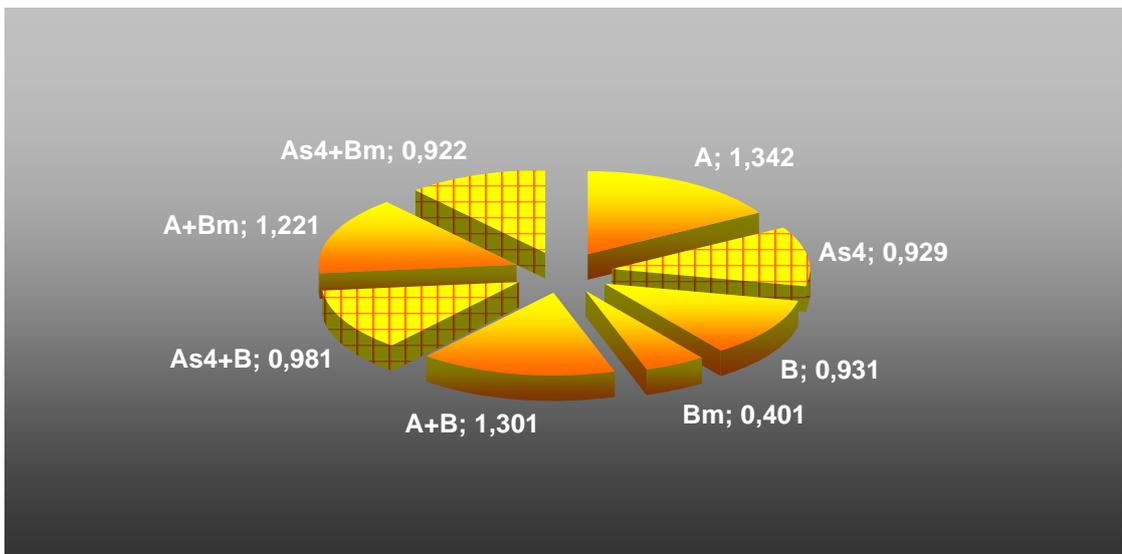


Abb. 12: Darstellung der PBL-Aktivitäten von Person A und Person B in einfachen und gemischten Zellkulturen in An- und Abwesenheit von Cyclophosphamid in einer Konzentration von 1×10^{-11} mol/l nach sechs Tagen Inkubation

3.2.2 MLC-Versuch 2.2 mit 6-Mercaptopurin in verschiedenen Konzentrationen am Tag 0 und 6

3.2.2.1 MLC-Versuch mit 6-Mercaptopurin (Konzentration 1×10^{-5} mol/l)

3.2.2.1.1 Ergebnisse am Tag 0

6-Mercaptopurin in einer Konzentration von 1×10^{-5} mol/l wirkt sich auf die Aktivität der peripheren Lymphozyten von Person A (As1) mit einer Senkung um 0,2 % im Vergleich zu unbehandelten Zellen aus.

As1+B und As1+Bm lassen beide im Vergleich zu As1 eine Aktivitätssteigerung erkennen: Im ersten Fall um 5,5 % und im zweiten Fall um 23,3 %.

Verglichen mit B und Bm ist As1+B um jeweils 12,9 % und 13 % aktiver. Auch As1+Bm zeigt eine erhöhte Aktivität von 32 % bzw. 31,9 % gegenüber Bm und B.

Richten wir unser Augenmerk wieder ausschließlich auf gemischte Zellkulturen, so zeigen die mit 1×10^{-5} mol/l 6-Mercaptopurin behandelten Zellkulturen verglichen mit unbehandelten Ansätzen nur minimal niedrigere PBL-Aktivitäten, wobei As1+B um 9 % und As1+Bm um nur 1 % weniger aktiv sind als ihre nicht unter Substanzeinfluss stehenden Äquivalente.

Die Inaktivierung von B macht sich jedoch bei den heterogenen Zellreihen in Form eines geringfügigen Aktivitätsanstieges bemerkbar. Dieser liegt für As1+Bm bei 16,7 % gegenüber As1+B.

3.2.2.1.2 Ergebnisse am Tag 6

Am Tag 6 besteht für As1 verglichen mit seinem ohne 6-Mercaptopurin angesetzten Äquivalent ein Aktivitätsdefizit seiner PBLs in Höhe von 58,6 %.

Im Vergleich der gemischten Zellkulturen As1+B und As1+Bm mit den jeweiligen Einzelkulturen A und B zeigen sich mit 1×10^{-5} mol/l 6-Mercaptopurin nach 6 Tagen Inkubation ausschließlich Suppressionen: As1+B zeigen im Vergleich zu A um 46,2 % und im Vergleich zu B um 22,4 % verminderte Aktivitäten. As1+Bm zeigen gegenüber A um 63,2 % und gegenüber B um 46,9 % verringerte Aktivitäten. As1+B zeigen im Vergleich zu As1 eine Aktivitätssteigerung von 29,9 %. As1+Bm verhält sich um 11,2 % suppressiver als As1.

Hingegen zeigen beide heterogenen Zellkulturen As1+B und As1+Bm gegenüber Bm noch eine Mehraktivität von 80 % bzw. 23,2 %.

Wie erwartet kommt es auch für As1+B verglichen mit A+B nach sechs Tagen Inkubation zu einer Aktivitätsminderung von 44,5 %. Analog dazu verhält sich auch die Zellkultur As1+Bm, deren Aktivitätsdefizit gegenüber A+Bm 59,5 % beträgt.

Für As1+Bm ist es aber gegenüber As1+B zu einem Aktivitätsverlust von 31,6 % gekommen.

Tab. 8: Vergleich der Aktivitäten der peripheren Lymphozyten von A und B unter Einfluss von 6-Mercaptopurin in einer Konzentration von 1×10^{-5} mol/l bezogen auf Referenzwerte ohne 6-Mercaptopurin am Tag 0 und Tag 6.
Dargestellt sind die Mittelwerte aus fünf individuellen Proben.

	A	As1	B	Bm	A+B	As1+B	A+Bm	As1+Bm
Tag 0	0,951	0,949	0,887	0,886	1,102	1,002	1,182	1,17
Tag 6	1,342	0,556	0,931	0,401	1,301	0,722	1,221	0,494

- A:** periphere Lymphozyten (PBLs) der Testperson A
As1: periphere Lymphozyten der Person A inkubiert mit 1×10^{-5} mol/l 6-Mercaptopurin
B: periphere Lymphozyten der Testperson B
Bm: mit Mitomycin C inaktivierte periphere Lymphozyten der Person B
A+B: periphere Lymphozyten der Person A und B im Verhältnis 1:1 (Gesamtzellzahl wie bei A, B und Bm)
A+Bm: PBLs der Person A und mit MMC inaktivierte PBLs der Person B im Verhältnis 1:1 (Gesamtzellzahl wie bei A, B, Bm und A+B)
As1+B: mit 1×10^{-5} mol/l 6-Mercaptopurin inkubierte PBLs der Person A mit PBLs der Person B im Verhältnis 1:1 (Gesamtzellzahl wie bei A, B, Bm, As1, A+B und A+Bm)
As1+Bm: mit 1×10^{-5} mol/l 6-Mercaptopurin inkubierte PBLs der Person A mit inaktivierten PBLs der Person B im Verhältnis 1:1 (Gesamtzellzahl wie bei den Zellreihen A, As1, B, Bm, A+B, A + Bm u. As1+B)

MLC-Versuch 2.2 mit 6-Mercaptopurin

MLC mit 1×10^{-5} mol/l 6-Mercaptopurin am Tag 0

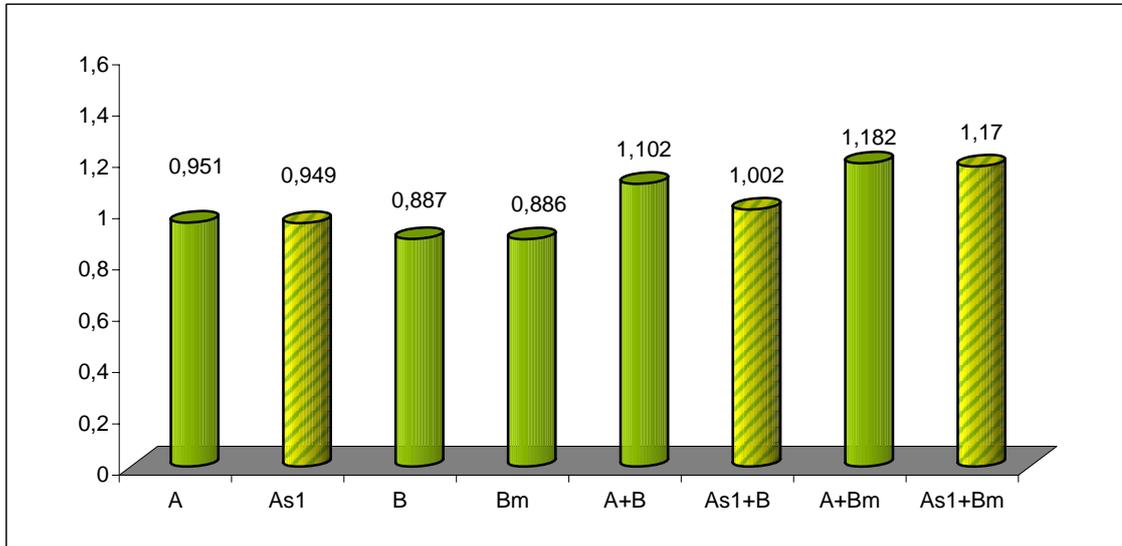


Abb. 13: Auswirkung von 6-Mercaptopurin auf die PBL-Aktivitäten der Person A und B in Mono- und gemischten Zellkulturen verglichen mit BPL-Aktivitäten ohne 6-Mercaptopurineinfluss am Tag 0

MLC mit 1×10^{-5} mol/l 6-Mercaptopurin am Tag 6

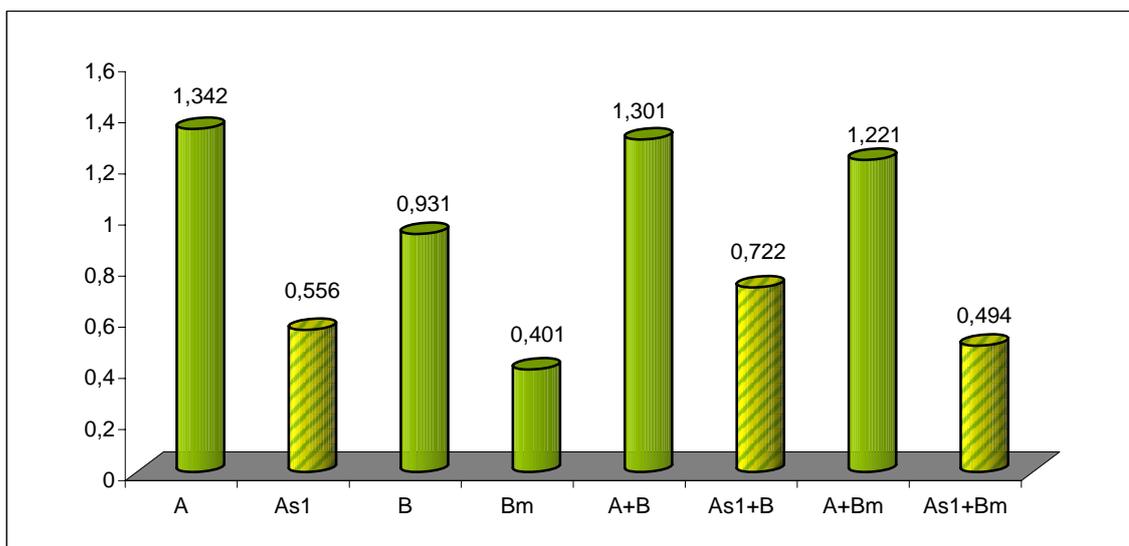


Abb. 14: Gezeigt ist die Aktivitätsänderung der peripheren Lymphozyten der Person A und B nach einer 6-tägigen Inkubation mit 6-Mercaptopurin. Die Zellkulturen wurden sowohl einzeln wie auch gemischt getestet

3.2.2.2 MLC-Versuch mit 6-Mercaptopurin (Konzentration 1×10^{-7} mol/l)

3.2.2.2.1 Ergebnisse am Tag 0

Am Tag 0 ergibt sich eine Aktivitätsminderung von 0,7 % für die PBLs von Person A nach Behandlung mit 1×10^{-7} mol/l 6-Mercaptopurin gegenüber den unbehandelten PBLs.

Die MLC-Ansätze As₂+B und As₂+B_m lassen beide eine Mehraktivität um 16,6 % bzw. 24,9 % gegenüber der Einzelkultur As₂ erkennen.

Verglichen mit den Referenzkulturen B bzw. B_m kommt es ebenfalls bei beiden Zellkulturen zu stark erhöhten PBMC-Aktivitäten: Gegenüber B zeigt As₂+B eine Aktivitätserhöhung von 24,1% und gegenüber As₂+B_m von 32,9 %.

Gegenüber B_m weisen beide gemischten Zellkulturen As₂+B und As₂+B_m Aktivitätssteigerungen von 24,3 % bzw. 33,1 % auf.

Vergleichen wir heterogene Zellreihen mit und ohne 6-Mercaptopurineinfluss untereinander, so zeigen As₂+B im Vergleich zu A+B und As₂+B_m im Vergleich zu A+B_m ähnlich hohe Aktivitäten.

As₂+B_m zeigt trotz Inaktivierung der peripheren Lymphozyten der Person B eine Aktivitätssteigerung von 7 % gegenüber As₂+B.

3.2.2.2.2 Ergebnisse am Tag 6

Die Aktivitätssuppression der Zellreihe A unter 6-Mercaptopurineinfluss mit einer Konzentration von 1×10^{-7} mol/l (As₂) verglichen mit unbehandelten PBLs der Person A steigt nach sechs Tagen Inkubation auf 59 %.

Betrachten wir homogene Zellpopulationen im Vergleich zu gemischten Zellkulturen fällt Folgendes auf:

As₂+B zeigt in Bezug auf A eine um 45,6 % verminderte Aktivität und im Bezug auf As₂ eine Aktivitätserhöhung um 32,7 %.

As₂+B_m weisen jedoch eine Aktivitätsminderung um 63,6 % im Vergleich zu A und um 11,1 % im Vergleich zu As₂ auf.

As₂+B und As₂+B_m lassen beide im Vergleich zur homogenen Zellkultur B eine Suppression von 21,6 % bzw. 47,5 % erkennen. Im Vergleich zu B_m zeigen As₂+B und As₂+B_m eine Aktivitätszunahme um jeweils 82 % und 21,9 %.

Die direkte Gegenüberstellung der gemischten Zellkulturen A+B und A+B_m mit und ohne Einfluss von 6-Mercaptopurin macht deutlich, dass 6-Mercaptopurin sowohl bei As₂+B als auch bei As₂+B_m in Bezug auf ihre jeweiligen nicht unter Substanzeeinfluss stehenden Äquivalente A+B und A+B_m zu einer Senkung ihrer PBL-Aktivität führt. Für As₂+B gegenüber A+B liegt diese Aktivitätssenkung bei 43,9 % und für As₂+B_m gegenüber A+B_m liegt sie bei 59,9 %.

Die Inaktivierung der PBLs der Person B führt bei As₂+B_m zu einem Aktivitätsrückgang von 33 % im Vergleich zu As₂+B.

Tab. 9: Mittelwerte von jeweils fünf individuellen Proben von homogenen und heterogenen Zellreihen am Versuchstag 0 und am Tag 6 unter Einfluss von 1×10^{-7} 6-Mercaptopurin bezogen auf Referenzwerte (Zellreihen ohne 6-Mercaptopurin)

	A	As2	B	Bm	A+B	As2+B	A+Bm	As2+Bm
Tag 0	0,951	0,944	0,887	0,886	1,102	1,101	1,182	1,179
Tag 6	1,342	0,55	0,931	0,401	1,301	0,73	1,221	0,489

- A:** periphere Lymphozyten (PBLs) der Testperson A
As2: periphere Lymphozyten der Person A inkubiert mit 1×10^{-7} mol/l 6-Mercaptopurin
B: periphere Lymphozyten der Testperson B
Bm: mit Mitomycin C inaktivierte periphere Lymphozyten der Person B
A+B: periphere Lymphozyten der Person A und B im Verhältnis 1:1 (Gesamtzellzahl wie bei A, B und Bm)
A+Bm: PBLs der Person A und mit MMC inaktivierte PBLs der Person B im Verhältnis 1:1 (Gesamtzellzahl wie bei A, B, Bm und A+B)
As2+B: mit 1×10^{-7} mol/l 6-Mercaptopurin inkubierte PBLs der Person A mit PBLs der Person B im Verhältnis 1:1 (Gesamtzellzahl wie bei A, B, Bm, As2, A+B und A+Bm)
As2+Bm: mit 1×10^{-7} mol/l 6-Mercaptopurin inkubierte PBLs der Person A mit inaktivierten PBLs der Person B im Verhältnis 1:1 (Gesamtzellzahl wie bei den Zellreihen A, As2, B, Bm, A+B, A)

MLC mit 1×10^{-7} mol/l 6-Mercaptopurin am Tag 0

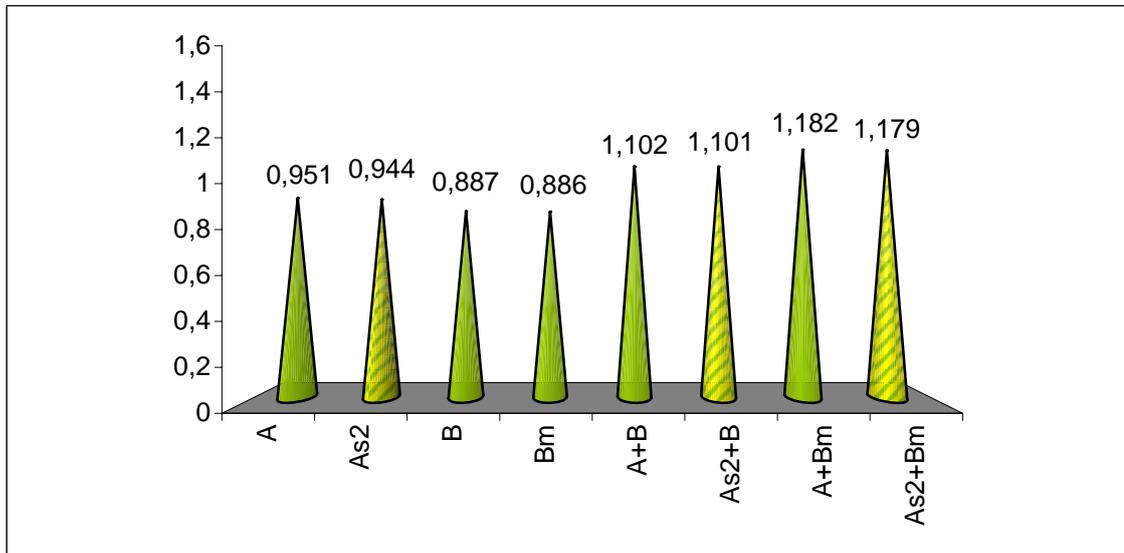


Abb. 15: Gezeigt wird die Auswirkung von 6-Mercaptopurin in einer Konzentration von 1×10^{-7} mol/l auf die Aktivität der peripheren Lymphozyten der Person A in Mono- und gemischten Zellkulturen nach sechs Tagen Inkubation

MLC mit 1×10^{-7} mol/l 6-Mercaptopurin am Tag 6

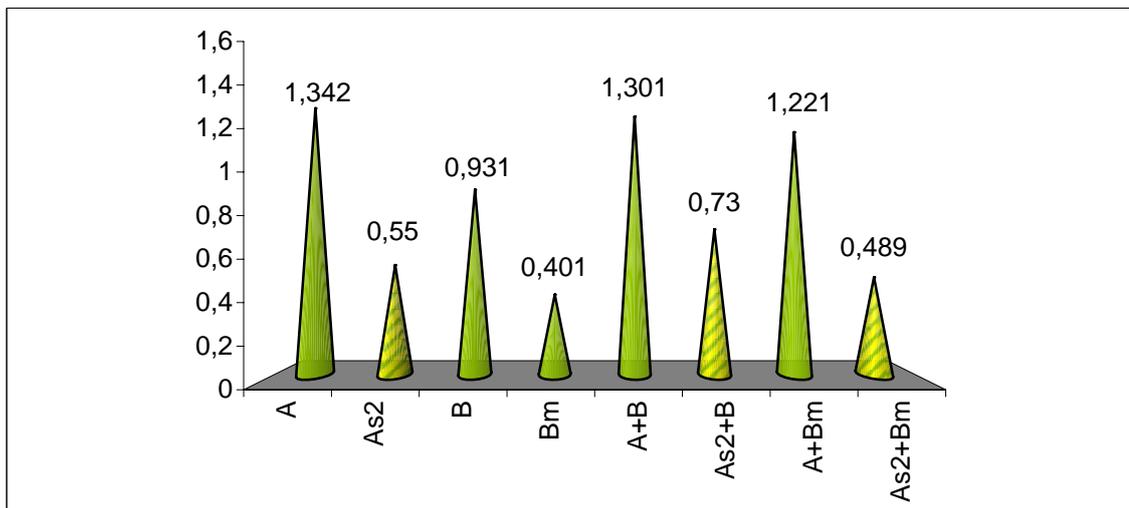


Abb. 16: Dargestellt sind die Aktivitäten von PBLs der Personen A und B nach einer 6-tägigen Inkubation mit 6-Mercaptopurin in einer Konzentration von 1×10^{-7} mol/l verglichen mit unbehandelten PBLs als Referenzwert

3.2.2.3 MLC-Versuch mit 6-Mercaptopurin (Konzentration 1×10^{-9} mol/l)

3.2.2.3.1 Ergebnisse am Tag 0

Das Aktivitätsniveau von A sinkt am Tag 0 unter Einfluss von 1×10^{-9} mol/l 6-Mercaptopurin um 1,1 %.

Beim Vergleich der MLC-Ansätze As3+B und As3+Bm mit den homogenen Zellreihen sehen wir Aktivitätssteigerungen. As3+B zeigt gegenüber As3 und B bzw. Bm eine Aktivitätserhöhung von 15,6 %, 22,7 % bzw. 22,8 %.

Auch für As3+Bm ist eine Steigerung der Aktivität von 25 % im Vergleich zu As3, von 32,9 % im Vergleich zu B und 33 % verglichen mit Bm zu verzeichnen.

As3+B zeigt eine um 1,3 % geringere Aktivität als A+B; für As3+Bm liegt diese Aktivitätsabnahme verglichen mit A+Bm bei 0,2 %. Die PBL-Aktivität von As3+B ist gegenüber As3+Bm um 7,7 % geringer.

3.2.2.3.2 Ergebnisse am Tag 6

Die Aktivitätsdifferenz zwischen As3 und A beträgt nach sechs Tagen Inkubation mit 1×10^{-9} mol/l 6-Mercaptopurin 42,9 % und spiegelt eine deutliche Aktivitätsreduktion wieder.

As3+B zeigt sich um 2,6 % aktiver als As3 und zeigt eine verminderte Aktivität um 41,4 % verglichen mit A und um 15,6 % im Vergleich zu B.

Bei As3+Bm kommt es zu einer Suppression in Höhe von 56 % im Vergleich zu A und 22,9 % im Vergleich zu As3. Auch gegenüber B zeigt As3+Bm eine um 36,6 % verminderte Aktivität. Verglichen mit der stark reduzierten PBL-Aktivität von Bm zeigen As3+B und As3+Bm eine Aktivitätserhöhung von 96 % bzw. 47,1 %.

As3+B zeigt eine Aktivitätsabnahme von 39,6 % gegenüber A+B. Die PBL-Aktivität von As3+Bm ist gegenüber A+Bm um 51,7 % reduziert.

Verglichen mit As3+Bm zeigt As3+B ein um 33,2 % erhöhte Aktivität.

Tab. 10: Vergleich der PBL-Aktivitäten von A und B einzeln und in Zweier-Kombination in Abhängigkeit von 1×10^{-9} mol/l 6-Mercaptopurin mit Referenzkulturen ohne Zusatz. Dargestellt sind die Mittelwerte von jeweils fünf individuellen Proben.

	A	As3	B	Bm	A+B	As3+B	A+Bm	As3+Bm
Tag 0	0,951	0,941	0,887	0,886	1,102	1,088	1,182	1,179
Tag 6	1,342	0,766	0,931	0,401	1,301	0,786	1,221	0,59

- A:** periphere Lymphozyten (PBLs) der Testperson A
As3: periphere Lymphozyten der Person A inkubiert mit 1×10^{-9} mol/l 6-Mercaptopurin
B: periphere Lymphozyten der Testperson B
Bm: mit Mitomycin C inaktivierte periphere Lymphozyten der Person B
A+B: periphere Lymphozyten der Person A und B im Verhältnis 1:1 (Gesamtzellzahl wie bei A, B und Bm)
A+Bm: PBLs der Person A und mit MMC inaktivierte PBLs der Person B im Verhältnis 1:1 (Gesamtzellzahl wie bei A, B, Bm und A+B)
As3+B: mit 1×10^{-9} mol/l 6-Mercaptopurin inkubierte PBLs der Person A mit PBLs der Person B im Verhältnis 1:1 (Gesamtzellzahl wie bei A, B, Bm, As3 A+B und A+Bm)
As3+Bm: mit 1×10^{-9} mol/l 6-Mercaptopurin inkubierte PBLs der Person A mit inaktivierten PBLs der Person B im Verhältnis 1:1 (Gesamtzellzahl wie bei den Zellreihen A, As3, Bm, A+B, A+Bm u. As3+B)

MLC mit 1×10^{-9} mol/ 6-Mercaptopurin am Tag 0

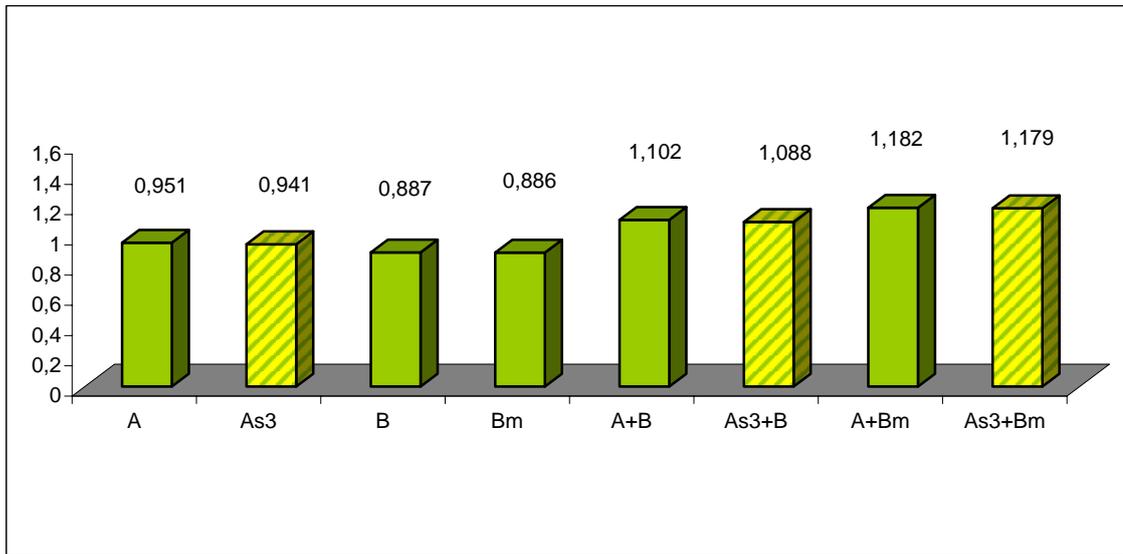


Abb. 17: Aktivitäten der peripheren Lymphozyten von Person A und B (von B auch in inaktiver Form Bm) einzeln und in Kombination mit 6- Mercaptopurin in einer Konzentration von 1×10^{-9} mol/l am Tag 0

MLC mit 1×10^{-9} mol/l 6-Mercapuoপুরin am Tag 6

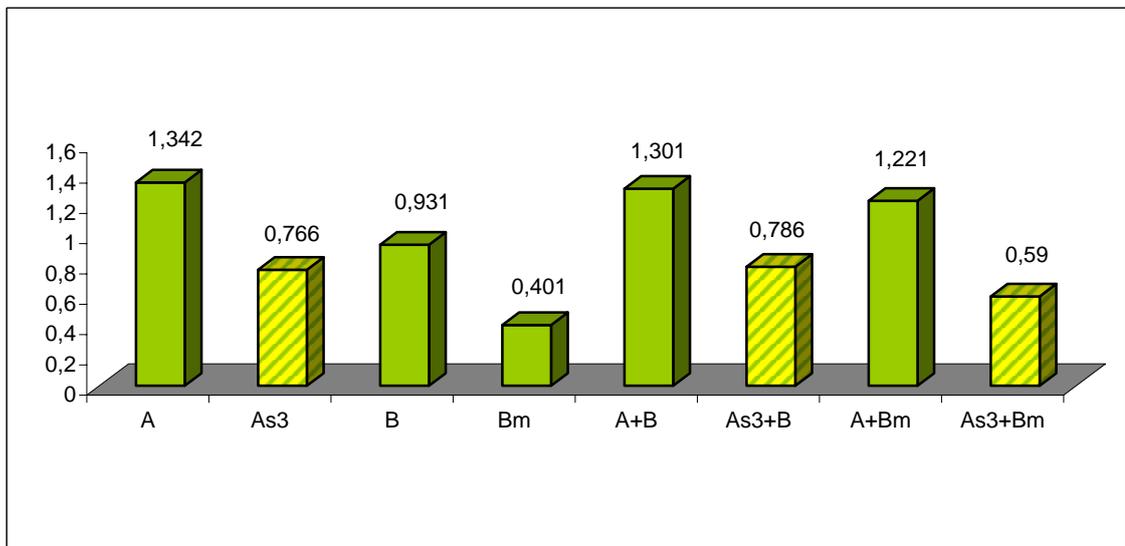


Abb. 18: Aktivitäten der PBLs der Person A und B unter Einfluss von 6-Mercaptopurin in einer Konzentration von 1×10^{-9} mol/l im Vergleich mit Referenzwerte nach sechs Tagen Inkubation

3.2.2.4 MLC-Versuch mit 6-Mercaptopurin (Konzentration 1×10^{-11} mol/l)

3.2.2.4.1 Ergebnisse am Tag 0

PBLs von Person A zeigen zu Beginn der 6-Mercaptopurinbehandlung eine Aktivitätserhöhung um nur 0,8 %.

As4+B zeigt gegenüber As4 und B eine Mehraktivität von 16,4 % und 23,8 %. Gegenüber Bm beträgt der Aktivitätsüberschuss von As4+B etwa 23,9 %.

Ein Aktivitätsplus von 23,8 % lässt sich für As4+Bm verglichen mit A und um 32,8 % verglichen mit B und Bm ermitteln. As4+Bm weist gegenüber As4 ein Aktivitätsplus von 15,5 % auf.

A+B und A+Bm zeigen nach Mercaptopurinbehandlung am Tag 0 gleiche Aktivitäten. As4+Bm zeigt eine Mehraktivität im Vergleich zu As4+B und zwar um 7,2 %.

3.2.2.4.2 Ergebnisse am Tag 6

Die Aktivitätsdifferenz zwischen As4 und A beträgt nach sechs Tagen Inkubation 41,9 % und spiegelt eine deutliche Aktivitätsreduktion unter 6-Mercaptopurin wider.

Die noch am Tag 0 anzutreffenden Mehraktivitäten bei den gemischten Zellkulturen, verglichen mit ihren Einzelbestandteilen, verwandeln sich nach sechs Tagen Inkubation in eine Suppression. Nur gegenüber Bm besteht ein Aktivitätsplus und zwar um 86,3 % bei As4+B und um 44,6 % bei As4+Bm.

As4+B zeigt im Vergleich zu A, As4 und B eine Aktivitätsminderung um jeweils 44,3 %, 4,1 % und 20,2 % . Sie haben in Bezug auf A um 56,8 %, As4 um 25,5 % und verglichen mit B um 38 % verminderte Aktivitäten. Im Vergleich zu Bm zeigen As4+B und As4+Bm Aktivitätserhöhungen von 93,7 % und 44,6 %.

Für die gemischten Zellkulturen macht sich das Beisein im Vergleich zur Abwesenheit von 6-Mercaptopurin ebenfalls sehr deutlich in Form einer Suppression bemerkbar. Dabei zeigt As4+B eine Aktivitätsabnahme von 42,6 % gegenüber A+B. Fast identisch dazu ist auch die PBL-Aktivität von As4+Bm gegenüber A+Bm um 52,5 % reduziert.

AS4+Bm zeigt jedoch eine um 22,4 % geringere Aktivität als As4+B.

3.2.2.4.3 Zusammenfassung der Ergebnisse von Tag 0 und Tag 6

Periphere Blutlymphozyten der Person A zeigen unter dem Einfluss von 6-Mercaptopurin am Tag 0 nur einen minimalen Aktivitätsverlust. Die Konzentration von 6-Mercaptopurin hat darauf keinen Einfluss. Nach sechs Tagen Inkubationszeit kommt es jedoch zu einer beträchtlichen Aktivitätssenkung, die bei höheren

Konzentrationen von 6-Mercaptopurin ausgeprägter ist als bei niedrigeren Konzentrationen. Das Aktivitätsdefizit ist bei As1 und As2 im Vergleich zu A fast gleich. Die Aktivitätsminderung von As1 beträgt gegenüber As3 und As4 36,6 % bzw. 39,9 %.

Auch für A+B und A+Bm kommt es am Tag 0 und nach sechs Tagen Inkubation unter 6-Mercaptopurineinfluss zu Aktivitätsverlusten. Diese liegen am Tag 6 für As1+B um 0,6 % höher als bei As2+B, um 4,9 % höher als bei As3+B und um 1,9 % höher als bei As4+B. Am Tag 0 kommt es nur bei einer Konzentration von 1×10^{-5} mol/l 6-Mercaptopurin zu einem Aktivitätsverlust von 9 %.

As1+Bm zeigt nach sechs Tagen Inkubation gegenüber As2+Bm eine um 0,4 % geringere Aktivität gegenüber As3+Bm und gegenüber As4+Bm um 7%. Am Tag 0 zeigt A+Bm unter 6-Mercaptopurineinfluss keinen signifikanten Aktivitätsunterschied im Vergleich zu A+Bm ohne Substanz.

A+Bm zeigt gegenüber A+B durch die Behandlung mit 6-Mercaptopurin am Tag 0 bei allen getesteten Konzentrationen erhöhte Aktivitäten.

Tab. 11: Beeinflussung der PBLs-Aktivitäten der Person A und B (sowie inaktiviert mit MMC als Bm) allein und in Kombination mit 6-Mercaptopurin in einer Konzentration von 1×10^{-11} mol/l verglichen mit Referenzwerten am Versuchstag 0 und am Tag 6. Dargestellt sind die Mittelwerte aus fünf individuellen Proben.

	A	As4	B	Bm	A+B	As4+B	A+Bm	As4+Bm
Tag 0	0,951	0,943	0,887	0,886	1,102	1,098	1,182	1,177
Tag 6	1,342	0,779	0,936	0,401	1,221	0,747	1,221	0,58

A: periphere Lymphozyten (PBLs) der Testperson A

As4: periphere Lymphozyten der Person A inkubiert mit 1×10^{-11} mol/l 6-Mercaptopurin

B: periphere Lymphozyten der Testperson B

Bm: mit Mitomycin C inaktivierte periphere Lymphozyten der Person B

A+B: periphere Lymphozyten der Person A und B im Verhältnis 1:1 (Gesamtzellzahl wie bei A, B und Bm)

A+Bm: PBLs der Person A und mit MMC inaktivierte PBLs der Person B im Verhältnis 1:1 (Gesamtzellzahl wie bei A, B, Bm und A+B)

As4+B: mit 1×10^{-11} mol/l 6-Mercaptopurin inkubierte PBLs der Person A mit PBLs der Person B im Verhältnis 1:1 (Gesamtzellzahl wie bei A, B, Bm, As4, A+B und A+Bm)

As4+Bm: mit 1×10^{-11} mol/l 6-Mercaptopurin inkubierte PBLs der Person A mit inaktivierten PBLs der Person B im Verhältnis 1:1 (Gesamtzellzahl wie bei den Zellreihen A, As4, Bm, A+B, A+Bm u. As4+B)

MLC mit 1×10^{-11} mol/l 6-Mercaptopurin am Tag 0

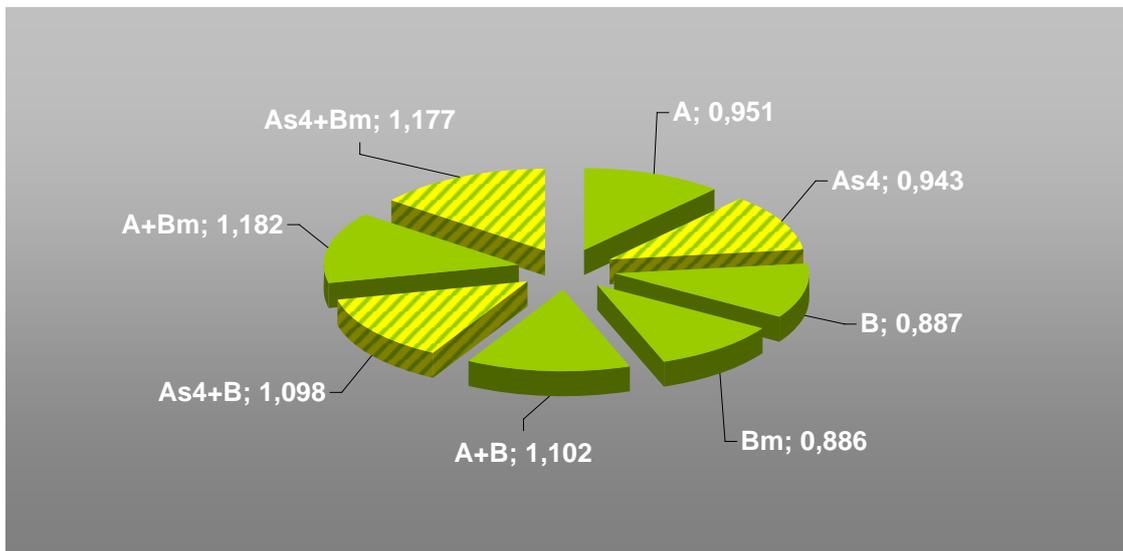


Abb. 19: Beeinflussung der PBL-Aktivitäten der Person A und B, allein und in Kombination mit 6-Mercaptopurin in einer Konzentration von 1×10^{-11} mol/l verglichen mit Referenzwerte ohne 6-Mercaptopurin am Tag 0

MLC mit 1×10^{-11} mol/l 6-Mercaptopurin am Tag 6

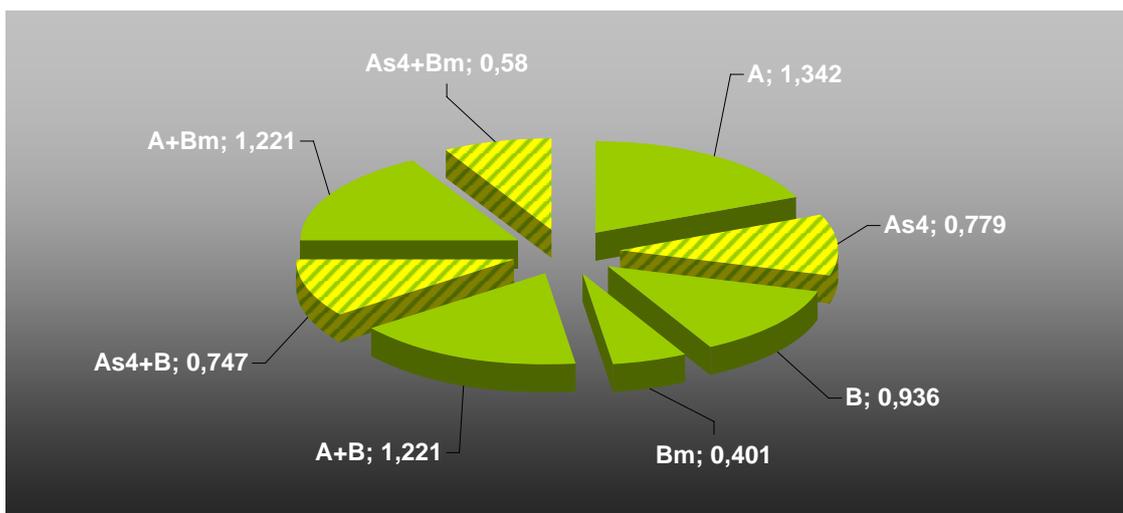


Abb. 20: Einfluss von 6-Mercaptopurin in einer Konzentration von 1×10^{-11} mol/l auf PBLs der Person A und B im Vergleich mit Referenzwerte nach sechs Tagen Inkubation

3.2.3 MLC-Versuch 2.3 mit Methotrexat als Testsubstanz in verschiedenen Konzentrationen am Tag 0 und am Tag 6

In den folgenden Versuchen sind im Gegensatz zu den vorherigen Versuchen die Messungen des MLC-Versuchs 2 ohne Testsubstanz mit den Ergebnissen vom Tag 0 und Tag 6 für die konstanten Zellreihen A, B, Bm, A+B und A+Bm zugrunde gelegt.

3.2.3.1 MLC-Versuch mit Methotrexat (Konzentration 1×10^{-5} mol/l)

3.2.3.1.1 Ergebnisse am Tag 0

Methotrexat führt bereits am Tag 0 mit einer Konzentration von 1×10^{-5} mol/l zu einer Aktivitätsminderung um 2,7 % für As1 im Vergleich zur unbehandelten Zellkultur A.

As1+B und As1+Bm zeigen unter Einfluss von Methotrexat ein ähnliches Verhaltensmuster gegenüber den Teilbestandteilen wie schon A+B und A+Bm:

Es kommt im Vergleich zu den Zellreihen A und As zu einer Aktivitätssteigerung, die für As1+B bei 16,5 % bzw. 19,6 % und für As1+Bm bei 16,2 % bzw. 19,4 % liegt (zur vollständigen Übersicht sei nochmals an dieser Stelle erwähnt, dass analog zu A für A+B die Aktivitätsüberschüsse bei 19,7 % und für A+Bm bei 18,1 % lagen).

Im direkten Vergleich zeigt die Zellkultur As1+B mit identischer Zellzahl wie B und Bm eine um nur 0,7 % und 0,6 % verminderte Aktivität.

Auch As1+Bm zeigt im Vergleich zu B und Bm eine um 0,9 % bzw. 0,3 % erhöhte Aktivität.

Die gemischten Zellkulturen verhalten sich zueinander wie folgt:

Der Einfluss von Methotrexat in einer Konzentration von 1×10^{-5} mol/l ist im Vergleich von As1+B zu A+B als Verringerung der PBL-Aktivität um 2,7 % zu erkennen. Dieser Einfluss scheint auch bei der Gegenüberstellung von As1+Bm und A+Bm mit einer Senkung der „As1+Bm“-Aktivität um 2,9 % zum Tragen zu kommen. As1+B ist darüber hinaus um 0,2 % aktiver als die Kombination aus As1 mit inaktivierten PBLs der Person B, d.h. As1+Bm.

3.2.3.1.2 Ergebnisse am Tag 6

Methotrexat mit einer Konzentration von 1×10^{-5} mol/l führt am Tag 6 zu einem Aktivitätsverlust von 74,8 % der peripheren Lymphozyten der Zellreihe As1 im Vergleich zu A, d.h. ohne Einfluss der Testsubstanz.

Beim Vergleich der heterogenen Zellreihen mit ihren Einzelkomponenten scheint die Anwesenheit von Methotrexat eine große Rolle zu spielen. Dabei fällt auf, dass sowohl As1+B als auch As1+Bm nach sechs Tagen Inkubation niedrigere

Aktivitäten im Hinblick auf die jeweiligen Einzelkomponenten A, B und Bm aufweisen. Die Mehraktivität von As1+B und As1+Bm um 16,5 % bzw. um 16,2% verglichen mit A verwandelt sich am Tag 6 in ein Aktivitätsdefizit von 60,3 % bzw. 67,8 %. Ähnliche Aktivitätseinbußen stellt man bei As1+B und As1+Bm im Vergleich zu B und Bm fest: As1+B zeigt eine Aktivitätsminderung von 63,6 % und 5,3 % gegenüber B und Bm. Bei As1+Bm kommt es mit 1×10^{-5} mol/l Methotrexat zu einer Suppression von 70,5 % gegenüber B und 23,3 % gegenüber Bm. Im Vergleich zu As1 zeigen beide gemischten Zellkulturen As1+B und As1+Bm deutliche Aktivitätszunahmen von 57,9 % bzw. 27,9 %.

Die direkte Gegenüberstellung der gemischten Zellkulturen macht deutlich, dass Methotrexat sowohl bei As1+B als auch bei As1+Bm in Bezug auf ihre nicht unter Substanzeinfluss stehenden Äquivalente, d.h. gegenüber A+B und A+Bm, zu einer Senkung ihrer PBL-Aktivitäten führt. Für As1+B liegt gegenüber A+B diese Aktivitätsabnahme bei 57,3 % und für As1+Bm gegenüber A+Bm liegt sie bei 66,3 %.

Darüber hinaus ist ein Aktivitätsdefizit von 19,0 % für As1+Bm im Vergleich zu As1+B festzustellen, das auf Inaktivierung der PBLs der Person B zurückzuführen ist.

Tab. 12: Mittelwerte von fünf individuellen Proben von homogenen und heterogenen Zellreihen am Versuchstag 0 und am Tag 6 unter Einfluss von 1×10^{-5} Methotrexat verglichen mit Referenzwerten (Zellreihen ohne Methotrexateinfluss)

	A	As1	B	Bm	A+B	As1+B	A+Bm	As1+Bm
Tag 0	0,751	0,731	0,881	0,87	0,899	0,875	1,182	0,873
Tag 6	1,312	0,33	1,431	0,55	1,22	0,521	1,251	0,422

- A:** periphere Lymphozyten (PBLs) der Testperson A
- As1:** periphere Lymphozyten der Person A inkubiert mit 1×10^{-5} mol/l Methotrexat
- B:** periphere Lymphozyten der Testperson B
- Bm:** mit Mitomycin C inaktivierte periphere Lymphozyten der Person B
- A+B:** periphere Lymphozyten der Person A und B im Verhältnis 1:1 (Gesamtzellzahl wie bei A, B und Bm)
- A+Bm:** PBLs der Person A und mit MMC inaktivierte PBLs der Person B im Verhältnis 1:1 (Gesamtzellzahl wie bei A, B, Bm und A+B)
- As1+B:** mit 1×10^{-5} mol/l Methotrexat inkubierte PBLs der Person A mit PBLs der Person B im Verhältnis 1:1 (Gesamtzellzahl wie bei A, B, Bm, As1, A+B und A+Bm)
- As1+Bm:** mit 1×10^{-5} mol/l Methotrexat inkubierte PBLs der Person A mit inaktivierten PBLs der Person B im Verhältnis 1:1 (Gesamtzellzahl wie bei den Zellreihen A, As1, B, Bm, A+B, A+Bm u. As1+B)

MLC-Versuch 2.3 mit Methotrexat

MLC mit 1×10^{-5} mol/l Methotrexat am Tag 0

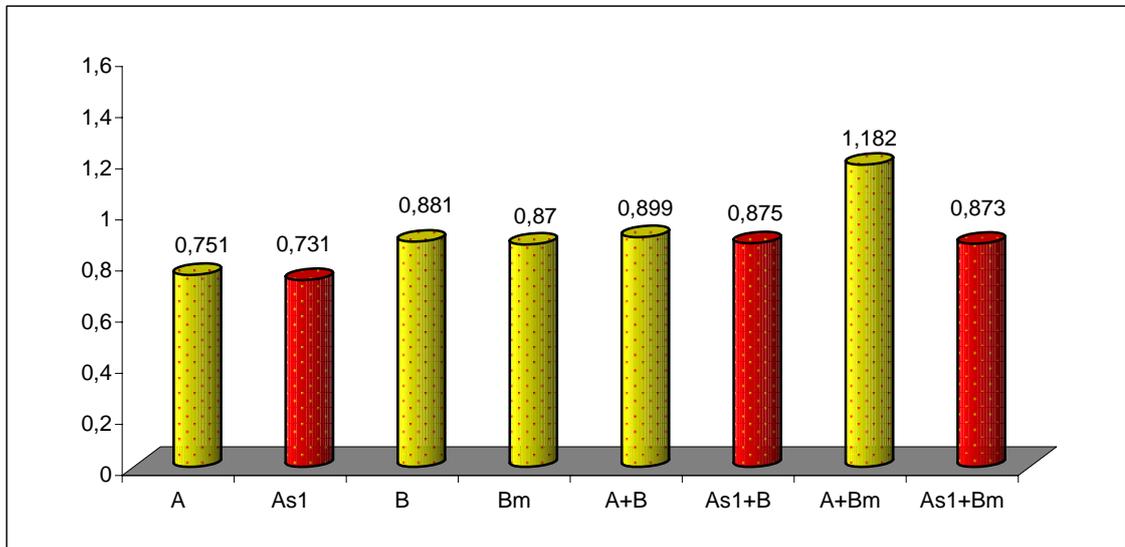


Abb. 21: Dargestellt ist die Auswirkung von Methotrexat auf die PBL-Aktivitäten der Individuum A und B in homogenen- und heterogenen Zellkulturen verglichen mit PBLs der Personen A und B ohne Methotrexateinfluss am Tag 0

MLC mit 1×10^{-5} mol/l Methotrexat am Tag 6

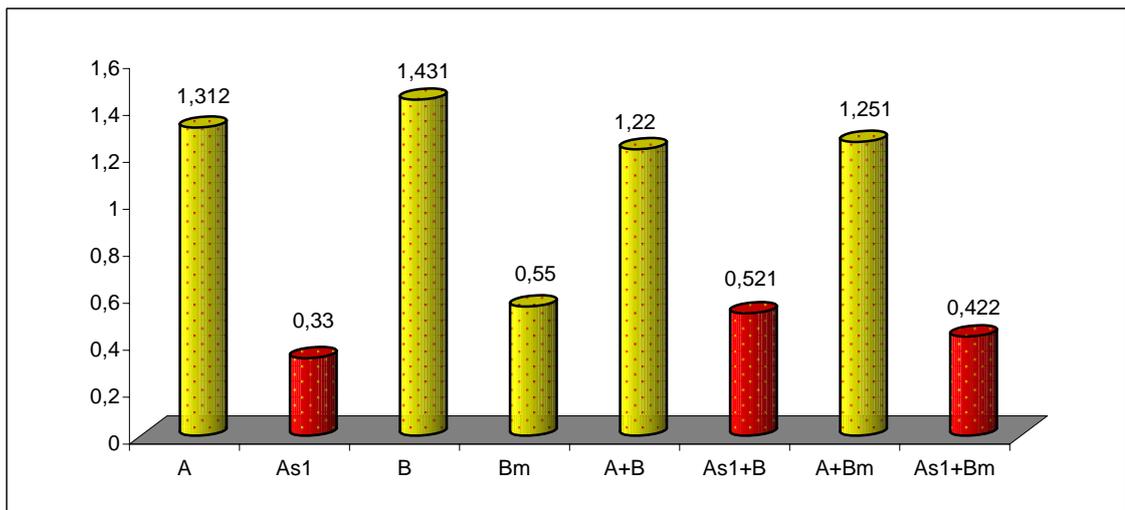


Abb. 22: Gezeigt wird die Auswirkung der 6-tägigen Inkubation auf die Aktivitäten der peripheren Lymphozyten der Person A und B (vorliegend in Einzel und gemischten Zellkulturen) mit und ohne Methotrexatzugabe

3.2.3.2 MLC-Versuch mit Methotrexat (Konzentration 1×10^{-7} mol/l)

3.2.3.2.1 Ergebnisse am Tag 0

Hier kommt es für PBLs der Person A unter Einfluss von 1×10^{-7} mol/l Methotrexat (As₂) zu einer Aktivitätssenkung um 2,1 %.

As₂+B ist im Vergleich zu A, As₂ und Bm um jeweils 17,2 %, 19,7 % und 1,1 % aktiver. Ähnlich verhält sich As₂+Bm gegenüber A und As₂.

Gegenüber B zeigt As₂+B und gegenüber Bm zeigt As₂+Bm fast einen Aktivitätsgleichstand.

As₂+Bm zeigt im Vergleich zu B eine verminderte Aktivität von 1 %.

Werden die primären MLC-Ansätze, d.h. die im Verhältnis 1:1 gemischten Zellkulturen aus den PBMCs zweier Individuen, miteinander verglichen, so ergeben sich für As₂+B im Vergleich zu A+B um 2,1 % und für As₂+Bm im Vergleich zu A+Bm Suppressionen um 1,7 %.

Die Inaktivierung von B in gemischten Zellkulturen scheint am Versuchsbeginn mit 0,9 % noch keinen aktivitätsmindernden Effekt gegenüber seinem unvorbehandelten Äquivalent zu haben.

3.2.3.2.2 Ergebnisse am Tag 6

Nach sechs Tagen Inkubation fallen unter Einfluss von Methotrexat in einer Konzentration von 1×10^{-7} mol/l deutliche Aktivitätsunterschiede auf. Es kommt zu einer Suppression um 71 % von As₂ im Vergleich zur Referenzkultur A.

Sowohl As₂+B als auch As₂+Bm zeigen unter Methotrexateinfluss gegenüber der Einzelkultur As₂ Mehraktivitäten in Höhe von 54,7 % und 29,2 %. Gegenüber der Referenzkultur A und B ohne Substanzeinfluss zeigt As₂+B Aktivitätsabfälle um 55,2 % und 58,9 %. Der aktivitätssenkende Effekt von Methotrexat führt bei der gemischten Zellkultur As₂+Bm auch zu Suppressionen in Höhe von 62,6 % gegenüber A und 65,7 % gegenüber B.

Verglichen mit Bm zeigt As₁+B einen Aktivitätsüberschuss von 6,9 %. Im Gegensatz dazu zeigt As₂+Bm im Vergleich zu Bm ein Aktivitätsdefizit von 10 %.

Die PBL-Aktivität von As₂+B gegenüber A+B ist um 51,8 % vermindert. Auch As₂+Bm ist gegenüber A+Bm um 60,8 % weniger aktiv.

MLC-Ansätze ohne Inaktivierung von B zeigen höhere Aktivitäten als MLC-Ansätze mit inaktivierten PBLs. Für As₂+B beträgt diese Mehraktivität 19,8 %.

Tab. 13: Mittelwerte von jeweils fünf individuellen Proben von homogenen und heterogenen Zellreihen am Versuchstag 0 und am Tag 6 unter Einfluss von 1×10^{-7} Methotrexat verglichen mit Referenzwerten (Zellreihen ohne Methotrexat)

	A	As2	B	Bm	A+B	As2+B	A+Bm	As2+Bm
Tag 0	0,751	0,88	0,881	0,87	0,899	0,88	0,887	0,872
Tag 6	1,312	0,38	1,431	0,55	1,22	0,588	1,251	0,491

- A:** periphere Lymphozyten (PBLs) der Testperson A
As2: periphere Lymphozyten der Person A inkubiert mit 1×10^{-7} mol/l Methotrexat
B: periphere Lymphozyten der Testperson B
Bm: mit Mitomycin C inaktivierte periphere Lymphozyten der Person B
A+B: periphere Lymphozyten der Person A und B im Verhältnis 1:1 (Gesamtzellzahl wie bei A, B und Bm)
A+Bm: PBLs der Person A und mit MMC inaktivierte PBLs der Person B im Verhältnis 1:1 (Gesamtzellzahl wie bei A, B, Bm und A+B)
As2+B: mit 1×10^{-7} mol/l Methotrexat inkubierte PBLs der Person A mit PBLs der Person B im Verhältnis 1:1 (Gesamtzellzahl wie bei A, B, Bm, As1, A+B und A+Bm)
As2+Bm: mit 1×10^{-7} mol/l Methotrexat inkubierte PBLs der Person A mit inaktivierten PBLs der Person B im Verhältnis 1:1 (Gesamtzellzahl wie bei den Zellreihen A, As2, B, Bm, A+B, A+Bm und As2+B)

MLC mit 1×10^{-7} mol/l Methotrexat am Tag 0

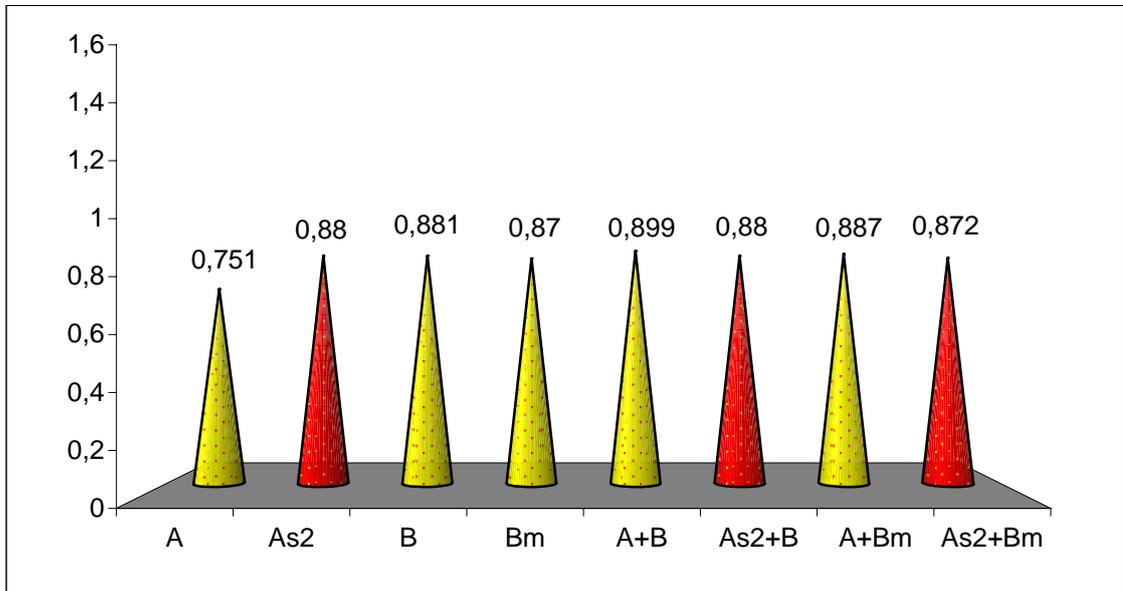


Abb. 23: Dargestellt ist die Auswirkung von Methotrexat in einer Konzentration von 1×10^{-7} mol/l auf die Aktivität der peripheren Lymphozyten der Person A in Mono- und gemischten Zellkulturen am Tag 0

MLC mit 1×10^{-7} mol/l Methotrexat am Tag 6

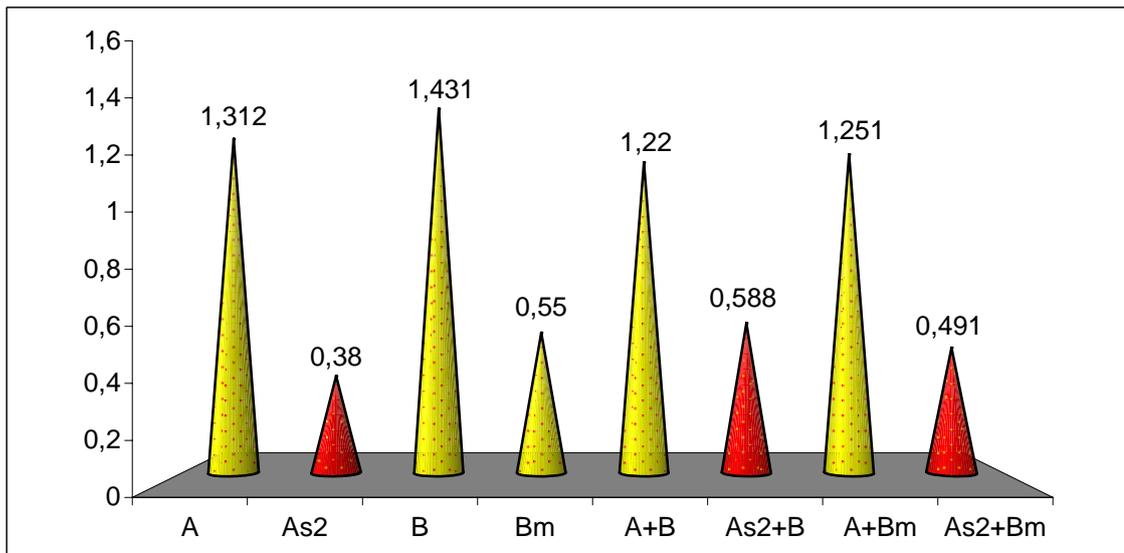


Abb. 24: Darstellung wie in Abb. 23 beschrieben, jedoch nach sechs Tagen Inkubation

3.2.3.3 MLC-Versuch mit Methotrexat (Konzentration 1×10^{-9} mol/l)

3.2.3.3.1 Ergebnisse am Tag 0

Am Tag 0 der Behandlung von PBLs mit 1×10^{-9} mol/l Methotrexat kann kein großer Einfluss auf die Aktivität der Zellen von Person A beobachtet werden. As3 zeigt ein Aktivitätsdefizit von nur 1,5 % gegenüber A.

Der Vergleich der heterogenen Zellkulturen As3+B und As3+Bm mit den jeweiligen homologen Zellreihen A, As3 und Bm ergibt erhöhte Aktivitäten. As3+B zeigt eine Aktivitätserhöhung gegenüber A von 18,1 %, gegenüber As3 von 19,9 % und gegenüber Bm von 1,9 %.

Der Vergleich von As3+Bm mit peripheren Lymphozyten der Person A ohne 1×10^{-9} mol/l Methotrexat und mit Methotrexat (As3) zeigt Mehraktivitäten des MLC-Ansatzes. Gegenüber A zeigt As3+Bm um 16,8 % und gegenüber As3 um 18,5 % erhöhte Aktivitäten.

Beide Zellkulturen, As3+B und As3+Bm, zeigen ein fast identisches Aktivitätsverhalten gegenüber peripheren Lymphozyten der Person B, die nicht mit Mitomycin inaktiviert wurden.

Die direkte Gegenüberstellung dieser Ansätze macht deutlich, dass Methotrexat mit einer Konzentration von 1×10^{-9} mol/l am Tag 0 sowohl bei As3+B als auch bei As3+Bm in Bezug auf ihre nicht unter Substanzeinfluss stehenden Äquivalente (A+B und A+Bm) zu einer minimalen Senkung ihrer PBL-Aktivitäten führt. Für As3+B gegenüber A+B liegt diese Aktivitätsabnahme bei 1,3 % und für As3+Bm im Vergleich zu A+Bm liegt sie bei 1,1 %.

Darüber hinaus zeigt die nicht inaktivierte Zellreihe As3+B gegenüber As3+Bm ein Aktivitätsplus von 1,1 %.

3.2.3.3.2 Ergebnisse am Tag 6

Die Aktivitätssenkung von As3 im Vergleich zu A ohne Methotrexateinfluss steigt am Tag 6 der Behandlung mit 1×10^{-9} mol/l Methotrexat auf 69,5 %.

Bei As3+Bm kommt es zu einer Suppression in Höhe von 63,2 % im Vergleich zu Referenzkultur A, 66,2 % im Vergleich zu nicht inaktivierten Zellen von Person B (B) und 12,1 % im Vergleich zu inaktivierten Zellen von Person B (Bm). Verglichen mit As3 zeigt As3+Bm eine um 20,8 % vermehrte Aktivität. Auch As3+B weist eine Mehraktivität gegenüber As3 um 37,5 % auf. Gegenüber Bm zeigt As3+B einen Aktivitätsgleichstand. Vergleichen wir As3+B mit A und B, können wir eine Aktivitätsabnahme von jeweils 58 % und 66,2 % feststellen.

Die Betrachtung der gemischten Zellkulturen A+B und A+Bm mit und ohne Methotrexat macht erneut eine Verringerung der unter Substanzeinfluss stehenden Aktivitäten deutlich: As3+B zeigt eine um 54,9 % geringere Aktivität als A+B; für As3+Bm liegt diese Aktivitätsabnahme verglichen mit A+Bm bei 60,9 %. Bei

As3+Bm zeigt sich jedoch eine um 12,2 % geringere Aktivität als bei As3+B. Diese Aktivitätssenkung ist auf Inaktivierung von B mit Mitomycin C in As3+Bm zurückzuführen.

Tab. 14: Mittelwerte aus fünf individuellen Proben von den peripheren Lymphozyten der Person A und B (einzeln und in Kombination) in Anwesenheit von Methotrexat in einer Konzentration von 1×10^{-9} mol/l am Tag 0 und Tag 6

	A	As3	B	Bm	A+B	As3+B	A+Bm	As3+Bm
Tag 0	0,751	0,74	0,881	0,87	0,899	0,887	0,877	0,877
Tag 6	1,312	0,4	1,431	0,55	1,22	0,55	1,251	0,483

- A:** periphere Lymphozyten (PBLs) der Testperson A
- As3:** periphere Lymphozyten der Person A inkubiert mit 1×10^{-9} mol/l Methotrexat
- B:** periphere Lymphozyten der Testperson B
- Bm:** mit Mitomycin C inaktivierte periphere Lymphozyten der Person B
- A+B:** periphere Lymphozyten der Person A und B im Verhältnis 1:1 (Gesamtzellzahl wie bei A, B und Bm)
- A+Bm:** PBLs der Person A und mit MMC inaktivierte PBLs der Person B im Verhältnis 1:1 (Gesamtzellzahl wie bei A, B, Bm und A+B)
- As3+B:** mit 1×10^{-9} mol/l Methotrexat inkubierte PBLs der Person A mit PBLs der Person B im Verhältnis 1:1 (Gesamtzellzahl wie bei A, B, Bm, As3 A+B und A+Bm)
- As3+Bm:** mit 1×10^{-9} mol/l Methotrexat inkubierte PBLs der Person A mit inaktivierten PBLs der Person B im Verhältnis 1:1 (Gesamtzellzahl wie bei den Zellreihen A, As3, Bm, A+B, A+Bm und As3+B)

MLC mit 1×10^{-9} mol/l Methotrexat am Tag 0

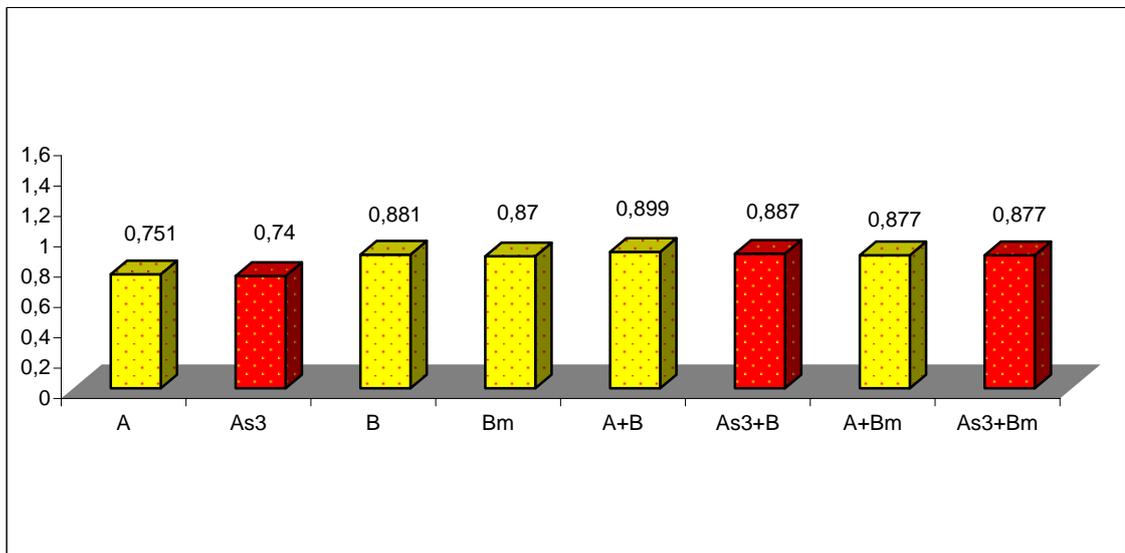


Abb. 25: Gezeigt wird die Aktivität der peripheren Lymphozyten der Person A und B (von B auch in inaktivierter Form Bm) in Mono und Mischkulturen mit 1×10^{-9} mol/l Methotrexat am Tag 0

MLC mit 1×10^{-9} mol/l Methotrexat am Tag 6

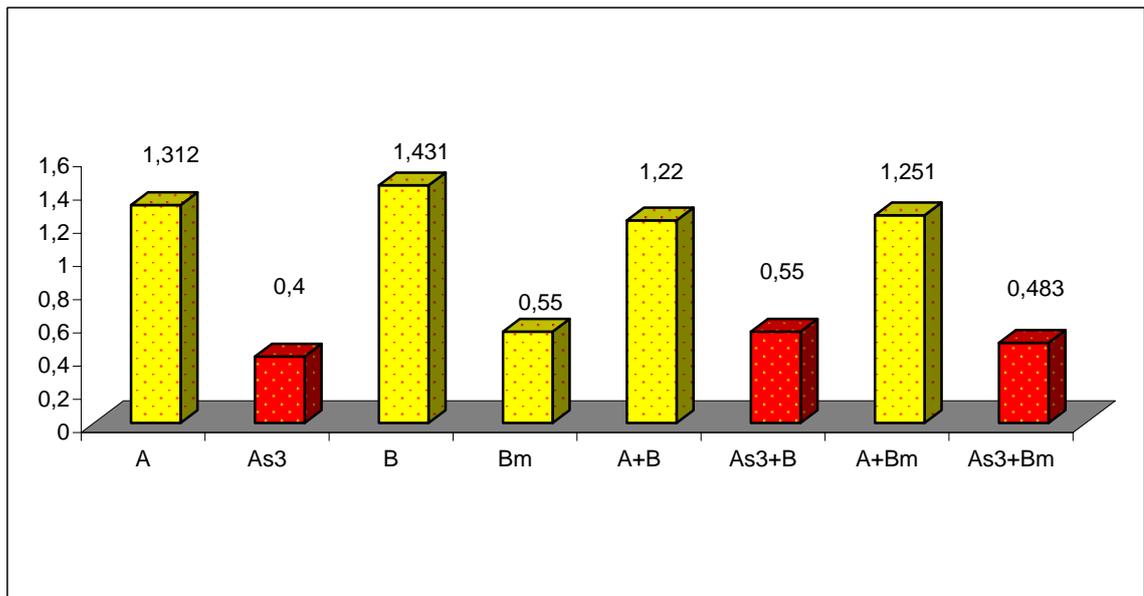


Abb. 26: Dargestellt ist die Veränderung der Zellaktivität unter Einfluss von 1×10^{-9} mol/l Methotrexat gegenüber den unbehandelten Referenzkulturen

3.2.3.4 MLC-Versuch mit Methotrexat (Konzentration 1×10^{-11} mol/l)

3.2.3.4.1 Ergebnisse am Tag 0

Die Behandlung mit 1×10^{-11} mol/l Methotrexat zeigt am Tag 0 keinen Aktivitätsunterschied verglichen mit unbehandelten peripheren Lymphozyten der Person A.

Beim Vergleich von As4+B mit den homogenen Zellreihen kann man erhöhte Aktivitäten beobachten: Gegenüber A ist die Aktivität um 18,6 % erhöht, gegenüber As4 um 18,9 %, gegenüber B um 1,1 % und gegenüber Bm um 2,4 %.

Ähnliche Aktivitätssteigerungen stellen sich auch für As4+Bm ein. Diese betragen in Bezug auf A und As4 16,6 % und 0,6 %, verglichen mit B zeigt As4+Bm jedoch ein Aktivitätsdefizit von 0,6 %.

Am Tag 0 ist eine minimale Aktivitätssenkung für As4+B und As4+B gegenüber A+B bzw. A+Bm zu beobachten.

Das Aktivitätsdefizit von As4+B gegenüber A+B beträgt 0,9 %. As4+Bm zeigt eine verminderte Aktivität in Höhe von 1,2 % gegenüber A+Bm.

Auch hier zeigt As4+Bm eine um 1,7 % verminderte Aktivität im Vergleich zu As4+B.

3.2.3.4.2 Ergebnisse am Tag 6

Auch die Konzentration von 1×10^{-11} mol/l Methotrexat führt zu einer Aktivitätsabnahme von 57,7 % der peripheren Lymphozyten der Zellreihe As4 verglichen mit der unbehandelten Kultur A.

Der Aktivitätsvorsprung von As4+B gegenüber ihren Einzelkomponenten kehrt sich am Tag 6 in eine Suppressionen in Höhe von 55,8 % gegenüber A, 59,5 % gegenüber B, 4,5 % gegenüber As4 und 5,5 % gegenüber Bx um.

Für As4+Bm kommt es auch zu einem Aktivitätsdefizit von 61,1 % im Vergleich zu A, 64,4 % im Vergleich zu B, 8,1 % im Vergleich zu As4 und 7,3 % verglichen mit Bm.

Die Methotrexatbehandlung scheint für die drastisch auftretenden Suppressionen für As4+B im Vergleich der gemischten Zellkultur ohne Substanz Einfluss (A+B) um 52,5 %, für As4+Bm verglichen mit A+Bm um 59,2 % verantwortlich zu sein.

Darüber hinaus zeigt die inaktivierte Zellreihe As4+Bm gegenüber As4+B ein Aktivitätsdefizit von 12,1 % an.

3.2.3.4.3 Zusammenfassung der Ergebnisse von Tag 0 und Tag 6

Die höheren Konzentrationen von Methotrexat (1×10^{-5} mol/l und 1×10^{-7} mol/l) führen bereits am Tag 0 zu einer Suppression der peripheren Lymphozyten von Person A. Mit sinkenden Konzentrationen vermindert sich die suppressive Wirkung von Methotrexat.

As1 zeigt einen um 0,6 %, 1,2 % und 2,7 % höheren Aktivitätsverlust im Vergleich zu As2, As3 und As4. Nach sechs Tagen Inkubation ist dieses Aktivitätsdefizit bei As1 um 3,8 % höher als As2, um 5,3 % höher als As3 und um 17,1 % höher als As4.

In den heterogenen Zellkulturen A+B und A+Bm sinkt das Ausmaß der Suppression proportional mit der Methotrexat-Konzentration. Am Tag 0 zeigt As1+B eine um 0,6 % gegenüber As2+B, um 1,4 % gegenüber As3+B und um 1,8 % gegenüber As4+Bm verminderte Aktivität. Auch A+Bm verzeichnet unter Methotrexateinfluss vergleichbare Ergebnisse wie A+B. Bei As1+Bm ist der Aktivitätsverlust 1,2 % im Vergleich zu As2+Bm, 1,8 % im Vergleich zu As3+Bm und 1,7 % im Vergleich zu As4+Bm höher. Nach sechs Tagen Inkubation ist das Aktivitätsdefizit von As1+B um 5,5 % höher als bei As2+B, um 5,5 % höher als bei As3+B und um 7,1 % höher als bei As3+B. Bei As1+Bm ist die verminderte Aktivität um 5,5 % höher als bei As2+Bm, um 5,4 % höher als bei As3+Bm und um 7,1 % höher als bei As4+Bm.

Tab. 15: Beeinflussung der PBL-Aktivitäten der Person A und B (sowie inaktiviert mit MMC als Bm) allein und kombiniert mit Methotrexat in einer Konzentration von 1×10^{-11} mol/l verglichen mit Referenzwerten ohne Methotrexat am Tag 0 und Tag 6. Dargestellt sind die Mittelwerte aus fünf individuellen Proben.

	A	As4	B	Bm	A+B	As4+B	A+Bm	As4+Bm
Tag 0	0,751	0,749	0,881	0,87	0,899	0,891	0,887	0,876
Tag 6	1,312	0,555	1,431	0,55	1,22	0,58	1,251	0,51

- A:** periphere Lymphozyten (PBLs) der Testperson A
- As4:** periphere Lymphozyten der Person A inkubiert mit 1×10^{-11} mol/l Methotrexat
- B:** periphere Lymphozyten der Testperson B
- Bm:** mit Mitomycin C inaktivierte periphere Lymphozyten der Person B
- A+B:** periphere Lymphozyten der Person A und B im Verhältnis 1:1 (Gesamtzellzahl wie bei A, B und Bm)
- A+Bm:** PBLs der Person A und mit MMC inaktivierte PBLs der Person B im Verhältnis 1:1 (Gesamtzellzahl wie bei A, B, Bm und A+B)
- As4+B:** mit 1×10^{-11} mol/l Methotrexat inkubierte PBLs der Person A mit PBLs der Person B im Verhältnis 1:1 (Gesamtzellzahl wie bei A, B, Bm, As4 A+B und A+Bm)
- As4+Bm:** mit 1×10^{-11} mol/l Methotrexat inkubierte PBLs der Person A mit inaktivierten PBLs der Person B im Verhältnis 1:1 (Gesamtzellzahl wie bei den Zellreihen A, As4, Bm, A+B, A+Bm und As4+B)

MLC mit 1×10^{-11} mol/l Methotrexat am Tag 0

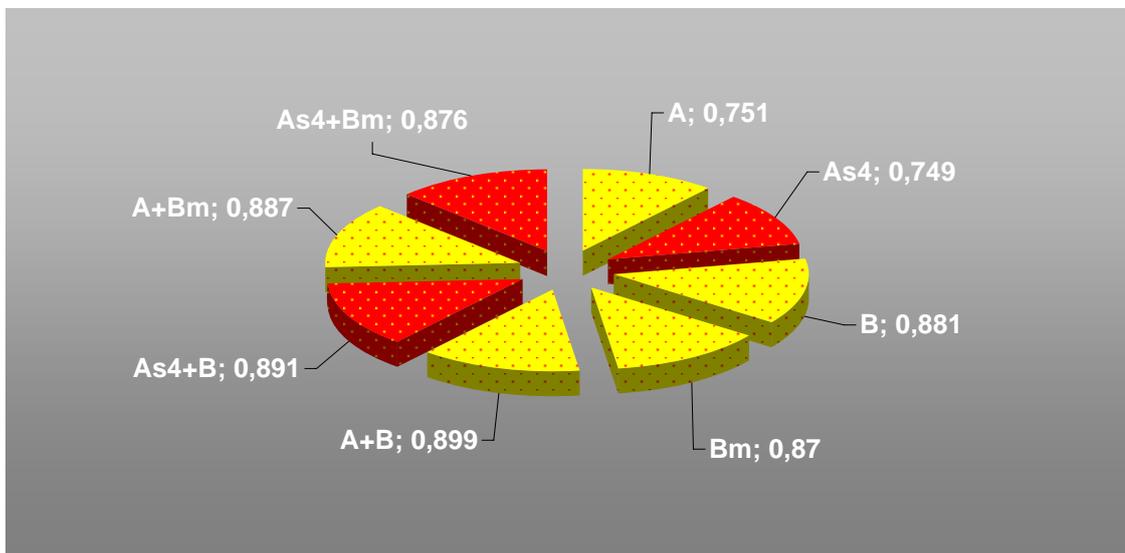


Abb. 27: Gezeigt wird die Beeinflussung der PBL-Aktivitäten der Person A und B (als Einzel und Mischkulturen) durch Zusatz von Methotrexat in einer Konzentration von 1×10^{-11} mol/l verglichen mit Referenzwerte am Tag 0

MLC mit 1×10^{-11} mol/l Methotrexat am Tag 6

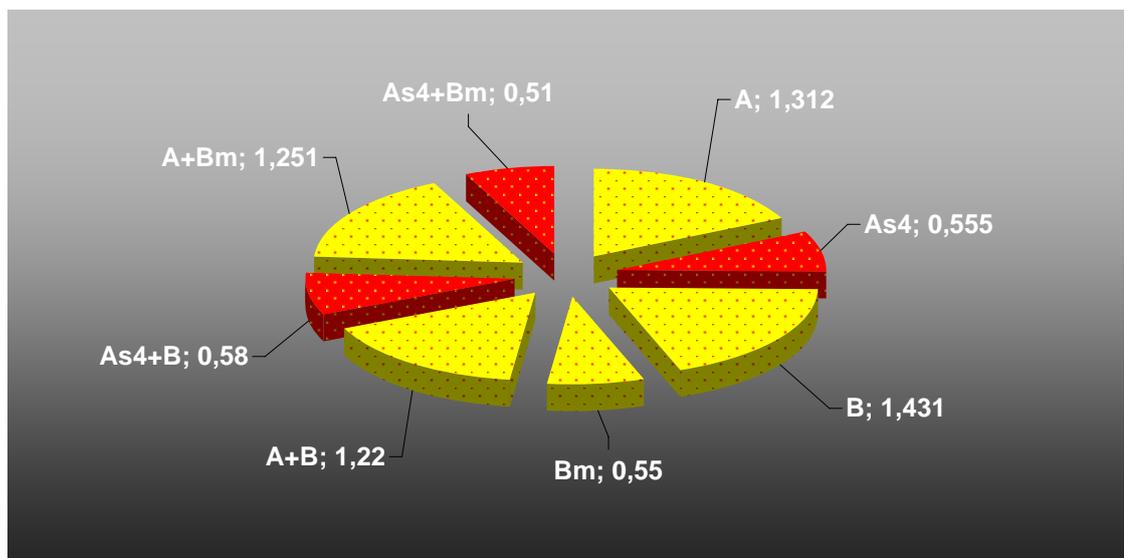


Abb. 28: Graphisch dargestellt ist die immunsuppressive Wirkung von Methotrexat in einer Konzentration von 1×10^{-11} mol/l auf PBLs der Personen A und B in Einzel und Mischkulturen nach sechs Tagen Inkubation

4 Diskussion

Bei den vorliegenden Versuchen handelt es sich um eine In-vitro-Untersuchung in Anlehnung an den klassischen MLC-Test. Dementsprechend unterliegen die Ergebnisse aus diesen Versuchen einigen Einflussfaktoren wie zum Beispiel Apoptose der Zellen, die aufgrund erschwerter Lebensbedingungen der Zellen in In-vitro-Bedingungen über längere Zeiträume zustande kommt. Verschiedene Krankheiten und Therapien gehören auch zu den Faktoren, die das alloproliferative Verhalten einer gemischten Lymphozytenkultur und dadurch auch unsere Versuchsergebnisse beeinflussen können. Über die uns zur Verfügung gestellten Buffy Coats zur Herstellung der benötigten PBMC-Zellsuspensionen waren uns bzgl. Krankheiten und Medikamente keinerlei Informationen bekannt. Deshalb dürfen ein möglicher Einfluss dieser Faktoren ebenso wenig wie die Auswirkung der Haltbarkeit von Kulturmedien und deren Zusammensetzung über längere Inkubationszeiträume auf das Aktivitäts- und Proliferationsverhalten von homogenen und gemischten Zellkulturen nicht unterschätzt werden.

4.1 Diskussion der Ergebnisse der modifizierten MLC - Tests ohne Testsubstanz

4.1.1 Auswertung der Ergebnisse am Tag 0

Bei genauer Betrachtung der Ergebnisse fällt auf, dass die Ausgangsaktivitäten der PBLs der Person A bei MLC-Versuch 1 im Vergleich zu PBLs der Person B in nicht inaktiviertem Zustand um 7,2 % erhöht sind. Bei MLC-Versuch 2 ist die Ausgangsaktivität der Person B in nicht inaktiviertem Zustand im Vergleich zu Person A um 17,3 % erhöht.

In beiden Versuchen kommt es durch die Inaktivierung der PBLs der Person B, vorliegend als B_m am Tag 0, zu keinerlei Aktivitätsunterschied verglichen mit PBLs der Person B in nicht inaktiviertem Zustand. Während im MLC-Versuch 1 fast ein Aktivitätsgleichstand zwischen B und B_m herrscht, sieht man im MLC-Versuch 2 für B_m einen geringeren Aktivitätsverlust um 1,3 % im Vergleich zu B.

Für A+B und A+B_m verglichen mit PBL-Aktivitäten ihrer Teilbestandteile kommt es zu Aktivitätssteigerungen: A+B gegenüber A um 15,9 % im MLC-Versuch 1 und um 19,7 % im MLC-Versuch 2. Wie schon A+B verzeichnet A+B_m gegenüber A in Versuch 1 um 24,3 % und in Versuch 2 um 18,1 % vermehrte Aktivität.

Auch gegenüber B und B_m dominieren Mehraktivitäten und zwar bei A+B im Vergleich zu B um 24,2 % in Versuch 1 und um nur 2,1 % in Versuch 2. Im Vergleich zu B_m zeigt A+B um 24,4 % im ersten Versuch und 3,3 % im zweiten Versuch erhöhte Aktivität.

Ein ähnliches Bild zeichnet sich für A+B_m in beiden Versuchen ab: Die Aktivitätssteigerung von A+B_m ist verglichen mit B und B_m im MLC-Versuch 1 um 32,5 % bzw. 31,5 % höher als im MLC-Versuch 2.

Diese Ergebnisse decken sich mit den Resultaten der Untersuchung von Slavcev über alloreaktive Proliferation von Nabelschnurzellen in primär gemischten Lymphozytenkulturen (119: S. 155-163).

Der Referenzvergleich von A+B zu A+Bm weist im Versuch 1 trotz Inaktivierung der PBLs der Person B mit Mitomycin eine Mehraktivität von 7,3 % auf. Bei MLC-Versuch 2 kommt es für A+Bm schon am Tag 0 zu einer Aktivitätsminderung (zwar deutlich gering) um 1,3 %.

4.1.2 Auswertung der Ergebnisse am Tag 6

Nach sechs Tagen Inkubationszeit kommt es in beiden Versuchen in allen Zellkulturansätzen außer Bm zu einem parallelen Verhalten der PBMC-Aktivitäten. Der typische Verlauf besteht in einem Aktivitätsanstieg.

Das Aktivitätsplus von A gegenüber B in Versuch 1 erhöht sich am Tag 6 auf 44,1 %.

Die erhöhte Ausgangsaktivität von B gegenüber A ist in Versuch 2 um 8 % geringer als am Tag 0.

Des Weiteren scheint die Inaktivierung der PBLs von Person B gegenüber nicht vorbehandelten peripheren Lymphozyten derselben Person nach sechs Tagen zu einer deutlichen Aktivitätssenkung von 120 % in Versuch 1 und 58,1 % in Versuch 2 zu führen.

In Versuch 1 treten wie schon am Tag 0 vermehrte Aktivitäten der gemischten Zellkulturen A+B und A+Bm auf: Es kommt im Vergleich zu Zellreihe B zu einer Mehraktivität, die für A+B bei 39,7 % und für A+Bm bei 31,1 % liegt.

Verglichen mit Bm weisen A+B und A+Bm eine Aktivitätssteigerung um 224,4 % bzw. 204 % auf.

Im Versuch 2 besteht eine Mehraktivität von A+B und A+Bm nur gegenüber Bm und zwar um 121,8 % bei A+B und 127,5 % bei A+Bm.

Auffällig sind nach sechs Tagen Inkubation die deutlichen Suppressionen von gemischten Zellkulturen A+B und A+Bm im Vergleich zu A in Versuch 1 und im Vergleich zu A und B in Versuch 2. Diese Unterdrückung der alloreaktiven Reaktionen in einer gemischten Lymphozytenkultur entspricht dem Ergebnis der Untersuchung von Campo et al. (35: S. 15- 22). In ihrer Studie wird Zink in leicht erhöhten Konzentrationen (gegenüber den physiologischen Konzentrationen) die Fähigkeit zur Immunsuppression auf nichttoxischem Weg zugeschrieben.

Die Aktivität der Zellkulturen A+B und A+Bm sinkt gegenüber A in Versuch 1 um 3,1 % bzw. 9,1 %. Für den MLC-Versuch 2 beträgt die Aktivitätssenkung 7 % bzw. 14,7 % bei A+B gegenüber A und B und 4,6 % bzw. 12,6 % bei A+Bm gegenüber A und B.

Setzt man die einzelnen gemischten Zellkulturen A+B und A+Bm zueinander in Relation, fällt auf, dass die 6,8%ige Aktivitätsminderung von A+B in Versuch 1 sich nach sechs Tagen Inkubation in einen Aktivitätsüberschuss in Höhe von 6,5 % verwandelt.

Im Gegensatz dazu kommt es in Versuch 2 nach anfänglicher Mehraktivität von A+B im Vergleich zu A+Bm zu einer Aktivitätssteigerung von A+Bm gegenüber A+B in Höhe von 2,5 %.

4.2 Diskussion der Ergebnisse der modifizierte MLC-Tests mit Cyclophosphamid in verschiedenen Konzentrationen

4.2.1 Auswertung der Ergebnisse am Tag 0

In den folgenden vier Versuchen zeigen sowohl die homogenen als auch die heterogenen Zellkulturen unter Einfluss von Cyclophosphamid bereits am Tag 0 leichte Suppressionen. Diese in Zusammenhang mit Cyclophosphamid beschriebenen Aktivitätsverluste sinken mit abnehmenden Konzentrationen.

Der Aktivitätsverlust von As1 in Höhe von 4,3 % erniedrigt sich unter Cyclophosphamideinfluss in der Konzentration von 1×10^{-7} mol/l und 1×10^{-11} mol/l vorliegend als As2 und As4 um 2,3 % bzw. 2,4 %. Eine Ausnahme gibt es bei As3, die trotz niedrigerer Konzentration von Cyclophosphamid einen höheren Aktivitätsverlust zeigt. Diese Aktivitätsverringerung beträgt gegenüber As1, As2 und As4 jeweils 10,5 %, 12,5 % bzw. 12,4 %.

Bei den MLC-Ansätzen A+B und A+Bm sind Suppressionen durch die Behandlung mit Cyclophosphamid nur bei einer Konzentration von 1×10^{-5} mol/l zu beobachten.

Unter Einfluss von niedrigeren Cyclophosphamidkonzentrationen sind die heterogenen Zellkulturen einheitlich aktiver als die homogenen Zellreihen.

Eine Ausnahme besteht bei A+Bm unter Einfluss von Cyclophosphamid in einer Konzentration von 1×10^{-11} mol/l, die eine Suppression um 3,2 % bzw. 1,3 % gegenüber A und As4 zeigt.

Eine Gegenüberstellung der MLC-Ansätze zeigt für A+B nur unter Einfluss einer höheren Konzentration von Cyclophosphamid, nämlich 1×10^{-5} mol/l, ein Aktivitätsdefizit um 20 %. Ab einer Konzentration von 1×10^{-7} mol/l ist am Tag 0 kein Aktivitätsunterschied unter Cyclophosphamideinfluss für A+B zu erkennen.

Auf A+Bm hat Cyclophosphamid sowohl in höheren als auch in niedrigeren Konzentrationen eine suppressive Wirkung von 30,6 % bis 14,5 %.

Eine Auswirkung der An- bzw. Abwesenheit inaktivierter PBLs der Person B mit Hilfe von Mitomycin C ist bei dem direkten Vergleich der Zellreihen A+B und A+Bm unter Einfluss verschiedenen Konzentrationen von Cyclophosphamid festzustellen.

Dieser Vergleich zeigt einen Aktivitätsverlust durch Inaktivierung von B im MLC-Ansatz As+B ($As1+B > As1+Bm$ um 7,4 %, $As2+B > As2+Bm$ um 11,1 %, $As3+B > As3+Bm$ um 11,4 % und $As4+B > As4+Bx$ um 19,7 %).

4.2.2 Auswertung der Ergebnisse am Tag 6

Der anfänglich geringe Aktivitätsverlust unter Cyclophosphamideinfluss stehender peripherer Lymphozyten gegenüber naiven PBMCs der Person A erhöht sich nach sechs Tagen Inkubation konzentrationsabhängig. Je höher die Konzentration von Cyclophosphamid ist, desto stärker ist die suppressive Wirkung.

Der stärkste aktivitätssteigernde Effekt auf PBLs der Person A unter Cyclophosphamideinfluss zeigt sich am Tag 6, resultierend aus dem Vergleich mit PBMCs desselben Probanden ohne Cyclophosphamid, unter der Konzentration 1×10^{-7} mol/l in Höhe von 53,6 % gefolgt von 1×10^{-9} mol/l mit 47,8 % sowie 1×10^{-9} mol/l mit 24,9 % und 1×10^{-11} mol/l mit 18,1 %.

Unter Cyclophosphamideinfluss sind die gemischten Zellkulturen As+B und As+Bm aktiver als die homogenen Zellreihen As.

Die höchste Aktivität zeigt As2+B gegenüber As2 in Höhe von 42,9 %.

Gegenüber As3 und As4 (PBLs der Person A unter Einfluss von Cyclophosphamid in einer Konzentration von 1×10^{-7} mol/l und 1×10^{-11} mol/l) zeigt A+B eine Aktivitätssteigerung um jeweils 5,6 %. Ein ähnliches Bild zeichnet sich im A+Bm unter Cyclophosphamideinfluss ab: Der Aktivitätsvorsprung von As+Bm unter Einfluss von Cyclophosphamid in einer Konzentration von 1×10^{-5} mol/l beträgt gegenüber der Einzelkultur As1 unter Substanzeinfluss mit gleicher Konzentration 27,2 %. Mit sinkender Konzentration von Cyclophosphamid sinkt auch das Aktivitätsplus von As+Bm im Vergleich zu As.

Bei einer Cyclophosphamidkonzentration von 1×10^{-11} mol/l wandelt sich der Aktivitätsvorsprung von As4+Bm in ein Aktivitätsdefizit gegenüber As4.

In Anwesenheit von Cyclophosphamid zeigen As+B und As+Bm verglichen mit A, (ohne Substanzeinfluss) Suppressionen von 40,3 % bzw. 41,1 % bei einer Konzentration von 1×10^{-5} mol/l bis 13,5% und 18,7% bei einer Konzentration von 1×10^{-11} mol/l.

Auch auf die bereits ohne Substanzeinfluss gemessenen Mehraktivitäten der gemischten Zellansätze A+B und A+Bx um 39,7 % und 31,1 % im Vergleich zu B hat Cyclophosphamid konzentrationsabhängig einen aktivitätssenkenden Effekt.

Gegenüber Bm zeigen As+B und As+Bm unter Einfluss von verschiedenen Konzentrationen von Cyclophosphamid deutliche Mehraktivitäten. Wie erwartet steigt der Aktivitätsvorsprung mit sinkender Konzentration von Cyclophosphamid von 99,7 % bzw. 97,2 % bis 144,6 % bzw. 129,5 %.

Sowohl die Anwesenheit von Cyclophosphamid als auch die Inaktivierung der PBMCs von Person B mit Mitomycin C führen zu diesen auffälligen Aktivitätsdifferenzen.

Im Vergleich der primären MLC-Ansätze untereinander kommt es bei der Gegenüberstellung unter Substanzeinfluss stehender gemischter Zellkulturen und entsprechender unbeeinflusster primärer MLCs zu deutlichem Aktivitätsabfall unter Cyclophosphamid in allen vier Konzentrationen.

Auch hier führen die höheren Konzentrationen von Cyclophosphamid zu stärkeren Suppressionen. (As1+B < A+B um 38,4 %, As2+B < A+B um 23,2 %, As3+B < A+B um 30,9 %, As4+B < A+B um 29,1 %, As1+Bm < A+Bm um 38,4 %, As2+Bm < A+Bm um 30,1 % und As3+Bx < A+Bx um 24,5 %).

Vergleichen wir As+B und As+Bm direkt, so lässt sich unter der Inaktivierung von B in primären MLC in Anwesenheit von Cyclophosphamid in verschiedenen Konzentrationen ein aktivitätssenkender Effekt verzeichnen.

Dieser aktivitätssenkende Effekt ist nach sechs Tagen Inkubation für As1+B im Vergleich zu As1+Bx nicht so ausgeprägt wie am Tag 0 (As1+B > As1+Bm um 1,4 %). Unter Cyclophosphamidkonzentration in einer Höhe von 1×10^{-7} mol/l ist der Aktivitätsverlust von As2+Bm gegenüber As2+B um 5,9 % höher als am Tag 0. Bei einer Cyclophosphamidkonzentration von 1×10^{-9} mol/l herrscht zwischen As3+B und As3+Bm fast ein Aktivitätsgleichstand. Bei As4+B stellen wir am Tag 6 eine um 6,4 % höhere Aktivität als bei As4+Bm fest.

4.3 Diskussion der Ergebnisse der modifizierten MLC-Tests mit 6-Mercaptopurin in verschiedenen Konzentrationen

4.3.1 Auswertung der Ergebnisse am Tag 0

Am ersten Messtag lassen sich in allen vier modifizierten MLC-Tests mit 6-Mercaptopurin keine Aktivitätssenkungen der PBLs von Person A unter 6-Mercaptopurineinfluss in verschiedenen Konzentrationen (As1, As2, As3 und As4) verglichen mit den jeweiligen Zellkulturen des Person A ohne 6-Mercaptopurin beobachten.

Der Vergleich der primären MLC-Ansätze mit den jeweiligen homogenen Zellkulturen hat in allen vier Versuchreihen unter 6-Mercaptopurin lediglich Mehraktivitäten vorzuweisen (As1+B > A, As1, B und Bm um jeweils 5,4 %, 5,6 %, 12,9 % und 13 %, As2+B > A um 15,8 %, As2+B > As2 um 16,6 %, As2+B > B um 24,1 %, As2+B > Bm um 24,3 %, As3+B > A, As3, B und Bm um jeweils 14,4 %, 15,6 %, 22,7 % und 22,9 %, As4+B > A, As4, B und Bm um jeweils 15,5 %, 16,4 %, 23,8 % und 23,9 %, As+Bm verhält sich ähnlich). Der Vergleich der gemischten Zellkulturen ohne Substanzeeinfluss mit den jeweiligen Einzelbestandteilen zeigt ein ähnliches Bild (A+B > A, B und Bm um jeweils 15,8 %, 24,2 % bzw. 24,4 %, A+Bm verhält sich ähnlich). Somit kann das Phänomen der Mehraktivität der gemischten Zellen hier nicht auf 6-Mercaptopurin zurückgeführt werden.

Die gemischten Zellkulturen verhalten sich zueinander wie folgt: Der Einfluss von Mercaptopurin mit einer Konzentration von 1×10^{-5} mol/l ist im Vergleich As1+B zu A+B als Verringerung der PBL-Aktivität von As1+B um 9 % zu erkennen. Dieser Einfluss scheint bei der Gegenüberstellung von As1+Bm und A+Bm weniger zum Tragen zu kommen. Auch die Wirkung von Mercaptopurin mit niedrigeren Konzentrationen lässt sich auf die heterogenen Zellreihen am Tag 0 kaum nachzuweisen.

Die Inaktivierung von B in gemischten Zellkulturen As+B führt unter Mercaptopurin bei allen vier Konzentrationen am Tag 0 zu keinem Aktivitätsverlust. Im Gegenteil kommt es eher zu einer Mehraktivität von 16,7 % für As1+Bm gegenüber As1+B, 7 % für As2+Bm gegenüber As2+B, 8,3 % für As3+Bm gegenüber As3+B und 7,1 % für As4+Bm gegenüber As4+B.

4.3.2 Auswertung der Ergebnisse am Tag 6

Nach sechs Tagen Inkubation besteht für PBLs der Person A unter Mercaptopurineinfluss, verglichen mit seinem ohne Substanzzusatz angesetzten Äquivalent, ein konzentrationsabhängiges Aktivitätsdefizit seiner PBLs in Höhe von 58,6 % bei einer 6-Mercaptopurinkonzentration von 1×10^{-5} mol/l gefolgt von 59 % bei einer Konzentration von 1×10^{-7} mol/l. Bei niedrigeren Konzentrationen von Mercaptopurin kommt es zu einer Senkung der Suppressionskraft ($As_3 < A$ um 42,9 %, $As_4 < A$ um 41,9 %).

Bereits zwei Aktivitätsdefizite neben zwei Mehraktivitäten lassen sich bei A+B unter Einfluss von allen vier Konzentrationen von 6-Mercaptopurin im Vergleich zu homogenen Zellreihen mit und ohne Substanz antreffen. A+B zeigen unter 6-Mercaptopurin mit einer Konzentration von 1×10^{-5} mol/l (As_1+B) Suppressionen bezüglich PBLs von Person A und Person B ohne Substanzeinfluss in Höhe von 46,2 % bzw. 22,4 %. Bei Konzentrationen von 1×10^{-7} mol/l und 1×10^{-9} mol/l sinkt die suppressive Wirkung von 6-Mercaptopurin in gemischten Zellkulturen um 0,6 % bzw. 4,2 % gegenüber A und um 0,8 % bzw. 6 % gegenüber B. Bei einer Konzentration von 1×10^{-11} mol/l ist das Aktivitätsdefizit von As_4+B gegenüber A und B wieder stärker ($As_4+B < A$ und B um 44,3 % bzw. 20,2 %). Gegenüber A unter Substanzeinfluss d.h. As und Bm treten jedoch immer noch Mehraktivitäten auf.

Bei einer Konzentration von 1×10^{-5} mol/l und 1×10^{-7} mol/l zeigen As_1+B und As_2+B um 29,9 % bzw. 32,7 % Mehraktivitäten gegenüber A unter Substanzeinfluss (As_1 und As_2). Bei einer Konzentration von 1×10^{-9} mol/l sinkt die Mehraktivität von As_3+B gegenüber As_3 auf einen Wert um 2,6 %. Bei noch niedrigeren Konzentrationen von 1×10^{-11} mol/l wandelt sich die Mehraktivität von As_4+B in ein Aktivitätsdefizit um 4,1 %. Im Vergleich zu inaktivierten B zeigt As+B bei einer Konzentration von 1×10^{-5} mol/l um 80 % Aktivitätsüberschuss gefolgt von 82 % bzw. 96 % Mehraktivitäten bei niedrigeren Konzentrationen von 1×10^{-7} mol/l und 1×10^{-9} mol/l.

Die noch am Tag 0 festgestellten Mehraktivitäten von As+Bm gegenüber Bm bleiben nach sechs Tagen Inkubation weiterhin bestehen und erhöhen sich mit sinkenden Konzentrationen von 23 % bzw. 21,9 % bei einer Konzentration von 1×10^{-5} mol/l und 1×10^{-7} mol/l auf 47,1 % bzw. 44,6 % bei einer Konzentration von 1×10^{-9} mol/l und 1×10^{-11} mol/l. Gegenüber allen anderen homogenen Zellkulturen zeigt As+Bm verminderte Aktivitäten. Im Vergleich zu A ohne 6-Mercaptopurineinfluss erniedrigt sich die Suppression von 63,2 % bei einer Konzentration von 1×10^{-5} mol/l auf 56,8 % bei der niedrigsten Konzentration von 6-Mercaptopurin von 1×10^{-11} mol/l. 6-Mercaptopurinzusatz führt bei A

konzentrationsabhängig zu Suppressionen. Durch diese Suppression erniedrigt sich die verminderte Aktivität von As+Bm gegenüber As. Je höher die Konzentration von 6-Mercaptopurin ist, desto niedriger ist das Aktivitätsdefizit von As+Bm gegenüber As (As1+Bm < As1 um 11,2, As2+Bm < As2 um 11,1 %, As3+Bm > As3 um 22,9 % und As4+Bm < As4 um 25,5 %). Bei As+Bm gegenüber Bm führt 6-Mercaptopurin nach sechs Tagen Inkubation zur Umwandlung des Aktivitätsüberschusses ohne Substanzeinfluss (A+Bm > B um 33,3 %) in eine Suppression (As1+Bm < B um 46,9 %, As2+Bm < B um 47,5 %, As3+Bm < B um 36,6 % und As4+Bm < B um 38 %).

Der Vergleich der primären MLC-Ansätze untereinander, d.h. unter Substanzeinfluss stehende zu nicht mit Substanzzusatz versehenen gemischten Zellkulturen, zeigt, dass unter Mercaptopurineinfluss in verschiedenen Konzentrationen deutliche Aktivitätsabnahmen zu sehen sind. Bei einer Konzentration von 1×10^{-5} mol/l beträgt das Aktivitätsdefizit von As1+B und As1+Bm 44,5 % bzw. 59,5 %. Unter Konzentration von 1×10^{-7} mol/l und 1×10^{-9} mol/l kommt es bei As2+B und As3+B gegenüber A+B um 43,9 % bzw. 39,6 %, bei As2+Bm und As3+Bm verglichen mit A+B um jeweils 59,9 % und 51,7 % Aktivitätssenkungen. As4+B und As4+Bm zeigen ein Aktivitätsdefizit um jeweils 42,6 % und 52,5 % gegenüber A+B und A+Bm.

Mit und ohne Mercaptopurinzusatz kommt es durch die Inaktivierung von B im gemischten Zellansatz A+B zu Aktivitätsverlusten. Unter Substanzeinfluss kommt es konzentrationsabhängig zu einer Steigerung des Aktivitätsrückgangs. Je höher die Konzentration ist, desto stärker ist die Suppression: A+Bm < A+B um 6,1 %, As1+B < As1+Bm um 31,5, As2+B < As2+Bm um 33 %, As3+B < As3+Bm um 24,9 %, As4+B < As4+Bm um 22,3 %.

4.4 Diskussion der Ergebnisse der modifizierten MLC-Tests mit Methotrexat in verschiedenen Konzentrationen

4.4.1 Auswertung der Ergebnisse am Tag 0

Unter Methotrexateinfluss lassen sich ähnliche Ergebnisse beobachten wie in mit Cyclophosphamid- und 6-Mercaptopurin behandelten Zellkulturen.

Betrachten wir zunächst das Aktivitätsverhalten der Einzelsuspension As unter Einfluss verschiedener Konzentrationen von Methotrexat (vorliegend als As1, As2, As3 und As4) im Vergleich zur unbehandelten Zellkultur A. Dabei fällt auf, dass die höhere Konzentration von Methotrexat schon am Tag 0 zu Aktivitätsdefiziten führen (As1 < A um 2,7 %, As2 < A um 2,1 % und As3 < A um 1,5 %). Bei einer niedrigeren Konzentration von 1×10^{-11} mol/l herrscht zwischen A mit und ohne Substanz Aktivitätsgleichstand.

Beim Vergleich der Ansätze der primären MLCs As+B und As+Bm mit den jeweils homologen Zellkulturen A, As, B und Bm ergeben sich für die heterogenen Zellreihen leichte Aktivitätsüberschüsse und teilweise Aktivitätsgleichstand

(As1+B > A und As1 um 16,5 % bzw. 19,6 %, As2+B > A und As2 um 17,2 % bzw. 19,7 %, As3+B > A und As3 um 18,1 % bzw. 19,9 % und As4+B > A bzw. As4 um jeweils 18,6 % und 18,9 %). Ohne Methotrexatwirkung sind diese Aktivitätsüberschüsse etwas höher (A+B > A um 19,7 %, A+B > As1 um 22,9 %, A+B > As2 um 22,3 %, A+B > As3 um 21,5 % und A+B > As4 um 20 %).

Gegenüber B und Bm zeigt As+B unter Methotrexateinfluss mit einer Konzentration von 1×10^{-5} mol/l, 1×10^{-7} mol/l und 1×10^{-9} mol/l fast Aktivitätsgleichstand, bei niedrigerer Konzentration von 1×10^{-11} mol/l leichte Mehraktivitäten (As4+B > As4 um 1,1 %, As4+B > Bm um 2,4 %). Ein ähnlicher, substanzbedingter, suppressiver Effekt ist auch bei As+Bm zu sehen (As1+Bm > A und As1 um 16,2 % bzw. 19,4 %, As2+Bm > A und As2 um 16,1 % bzw. 18,6 %, As3+Bm > A und As3 um 16,8 % bzw. 18,5 % und As4+Bm > A und As4 um 16,6 % bzw. 16,9 %). Gegenüber B und Bm zeigt As+Bm bei allen vier Konzentrationen von Methotrexat fast das gleiche Aktivitätsverhalten.

Am Tag 0 zeigen die PBLs der gemischten Zellkulturen unter Substanzeinfluss vorliegend als As+B und As+Bm im Vergleich zu PBMC-Aktivitäten der nicht unter Substanzeinfluss stehenden Referenzkulturen, d.h. A+B und A+Bm, Aktivitätssenkungen, die mit abnehmender Konzentration der Substanz schwächer werden (As1+B < A+B um 2,7 %, As1+Bm < A+Bx um 1,6 %, As2+B < A+B um 2,1 %, As2+Bm < A+Bm um 1,7 %, As3+B < A+B um 1,3 %, As3+Bm ~ A+Bm, As4+B < A+B um 0,9 % und As4+Bm < A+Bm um 1,2 %).

Eine polymorphe Aktivitätsentwicklung ist beim Vergleich As+B und As+Bm unter Einfluss verschiedener Konzentrationen von Methotrexat am Tag 0 zu sehen. Während sich bei Konzentrationen von 1×10^{-5} mol/l und 1×10^{-7} mol/l das Aktivitätsverhalten identisch verhält, sieht man bei Konzentrationen von 1×10^{-9} mol/l und 1×10^{-11} mol/l eine leichte Mehraktivität um 1,1 % bzw. 1,7 % zu Gunsten von As4+B im Vergleich zu As4+Bm.

4.4.2 Auswertung der Ergebnisse am Tag 6

Nach sechs Tagen Inkubation sind ausgeprägte substanzinduzierte Suppressionen in Abhängigkeit von der Konzentration zu beobachten.

Unter höherer Konzentration von Methotrexat (1×10^{-5} mol/l und 1×10^{-7} mol/l) gehen für As1 und As2 deutliche Aktivitätsverluste von 74,8 % und 71 % aus dem Vergleich mit dem entsprechenden nicht unter Substanzeinfluss stehenden Äquivalent, d.h. A, hervor.

Die aktivitätssenkende Kraft von Methotrexat sinkt bei Konzentrationen von 1×10^{-9} mol/l und 1×10^{-11} mol/l (As3 < A um 69,5 % und As4 < A um 57,7 %).

Ein substanzbedingter suppressiver Effekt resultiert aus dem Vergleich der heterogenen Zellkulturen As+B und As+Bm mit den jeweiligen homogenen Zellreihen (As1+B < A und B um 60,3 % bzw. 70,5 %, As2+B < A und B um jeweils 55,2 % und 58,9 %, As3+B < A und B um 58,1 % bzw. 61,6 % und As4+B < A bzw. B um jeweils 55,8 % und 59,5 %). Zu einer ähnlichen Aktivitätssenkung kommt es bei As+Bm gegenüber den Referenzkulturen A und B (As1+Bm < A und

B um 67,8 % bzw. 70,5, As₂+Bm < A und B um 63,2 % bzw. 70,5 %, As₃+Bm < A und B um 63,2 % bzw. 66,2 % und As₄+Bm < A und B um 61,1 % bzw. 64,4 %).

Im Vergleich zu Lymphozyten der Person A unter Substanzeinfluss, vorliegend als As, zeigt As+B einheitlich Mehraktivitäten. Das Ausmaß der substanzbedingten Mehraktivitäten nimmt entsprechend der genannten Methotrexatkonzentrationen ab (As₁+B > As₁ um 57,9 %, As₂+B > As₂ um 54,7 %, As₃+B > As₃ um 37,5 % und As₄+B > As₄ um 4,5 %). Identische Mehraktivitäten sind auch bei As+Bm gegenüber As zu verzeichnen (As₁+Bm > As₁ um 27,9 %, As₂+Bm > As₂ um 29,2 %, As₃+Bm > As₃ um 20,8 %). Methotrexat mit einer Konzentration von 1×10^{-11} mol/l führt nach sechs Tagen Inkubation zur Umwandlung der am Tag 0 bestehenden Mehraktivität für As₄+Bm gegenüber As₄ in eine Suppressionen um 8,1 %.

Die gemischte Zellsuspension As+B zeigt gegenüber Bm in Abhängigkeit der Methotrexatkonzentration eine polymorphe Aktivitätsentwicklung. Bei einer Konzentration von 1×10^{-5} mol/l und 1×10^{-7} mol/l kommt es zu einer Zunahme der Aktivität um 5,3 % bzw. 6,9 %.

Unter Methotrexatkonzentration von 1×10^{-9} mol/l herrscht ein Aktivitätsgleichstand. Die niedrigste Konzentration von Methotrexat in dieser Versuchsreihe (1×10^{-11} mol/l) führt bei As₄+B verglichen mit B inaktiviert zu einer Aktivitätssteigerung um 5,5 %.

Bei As+Bm kommt es im Vergleich zu inaktivierten peripheren Lymphozyten der Person B, vorliegend als Bm, nach sechs Tagen Inkubation zu mehr oder weniger starken Aktivitätseinbußen (As₁+Bm < Bm um 23,3 %, As₂+Bm < Bm um 10,7 %, As₃+Bm < Bx um 12,2 % und As₄+Bm < Bm um 7,3 %).

Der bereits am Tag 0 beschriebene Abfall der PBL-Aktivitäten dem gemischten Zellreihen As+B unter Methotrexateinfluss steigt gegenüber derselben Kultur ohne Substanzeinfluss, d.h. A+B, nach sechs Tagen Inkubation stark an (As₁+B < A+B um 57,3 %, As₂+B < A+B um 51,8 %, As₃+B < A+B um 54,9 % und As₄+B < A+B um 52,5 %). Parallel zur Aktivitätsentwicklung der Zellkulturen As+B gegenüber A+B zeigen die gemischten Zellreihen As+Bm im Vergleich zu Referenzkultur A+Bm zunehmenden Aktivitätsabfall (As₁+Bm < A+Bm um 66,3 %, As₂+Bm > A+Bm um 60,8 %, As₃+Bm < A+Bm um 61,4 % und As₄+Bm < A+Bm um 59,2 %).

Abschließend analysieren wir die Aktivitätsentwicklung des primären MLC-Ansatzes As+B im Vergleich zu As+Bm und ermitteln den Einfluss verschiedener Konzentrationen von Methotrexat auf dessen Verhalten.

Der minimale Aktivitätsüberschuss von A+B gegenüber A+Bm ohne Substanzeinfluss verwandelt sich unter Methotrexateinfluss konzentrationsabhängig in einen Aktivitätsrückgang. Bei einer Konzentration von 1×10^{-5} mol/l beträgt das Aktivitätsdefizit etwa 23,4 %. Unter einer Methotrexatkonzentration von 1×10^{-7} mol/l kommt es zu einer Aktivitätssenkung in Höhe von 19,8 %. Bei Konzentrationen von 1×10^{-9} mol/l und 1×10^{-11} mol/l zeigen As₃+B bzw. As₄+B gegenüber den Referenzkulturen As₃+Bm und As₄+Bm um jeweils 13,9 % und 13,8 % verminderte Aktivitäten.

5 Zusammenfassung

In der vorliegenden Doktorarbeit wurde der Einfluss einiger Vertreter klinisch eingesetzter Zytostatika und derer Konzentration auf Immunzellen, genauer gesagt PBMCs untersucht. Einerseits sollte herausgefunden werden, ob die untersuchten Zytostatika-Vertreter auch bei niedrigen und sehr niedrigen Konzentrationen immunsuppressiv wirken; andererseits sollte getestet werden, ob einige zytotoxische Substanzen bei niedrigen/subtoxischen Konzentrationen immunmodulierend, mehr noch, immunstimulierend wirken. Der letztgenannte Effekt konnte zumindest bei jenen Zytostatika-Vertretern, deren intrazelluläre Umwandlung über semichinonring-haltige Intermediate verläuft und somit zur lokalen Bildung von Th1/Tc1-fördernden ROS-Repräsentanten führt, nicht ausgeschlossen werden. Die beobachtete immunsuppressive Wirkung aller getesteter Chemotherapeutika ist eine angestrebte Eigenschaft z.B. bei der in vivo Bekämpfung von autoaggressiven T-Zellen bei Autoimmunerkrankungen sowie bei der Unterdrückung der alloaggressiven T (CTL)-Subklone des Empfängers bei Organtransplantationen bzw. des Spenders bei allogenen Knochenmarktransplantationen. Unerwünscht dagegen ist die zytostatika-induzierte Immunsuppression bei Tumorpatienten. Das höchste Ziel jeder Tumortherapie ist bekanntlich eine möglichst selektive Abtötung von malignen Zellen unter Verschonung des gesunden Gewebes. Leider konnte dieses Ziel bei den bisher klinisch eingeführten Therapieverfahren nicht erreicht werden. Eine der Hauptnebenwirkungen der klinischen Chemo- und Radiotherapie ist die Immunsuppression, die für die verzögerte Immunrestitution und hiermit indirekt für die spätere Rezidiv- und/oder Metastasenbildung (mit)verantwortlich ist. Einige, in der neuesten Zeit eingeführten immuntherapeutischen Verfahren zeigen zwar eine höhere Selektivität und hiermit eine reduzierte Toxizität, sind aber eher als experimentelle, noch nicht routinemäßig eingeführte Therapien zu bezeichnen. Oft werden sie in Kombination mit Chemo(radio)therapie angewandt und sollen, als eine Art adjuvante Nachbehandlung helfen, künftige Rezidive zu verhindern oder zumindest zu verzögern. Beispiele solcher Immuntherapien sind (a) Behandlungen, die auf tumor-spezifischen Antikörpern (oder Immuntoxinen) basieren und (b) verschiedene Formen der zellulären/adaptiven Therapie. Zur letztgenannten Zelltherapie gehört die Behandlung mit LAK- und TIL-Zellen sowie DLI/DLT. Die Tumorstoffe basieren meist auf tumorpeptid-pulsierten dendritischen Zellen. Die neueste "targeted therapy" z.B. mit Glivec oder Avastin versucht, in intrazelluläre Signalwege einzugreifen. Während der immunsuppressive Effekt getesteter Zytostatika selbst bei niedrigsten Konzentrationen bestätigt werden konnte, ließ sich ein potentieller immunmodulatorischer Effekt niedrigdosierter Chemotherapeutika experimentell nicht nachweisen. Ein möglicher Grund könnte die frühzeitige Hemmung der NFkB/NFAT-vermittelten Cytokin (IL2)-Sekretion durch die gleichzeitig stimulierte Häm-Oxygenase sein, wobei beide Effekte, die NFkB/NFAT-Stimulierung und die HO-1-Induktion auf die zytostatikum-bedingte intrazelluläre Bildung von ROS-Vertretern Superoxid und Peroxid sowie das nach der Haber-Weiss-Reaktion entstehende Hydroxyl-Radikal zurückzuführen sind.

6 Literaturverzeichnis

- 1 Aarbakke J., Janka-Scaub G., Elion G. B.
Thiopurine biology and pharmacology
Trends Pharmacol Sci (1997), S. 3 - 7
- 2 Abul K. Abbas, Andrew H. Lichtman
Cellular and molecular immunology
Fifth Edition, Updated Edition, Elsevier Saunders
Philadelphia (2005): S. 371-373
- 3 Abul K. Abbas, Andrew H. Lichtman
Cellular and molecular immunology
Fifth Edition, Updated Edition, Elsevier Saunders
Philadelphia (2005): S. 375-377
- 4 Abul K. Abbas, Lichtman A.H., Pober, J.S.
Cellular and molecular immunology
Fifth Edition, Updated Edition, Elsevier Saunders
Philadelphia (2005): S.123-124
- 5 Abul K. Abbas, Lichtman A.H., Pober J.S.
Cell and tissues of the immune system
Cellular and molecular immunologie
Abbas, A.K., Lichtman, A.H., Pober, J.S. (Ed), W.B.Saunders Company,
Philadelphia, (1994), 2nd edition, 14 - 30
- 6 Abul K. Abbas, Lichtman A.H., Pober J.S.
Regulation of immune responses
Cellular and molecular immunologie
Abbas, A.K., Lichtman, A.H., Pober, J.S. (Ed), W.B.Saunders Company
Philadelphia, (1994), 2nd edition, 205 - 221
- 7 Abelhoff M. D., Armitage J. O., Lichter, A.S., Niederhuber. J. E.
(eds.): Clinical oncology. 2nd ed. Churchill Livingstone, New York 2000
- 8 Aichele P., Bachmann MF., Hengartner H., Zinkernagel RM.
Immunopathology or organ-specific autoimmunity as a consequence of virus
infection. Immunol Rev (1996): 152: 21-45
- 9 Aktories, Förstemann, Hofmann, Starke
Pharmakotherapie der Entzündung und des Immunsystem
Allgemeine und spezielle Pharmakologie und Toxikologie
9. Auflage, 16 (2005): 363-399

- 10 Aktories, Förstemann, Hofmann, Starke
Mittel zur Behandlung von Tumoren – Tumorchemotherapie
Allgemeine und spezielle Pharmakologie und Toxikologie
9. Auflage, 37 (2005): 921-925
- 11 Aktories, Förstemann, Hofmann, Starke
Mittel zur Behandlung von Tumoren – Tumorchemotherapie
Allgemeine und spezielle Pharmakologie und Toxikologie
9. Auflage, 37 (2005): 925-930
- 12 Aktories, Förstemann, Hofmann, Starke
Mittel zur Behandlung von Tumoren – Tumorchemotherapie
Allgemeine und spezielle Pharmakologie und Toxikologie
9. Auflage, 37 (2005): 930-937
- 13 Aktories, Förstemann, Hofmann, Starke
Mittel zur Behandlung von Tumoren – Tumorchemotherapie
Allgemeine und spezielle Pharmakologie und Toxikologie
9. Auflage, 38 (2005): 1061-1062
- 14 Ascher N.L., Hoffman, R., Hanto, D., Simmons, R.
Cellular basis of allograft rejection
Immunol. Rev. 77 (1984): 217-232
- 15 Auchincloss H. Jr., Sykes, M., Sachs, D.H.
Transplantation immunology
Fundamental immunology, Paul, W.E. (8. Ed.)
Lippincott-Raven Publishers,
Philadelphia, New York, 1999, 4th Eddition, 1190
- 16 Auchincloss H. Jr., Sykes M., Sachs, D.H.
Transplantation immunology
Fundamental immunology, Paul, W.E. (8. Ed.)
Lippincott-Raven Publishers,
Philadelphia, New York, 1999, 4th Eddition, 1194
- 17 Auchincloss H. Jr., Sykes, M., Sachs, D.H.
Transplantation immunology
Fundamental immunology, Paul, W.E. (8. Ed.)
Lippincott-Raven Publishers,
Philadelphia, New York, 1999, 4th Eddition, 1202

- 18 Auchincloss H. Hr., Sykes M., Sachs D.H.
Transplantation immunology
Fundamental immunology, Paul, W.E. (8. Ed.)
Lippincott-Raven Publishers
Philadelphia, New York, 1999, 4th Eddition, 1214-1216
- 19 Bach, F., Hirschhorn, K.
Lymphocyte interaction a potential histocompatibility test in Vitro
Science 143 (1964): 813-814
- 20 Bach, F., Voynow, N.K.
One-way-stimulation in mixed-lymphocyte cultures
Science 153 (1966): 545-547
- 21 Bach JF.
Organ-specific autoimmunity. Immunol Today 16 (1995): 353-355
- 22 Baldwin WM., CP Larsen, and LR Fairchild
Innate immune responses to transplants: a significant variable with cadaver
donor. Immunity 14 (2001): 369 - 376
- 23 Barnes P.J.
Anti-inflammatory actions of glucocorticoides: mole mecanismus.
(Clin Sci Colch) 94 (1998): 557-572
- 24 Barrett AJ., van Rhee F. Graft-versus-leukaemia
Baillieres Clin Haematol 10 (1997): 337-355
- 25 Barrett, A.J., Malkovska, V.
The graft-versus leukaemia effect
Curr. Opin. Oncol. (1996): 89-95
- 26 Berzofsky JA., M. Terabe, S. Oh, IM. Belyakov, JD. Ahlers, JE Janik, and JC.
Morris.
Progress on new vaccine stratigies for the immunotherapie and prevention of
cancer. Journal of Clinical Investigation 113 (2004): 1515 - 1525
- 27 Benichou G., Takizawa PA., Oslon CA., McMillan M., Sercarz EE.
Donor major histocompatibility complex (MHC) peptides are presented by
recipient MHC molecules during graft rejection.
J Exp Med 175 (1992): 305 - 308
- 28 Boehringer Mannheim GmbH:
Cell proliferation reagent WST-1
Cat. No. 1 644 807, 1997, Mannheim: 1- 4

- 29 Blanas E., Davey GM., Carbone FR., Healt WR.
A bone marrow-derived APC in the gut-associated lymphoid tissue captures oral antigens and presents them to both CD4+ and CD8+ T cells
Immunol 164 (2000): 2890-2896
- 30 Bleakley M., and S.R. Riddell.
Molecules and mechanismus of the graft-versus-leukaemia effect. *Nature Reviews Cancer* 4 (2004): 371 - 380
- 31 Boyle, F.T., Costello, G. F., Cancer therapy.
Amove to the molecular Level
Chemical Society Reviews 27 (1998): 251-261
- 32 Boyum, A.
Separation of leukocytes from blood and bone marrow
Scand. J. Clin. Lab. Invest. 21 (Supple 97), 1968: 77
- 33 Bradley, J.A., Bolton, E.M.
The T-cell requirements for allograft rejection
Transplant. Rev. 6 (1992): 115-129
- 34 Callan MF., Fazou C., Yang H., Rostrom T., Poon K., Hatton C., McMichael AJ. CD8 (+) T-cell selection, function, and deat in the primary immune response in vivo. *J Clin Invest* 106 (2000): 1251-1261
- 35 Campo, C.A., Wellinghausen, N., Faber, C., Fischer, A., Rink,L.
Zinc inhibits the mixed lymphocyte culture.
Biol. Trace Elem. Res. 79 (1) (2001): 15-22
- 36 Carosella E. D., Rouas-Freiss N., Paul P., Dauset J.
HLA-G: a tolerance moleculare from the major histocompatibility complex
Immunol. Today 20 (1999): 60 - 62
- 37 Cascalho M., and JL Platt. Xenotransplantation and other means of organ replacement. *Nature Reviews Immunology* 1 (2001): 154 - 160
- 38 Cecka, J.M., Terasaki, P.I. (Eds.)
Clinical transplants 1995
Los Angles: UCLA Tissue Typing Laboratory, 1995
- 39 C. A. Janeway, Paul Travers, Mark Walport, Mark Shlomchik
Immunologie, 5. Auflage. Heidelberg; Berlin:
Spektrum, Akad. Verl., 2002, 3-16

- 40 C. A. Janeway, Paul Travers, Mark Walport, Mark Shlomchik
Immunologie, 5. Auflage. Heidelberg; Berlin:
Spektrum, Akad. Verl., (2002): 167-179
- 41 C. A. Janeway, Paul Travers, Mark Walport, Mark Shlomchik
Immunologie, 5. Auflage. Heidelberg; Berlin:
Spektrum, Akad. Verl., (2002): 180-194
- 42 C. A. Janeway, Paul Travers, Mark Walport, Mark Shlomchik
Immunologie, 5. Auflage. Heidelberg; Berlin:
Spektrum, Akad. Verl., 2002, 318-362
- 43 C. A. Janeway, Paul Travers, Mark Walport, Mark Shlomchik
Immunologie, 5. Auflage. Heidelberg; Berlin:
Spektrum, Akad. Verl., 2002, 560-569
- 44 C. A. Janeway, Paul Travers, Mark Walport, Mark Shlomchik
Immunologie, 5. Auflage. Heidelberg; Berlin:
Spektrum, Akad. Verl., 2002, 537-586
- 45 C. A. Janeway, Paul Travers, Mark Walport, Mark Shlomchik
Immunologie, 5. Auflage. Heidelberg; Berlin:
Spektrum, Akad. Verl., 2002, 593-606
- 46 C. A. Janeway, Paul Travers, Mark Walport, Mark Shlomchik
Immunologie, 5. Auflage. Heidelberg; Berlin:
Spektrum, Akad. Verl., 2002, 640-643
- 47 C. A. Janeway, Paul Travers, Mark Walport, Mark Shlomchik
Immunologie, 5. Auflage. Heidelberg; Berlin:
Spektrum, Akad. Verl., 2002, 679-643
- 48 Cobbold SP, Qin S., Leong Ly., Martin G., Waldmann H.
Reprogramming in the immune system For Peipheral Tolerance With CD4 and
CD8 Monoclonal Antibodies, Immunol Rev 129 (1992): 165 – 201
- 49 Collins, R.H.Jr., Rogers, Z.R., Bennett, M., Kumar, V., Nikein, A., Fay, J.W.
Hematologic relapse of chronic myelogenous Leukemia following allogeneic
bone marrow transplantation: apparent graft-versus-leukemia effect following
abrupt discontinuation of immunosuppression.
Bone Marrow Transplant 10 (1992): 391-395
- 50 Cosio, F. G., Pelletier, R.P., Falkenhain, M.E., Henry ML., Ferguson RM.
Impact of acute rejection and early allograft function on renal allograft
survival.
Transplantation 63 (1997): 1611-1615

- 51 Coulie P.G., T. Hanagiri, and M. Takenoyama.
From tumor antigens to Immunotherapy. *International Journal of Clinical Oncology* (2001): 163 - 170
- 52 Dazzi F., Goldman J.,
Donor lymphocyte infusion. *Curr Opin Hematol* 6 (1999): 394-399
- 53 De Bueger, M., Bakker, A., van Rood, J.J., Van der Woude F.
Tissue distribution of minor histocompatibility antigens
Immunol. 149 (1992): 1788-1794
- 54 Di Nicola, M., Carlo-Stella, C., Magni, M., Milanese, M., Longoni, P.D.,
Matteucci, P., Grisanti, S., Gianni, A.M.
Human bone marrow stromal cells suppress T-lymphocyte proliferation induced
by cellular or non-specific mitogenic stimuli
Blood 99 (10) (2002): 3838-3843
- 55 Dranoff G.
Cytokines in cancer pathogenesis and cancer therapy
Nature Reviews cancer 3, 2004, 11-22
- 56 Doyle, H.R., Marino, I.R., Morelli, F., Doria C., Martell J.
Assessing risk in liver transplantation: special reference to the significance of a
positive cytotoxic crossmatch
Ann. Surg. 224 (1996): 168-177
- 57 Dozmorov, I., Miller, R.A.
In vitro production of antigen-specific T cells from unprimed mice: role of
dexamethason and anti-IL-10 antibodies.
Cell. Immunol. 178 (2) (1997): 187-196
- 58 Dupont, B., Braun, D.W. Jr Yunis, E. J., Carpenter, C.B.
HLA-D by cellular typing
Histocompatibility testing
Terasaki, P.I. (Ed.), Springer-Verlag, Berlin, (1980): 289-299
- 59 Eduard Burgis
Intensivkurs Allgemein- und Spezielle Pharmakologie
Urban & Fischer bei Elsevier (2006): 570-581
- 60 Ferguson TA.
Griffith TS A vision of cell death: insights into immune privilege.
Immunol Rev 156 (1997): 167-184

- 61 Flowers ME., Kansu E., Sullivan KM.
Pathophysiology and treatment of graft-versus-host disease
Hematol Oncol Clin North Am 13 (1999): 1091-1112
- 62 Fritz H. Kayser, Kurt A. Bienz, Johannes Eckert, Rol FM. Zinkernagel
Medizinische Mikrobiologie 10. komplett überarbeitete Auflage, Thieme
2001: 47-53
- 63 Fritz H. Kayser, Kurt A. Bienz, Johannes Eckert, Rol FM. Zinkernagel
Medizinische Mikrobiologie 10. komplett überarbeitete Auflage, Thieme
Zürich im sommer 2001: 121-126
- 64 Fulcher DA., Basten A.
B-cell activation versus tolerance the central role of immunoglobulin receptor
engagement and T-cell help. Int Rev Immunol 15(1997): 33-52
- 65 Gaur LK., Nepom GT.
Ancestral major histocompatibility complex DRB genes beget conserved
patterns of localized polymorphism.
Proc Natl Acad Sci USA 93 (1996): 5380-5383
- 66 Gibson, T.
Zoografting: a curious chapter in the history of plastic surgery
Br. J. Plast. Surg. 8 (1955): 234
- 67 Gibson, T., Medawar, P.B.
The fate of skin homografts in man
J. Anat. 77 (1943): 299
- 68 Gilboa E.
The makings of tumor rejection antigen
Immunity 11 (1999): 263-270
- 69 Gould DS., and H Auchincloss Jr.
Direct and indirect recognition: the role of MHC antigens in graft rejection
Immunology Today 20 (1999): 77- 82
- 70 Goulmy E., Schipper R., Pool J., Blokland E., Flakenburg JH., Vossen J.
Grathwohl A., Vogelsang GB., van Houwelingen HC., van Rood JJ.
Mismatches of minor histocompatibility antigens between HLA-identical
donors and recipients and the development of graft-versus-host disease after
bone marrow transplantation. N Engl J Med 334 (1996): 281-285
- 71 Gowans JL.
The Lymphocyte – a disgraceful gap in medical knowledge,
Immunol Today 17 (1996): 288-291

- 72 Hammer, A., Hammer, K.
Wärmelehre-Molekulare Größen.
Physikalische Formeln und Tabellen
Hammer, A., Hammer, k. (Hrsg.), J. Lindauer Verlag (Schaefer)
München, 5. Auflage, 1989, 32
- 73 Hansen, J.A., Mickelson, E.M., Beatty, P.G., Thomas, E.D.
Clinical bone marrow transplantation: donor selection and recipient
monitoring. Manual of clinical laboratory immunology
American Society for Microbiology
Washington D.C., 3rd Edition, 1986, 892-900
- 74 Hardman, J. G., Limbird, L., Gilman, A. G. (eds.): Goodman & Gilman,
Pharmacological Basis of Therapeutics, McGraw-Hill, London 2001
- 75 Heeger Ps.
T-cell allorecognition and transplant rejection: a summary and update
American Journal of Transplantation 3 (2003): 525-533
- 76 Hildebrandt, H., Engst, R., Husen – Weiss, E., Pätzold, C., Schick, K.
Klinsches Wörterbuch
Pschyrembel, W. (Hrsg.), de Gruyter Berlin,
New York, 257., neubearb. Auflage (1994): 844
- 77 Honey K. Cobbold SP., Waldmann H.
Dominant regulation: a common mechanism of monoclonal antibodies
Immunol Rev 129 (1999): 165 - 201
- 78 Hume, D.M., Merrill, J.P., Miller, B.F., Thorn, G.W.
Experience with renal homotransplantations in the human: report of 9 cases
J. Clin. Invest. 34 (1955): 327-382
- 79 Ihle JN.
Cytokine receptor signalling. Nature 377 (1995): 591-594
- 80 Janeway CA, Bottomly K.
Signals and signs for lymphocyte responses. Cell 76 (1994): 275-285
- 81 Jiang S., and RI.
Lechler Regulatory T-cells in the control of transplantation tolerance and
autoimmunity. American Journal of Transplantation 3 (2003): 516-524
- 82 Kaever V., Szamel M.
Immunsuppressive agent.
Encyclopedie reference of molecular pharmacology
Springer, Heidelberg (2003): 482-487

- 83 Kaina B., Christmann M.
DNA repair in resistance to alkylating anticancer drugs. *Int. j. Clin. Pharm. Ther.* 40 (2002): 354-367
- 84 King C., Sarvetnick N.
Organ-specific autoimmunity. *Curr Opin Immunol* 9 (1997): 863-871
- 85 Lafferty KJ.
A contemporary view of transplantation tolerance: an immunologist's perspective. *Clin Transplant* 8 (1994): 181-187
- 86 Lechler R., Gallagher RB., Auchincloss H.
Future challenges in transplantation. *Immunol Today* 12 (1991): 214-216
- 87 Lee RS., Auchincloss H. Jr.
Mechanismus of tolerance to allografts. *Chem Immunol* 58 (1994): 236-258
- 88 Malkovska V., Cigel F., Sondel P., Storer B.E., Parker, K.
Synthetic peptides derived from the CD19 protein bind to the class I HLA-A2.1. *Blood* 86 (suppl 1) (1995): 157a
- 89 Malkovska V., Cigel F., Storer B.E.
Human T-cells in hu-PBL-SCID mice proliferate in response to Daudi Lymphoma and confer anti-tumor immunity.
Clin. Exp. Immunol. 96 (1994): 158-165
- 90 Mate-Jimenez J., Hermida C., Cantero-Perona J., Moreno-Otero R.
6-Mercaptopurin or Methotrexat added to Prednisone induces and maintains remission in Steroid dependent inflammatory bowel disease
Eur J. Gastroentrol. Hepatol. 2000; 12(11), 1227-1233 (1b)
- 91 McDevitt.
Discovering the role of the major histocompatibility complex in the immune response, *Annu Rev Immunol* 18 (2000): 1-17
- 92 Mickelson E.M., Clift R. A., Fefer A., Storb R., Thomas E. D., Warren R.P., Hansen J.A.
Studies of the response in mixed leukocyte culture of cells from patients with aplastic anemia to cells from HLA-identical siblings
Transplantation 32 (1981): 90 - 95

- 93 Mickelson E.M., Hansen J.A.
The mixed lymphocyte culture (MLC) reaction and typing for HLA-D determinants.
AAOHT laboratory manual
American association for clinical histocompatibility testing
New York, 1981, IV-I-IV-38
- 94 Moller G. (Hrsg)
Chronic autoimmune diseases.
Immunol Rev 144 (1995): 1-314
- 95 Muluk S.C., Clerici M., Via C.S., Weir M.R., Kimmel P.L., Shearer G.M.
Correlation of in vitro CD4+ T-helper cell function with clinical graft status in immunosuppressed kidney transplant recipients.
Transplantation 52 (1991): 284-291
- 96 Murphy WJ., Blazar BR.
New strategies for preventing graft-versus-host disease. Curr Opin Immunol 11(1999): 509-515
- 97 Murray JE.
Human organ transplantation: background and consequences. Science 256 (1992): 1411-1416
- 98 Nagata S.
Apoptosis by death factor. Cell 88 (1997): 355-365
- 99 Nijkamp F.P., Parnham M.J. (eds.).
Principles of immunopharmacology. Birkhäuser, Basel 1999
- 100 Nimer S.D., Giorgi J., Gajewski J.L., Ku N., Lee K., Ho W.
Selective depletion of CD8+ cells for prevention of graft-versus-host disease after bone marrow transplantation
Transplantation 57 (1994): 82-87
- 101 Opelz G., Wujciak T., Dohler B Js.
HLA matching worth the effort? Collaborative Transplant Study
Transplantat proc 31(1999): 717- 720
- 102 Opelz G. Factors influencing long-term graft loss. The Collaborative Transplant Study
Transplantat proc 32 (2000): 647-649
- 103 O' Rourke AM., Mescher MF.
Cytotoxic T-lymphocyte activation involves a cascade of signalling and adhesion events
Nature 358 (1992): 253-255

- 104 Paul J.
Zell- und Gewebekulturen, de Gruyter, Berlin, New York (1979): 347-348
- 105 Picker L.J., Butcher E.C.
Physiological and molecular mechanism of lymphocyte homing.
Annu Rev Immunol 10 (1993): 561-591
- 106 Porter D.L., Antin J.H.
The graft-versus-leukemia effects of allogeneic cell therapy. Annu Rev Med 50
(1999): 369-386
- 107 Resch K.
Einfluss von Pharmaka und toxischen Substanzen auf das Immunsystem.
Grosdanoff P. et al.: Toxikologische und klinisch-pharmakologische
Prüfungen, Anforderungen, Methoden, Erfahrungen, Perspektiven. DeGruyter,
Berlin (1990): 281-299
- 108 Rocken M., Shevach E.M.
Immune deviation – the third dimension of nondeletional T-cell tolerance
Immunol Rev 149 (1996): 175-194
- 109 Rogers, B.O
Transplantation of skin.
In “Transplantation of tissues”
Peer L.A.(Ed.), Williams and Wilkins,
Baltimore (1959): 75
- 110 Rosen F.S., Cooper M.D.
Wedgwood RJ The primary immunodeficiencies.
N Engl J Med 333 (1995): 431-440
- 111 Ross R Mouse mammary tumor virus and its interaction with the immune
system. Immunol Res 17 (1998): 209-216
- 112 Schäfer B.
Transplantationsimmunologie.
GK2 Immunologie und Immunpathologie
Schäfer, B. (Hrsg), Chapman& Hall GmbH, London-Glasgow- Weinheim-New
York-Tokyo-Melbourne-Madras, 1995: 1. Auflage: 62-64
- 113 Schäfer B.
Transplantationsimmunologie.
GK2 Immunologie und Immunpathologie
Schäfer, B. (Hrsg), Chapman& Hall GmbH, London-Glasgow- Weinheim-New
York-Tokyo-Melbourne-Madras, 1995: 1. Auflage: 65

- 114 Schäfer, B.
Transplantationsimmunologie.
GK2 Immunologie und Immunpathologie
Schäfer, B. (Hrsg), Chapman& Hall GmbH, London-Glasgow- Weinheim-New
York-Tokyo-Melbourne-Madras, 1995: 1. Auflage: 66
- 115 Schlienger K., Craighead N., Lee K.P., Levine B.L., June C.H.
Efficient priming of protein antigen-specific human CD4+ T-cell by monocyte-
derived dendritic cells, *Blood* 96 (2000): 3490-3498
- 116 Shi C., Lee W.S., He Q., Zhang D., Fletcher D.L., Newell J.B., Haber E.
Immunologic basis of transplantat-associated arteriosclerosis.
Proc Natl Acad Sci USA 93 (1996): 4051 - 4056
- 117 Schmid C., Heeman U., Tilney N.L.
Factors contributing to the development of chronic rejection in heterotopic rat
heart transplantation. *Transplantation* 64 (1997): 222-228
- 118 Sigma Diagnostics, Inc.:
ACCUSPIN™ System-HISTOPAQUE®-1077
Methode-Nrs.A 6929/A7054/A056, 1997 St.Louis, Mo, USA, I-G
- 119 Slavcev A., Striz I., Ivaskova E., Breur-Vriesendrop B.S.
Alloresponses of cord blood cells in primary mixed lymphocyte cultures.
Hum. Immunol. 63 (3) (2002): 155-163
- 120 Smith C.R., Jaramillo A., Poindexter N.J., Steward N.S., Lu. K.C., Brennen
D.C., Singer G.G., Miller B.W., Jendrisak M.D., Shenoy S., Lowell J.A.,
Howard T.K., Mohanakumar T.
In vitro T-cell proliferation from kidney allograft biopsies with unremarkable
pathology: new strategies for an old problem. *Transplantation* 73 (1) (2002):
142-145
- 121 Souhami R. L., Tannock I., Hohenberger P., Horiot J.C. (eds.). Oxford
Textbook of Oncology. Vol. 1+2. Oxford University Press, Oxford 2002.
- 122 Sprent J., Mixed lymphocyte reaction.
„Encyclopedia of Immunology” Delves P.J., Roitt I.M. (Editors). Academic
Pres, San Diego, London, 1998, 2 nd edition: 1733-1736
- 123 Streilein J.W., Ksander B.R., Tayler A.W.
Immune deviation in relation to ocular immune privilege. *J Immunol* 158
(1997): 3557-3560

- 124 Svanborg C., Godaly G., Hedlund M.
Cytocine responses during mucosal infection: role in disease pathogenesis and host defence. *Cur Opin Microbiol* 2 (1999): 99-105
- 125 The Tricontinental Mycophenolate Mofetil Renal Transplantation Study Group. Ablinded, randomized clinical trial of mycophenolate mofetil for the prevention of acute rejection in cadaveric renal transplantation. *Transplantation* 61 (1996): 1029-1037
- 126 Thery C., Amigorena S.
The cell biology of antigen presentation in dendritic cell. *Curr Opin Immunol* 13 (2001): 45-51
- 127 Thorsby E., Bois R.D., Bondevik H., Dupont B., Eijsvoogel V., Hansen J.A., Jersild C., Jorgensen F., Kissmeyer-Nielsen F., Lamm L.U., Schellekens P.T.A., Svejgaard A., Thomsen M.,
Joint report from a mixed lymphocyte culture workshop., *Tissue Antigens* 4 (1974): 507-525
- 128 Turk J.L., Parker D.
Effect of Cyclophosphamid on immunological control mechanisms. *Immunol Rev* 65 (1982): 99-113
- 129 Vincenti F.
What's in the pipeline? New immunosuppressive drugs in transplantation. *Am.J. Transplant.*2 (2002): 898-903
- 130 Voronoff S.
Rejuvenation by grafting. George Allen and Unwin, London, 1925
- 131 Warrens A.N, Lomardi G., Lechler R.I.
Presentation and recognition of major and minor histocompatibility antigens. *Transpl. Immunol.* 2 (1994): 103-107
- 132 Wekerle T., and M. Sykes.
Mixed chimerism and transplantation tolerance. *Annual Review of Medicine* 52 (2001): 353-370
- 133 Wood K.J., and S. Sakaguchi.
Regulatory T cells in transplantation tolerance. *Nature Reviews Immunology* 3 (2003): 199-210
- 134 Woodruff M.F.A.
The transplantation of tissues and organs
Charles C. Thomas Publisher, Springfield (IL), 1960

- 135 Xiao F., Chong A.S., Foster P., Shen J.
Leflunomide controls rejection in hamster to rat cardiac xenografts.
Transplantation 58 (1994): 828-834
- 136 Zeeck A., Eick S., Krone B., Schröder K.
Stöchiometrische Berechnungen. Chemie für Mediziner
Zeeck A. (Hrsg.), Urban & Schwarzenberg,
München-Wien-Baltimore, (1992) 2. Auflage: 71
- 137 Zeller W.J., Hausen H. (Hrsg.).
Onkologie, Grundlagen, Diagnostik,
Therapie, Entwicklungen. Ecomed Verlagsgesellschaft, Landsberg/Lech 1995
- 138 Zhu L.p., Cupps T.R., Whalen G., Fauci A.S.
Selective effects of Cyclophosphamide therapy on activation, proliferation, and
differentiation of human B-cells.
J Clin Invest 79 (1987): 1082-1090

Lebenslauf

Persönliche Daten:

Name: Asefi
Vorname: Nafisa
Geburtsname: Sidiqi
Geburtsdatum: 22.06.1972
Geburtsort: Afghanistan
Staatsangehörigkeit: Deutsch
Familienstand: Verheiratet
Anschrift: Josef-Sterr-Str. 11, 81377 München

Schulbildung:

1978-1983 Grundschohle in Afghanistan
1983-1987 Gymnasium in Afghanistan

Hochschulbildung:

1987-1989 Studium der Humanmedizin an der
Universität Kabul-Afghanistan
1989-1992 Unterbrechung des Studiums aus
politischen Gründen
WS 1992 - SS 1995 Vorklinische Abschnitt an der
Universität Regensburg
WS 1995 - WS 2000 Klinischer Abschnitt an der
Technischen Universität München
Mai 2000 - Dezember 2002 Erziehungspause
Januar 2003 - Juli 2004 Ärztin im Praktikum - Paracelsus Klinik München
Juli 2004 - November 2005 Assistenzärztin - Klinikum rechts der Isar München
Seit November 2005 Assistenzärztin - Klinikum Freising