

**Aus der Medizinischen Universitätsklinik und Poliklinik
(Department) Tübingen
Abteilung Innere Medizin II
(Schwerpunkt: Onkologie, Hämatologie, klinische Immunologie,
Rheumatologie)
Ärztlicher Direktor: Professor Dr. L. Kanz**

**In-vitro-Untersuchungen zum Einfluss eines
Pelargonium-Extraktes (Umckaloabo®)
auf PBMC gesunder Probanden**

**Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizin**

**der Medizinischen Fakultät
der Eberhard-Karls-Universität
zu Tübingen**

vorgelegt von

Florian Hirner

aus

Heilbronn

2010

Dekan:

Professor Dr. I. B. Autenrieth

1. Berichterstatter:

Frau Professor Dr. R. Klein

2. Berichterstatter:

Frau Privatdozentin Dr. B. Gückel

I INHALTSVERZEICHNIS

	Seite
1 EINLEITUNG	1
1.1 Pelargonium sidoides und Umckaloabo	1
1.2 Chemische Analyse von <i>P. sidoides</i> und <i>P. reniforme</i>	3
1.3 Klinische Studien zur Wirkung von Umckaloabo	5
1.4 In-vitro-Untersuchungen zur Wirkungsweise von Umckaloabo	6
1.4.1 Antibakterielle Aktivität	6
1.4.2 Immunmodulierende Eigenschaften	7
1.4.2.1 NO-Induktion und intrazelluläre Abwehr in Makrophagen	7
1.4.2.2 Zytokinproduktion in Makrophagen	9
1.4.2.3 Zytoprotektive Effekte durch IFN-Produktion in Fibroblasten	10
1.4.2.3 IFN- β -Synthese in humanen Osteosarkomzellen	11
1.5 Ziel dieser Studie	11
2 PROBANDEN, MATERIAL UND METHODEN	13
2.1 Probanden	13
2.2 Material	13
2.2.1 Reagenzien für die Isolierung von Lymphozyten aus Vollblut	13
2.2.2 Reagenzien für den Lymphozytentransformationstest (LTT)	14
2.2.3 Reagenzien für die Durchführung des Cytokin-ELISA	14
2.2.4 Reagenzien für die Standardverdünnungen beim Zytokin-ELISA	15
2.2.5 Antikörper für den Zytokin-ELISA	15
2.2.6 Reagenzien für die Vorbereitung der Zellen zur Durchflusszytometrie	15
2.2.7 Antikörper für durchflusszytometrische Untersuchungen	16
2.2.8 Antigene	

	17
2.2.9 Medikamente	17
2.2.10 Verbrauchsmaterialien/Geräte	18
2.3 Methoden	18
2.3.1 Probengewinnung	18
2.3.2 PBMC-Isolierung	19
2.3.3 Zellzahlbestimmung	19
2.3.4 Titration von Antigenen, Positiv- und Negativkontrolle	20
2.3.5 Konzentrationen des untersuchten Medikamentes	20
2.3.6 Lymphozytentransformationstest (LTT)	21
2.3.7 Durchflusszytometrische Analyse CD69-exprimierender Zellen	21
2.3.8 Durchflusszytometrische Analyse proliferierender Zellen	22
2.3.9 Durchflusszytometrische Analyse regulatorischer T-Zellen	23
2.3.10 Bestimmung von Zytokinen im Kulturüberstand (Cytokin-ELISA)	23
2.3.11 Kinetische Analyse der untersuchten Immunreaktionen	24
2.3.12 Statistische Auswertung der untersuchten Immunreaktionen	25
3 ERGEBNISSE	26
3.1 Einfluss von Umckaloabo auf die Proliferation von PBMC	26
3.1.1 Kinetik der Zellproliferation	26
3.1.2 Einfluss von Umckaloabo ohne Kostimulation der PBMC	28
3.1.3 Einfluss von Umckaloabo nach Kostimulation der PBMC durch BCG	29
3.1.4 Einfluss von Umckaloabo nach Kostimulation der PBMC durch TT	30
3.1.5 Einfluss von Umckaloabo nach Kostimulation der PBMC durch PPD	32
3.1.6 Durchflusszytometrische Analyse der Zellproliferation	34
3.2 Einfluss von Umckaloabo auf die CD69-Expression von PBMC	37
3.2.1 Einfluss von Umckaloabo ohne Kostimulation der PBMC	37
3.2.2 Einfluss von Umckaloabo bei Kostimulation der PBMC durch BCG	41
3.2.3 Einfluss von Umckaloabo bei Kostimulation der PBMC durch TT	43
3.2.4 Einfluss von Umckaloabo bei Kostimulation der PBMC durch PPD	46

3.3 Durchflusszytometrische Analyse regulatorischer T-Zellen	49
3.4 Einfluss von Umckaloabo auf die Zytokinproduktion durch PBMC	51
3.4.1 Kinetik der Umckaloabo-induzierten Zytokinproduktion durch PBMC	51
3.4.2 Einfluss von Umckaloabo auf die Produktion Makrophagen-typischer Zytokine (IL-1, IL-6, TNF- α) durch PBMC	53
3.4.3 Einfluss von Umckaloabo auf die Produktion T _{H1} -typischer Zytokine (TNF- β , IFN- γ) durch PBMC	57
3.4.4 Einfluss von Umckaloabo auf die Produktion T _{H2} -typischer Zytokine (IL-5, IL-13) durch PBMC	60
3.4.5 Einfluss von Umckaloabo auf die Produktion von IL-10 durch PBMC	62
3.4.6 Einfluss von Umckaloabo auf die Produktion von GM-CSF durch PBMC	64
4 DISKUSSION	67
4.1 Bewertung der Zellproliferation	67
4.2 Bewertung der CD69-Expression	69
4.3 Bewertung des Verhaltens der regulatorischen T-Zellen	70
4.4 Bewertung der Zytokin-Produktion	71
4.5 Zusammenfassende Betrachtung unter klinischen Aspekten	73
4.6 Mögliche Nebenwirkungen	76
4.7 Ausblick	77
5 ZUSAMMENFASSUNG	78
6 LITERATURVERZEICHNIS	81

II ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

Abb.	Abbildung
<i>al.</i>	<i>alii</i>
Ak	Antikörper
APC	Allophycocyanin
BALT	<i>bronchus-associated lymphatic tissue</i>
BCG	Bacille Calmette-Guérin
BrdU	5-Bromo-2-desoxyuridin
BSA	Bovines Serum-Albumin
bzw.	beziehungsweise
CD	<i>cluster of differentiation</i>
cpm	<i>counts per minute</i>
DNA	Desoxyribonukleinsäure (<i>desoxyribic nucleic acid</i>)
ELISA	<i>enzyme-linked immuno sorbent assay</i>
FACS	Durchflusszytometer (<i>fluorescence-activated cell sorter</i>)
FITC	Fluoreszeinisothiocyanat
FSC	Vorwärtsstreulicht (<i>forward scatter</i>)
g	Erdbeschleunigung 9,81 m/s ²
GALT	<i>gut-associated lymphatic tissue</i>
GCP	<i>good clinical practice</i>
GM-CSF	Granulozyten/Makrophagen - koloniestimulierender Faktor
h	Stunde
HBSS	Hanks' Balanced Salt Solution
HEPES	N-2-Hydroxyethylpiperazin-N-2-ethansulfonsäure
IE	Internationale Einheit
IFN	Interferon
IL	Interleukin
iNOS	<i>inorganic NO-synthase</i>
IU	Internationale Einheit
l	Liter

LPS	Lipopolysaccharid
LTT	Lymphozyten-Transformationstest
MALT	<i>mucosa-associated lymphatic tissue</i>
MBq	Megabecquerel
mg	Milligramm
MHK	Minimale Hemmkonzentration
Mio.	Million
ml	Milliliter
mM	Millimol
mRNA	<i>messenger RNA</i>
PBMC	<i>peripheral mononuclear blood cells</i>
PBP	<i>peripheral blood phagocytes</i>
PBS	Phosphatpuffer (<i>phosphate buffered saline</i>)
PCR	<i>polymerase chain reaction</i>
PE	Phycoerythrin
PerCP	Peridinin-Chlorophyll-Protein-Komplex
PPD	<i>protein-purified derivative</i>
RNA	Ribonucleinsäure (<i>ribic nucleic acid</i>)
RPMI	<i>Roswell Park Memorial Institute</i>
RT	Raumtemperatur
SIRS	<i>systemic inflammatory response syndrome</i>
SSC	Seitwärtsstreulicht (<i>sideward scatter</i>)
TNF	Tumor-Nekrose-Faktor
TT	Tetanus-Toxoid-Absorbat-Impfstoff
TU	Tuberkulin-Einheiten
w/o	ohne
µl	Mikroliter

1 EINLEITUNG

1.1 *Pelargonium sidoides* und Umckaloabo

Pelargonium sidoides gehört zur Familie der Storchenschnabelgewächse (*Geraniaceae*). Die Mitglieder dieser Pflanzenfamilie zeichnen sich durch eine storchenschnabelförmige Samenkapsel aus, worauf die botanische Bezeichnung *Pelargonium* Bezug nimmt: Sie leitet sich vom griechischen Wort „pelargos“ (Storch) ab. Die Mehrheit der rund 270 heute bekannten *Pelargonium*-Arten sind in der südlichen Hemisphäre beheimatet. Man findet sie vor allem im südlichen und östlichen Afrika, aber auch in Australien, Neuseeland, sowie auf den Inseln St. Helena, Tristan de Cunha und Madagaskar.

P. sidoides besitzt stark entwickelte Wurzeln und kurze, aufrechte Stängel, von denen rosettenförmig die Blätter ausgehen. Die Blüten zeigen eine charakteristische lila-schwarze Färbung.

Die Pflanze wächst in den Sommerregengebieten in Südafrika von Transvaal bis zu den südlichen Kap-Provinzen (Abb.1) und ist dort von dem schwedischen Botaniker Thunberg 1772 gesammelt und katalogisiert worden. (Gödecke, 2005).

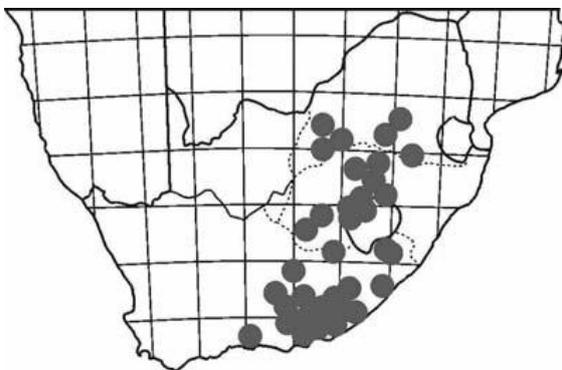


Abb. 1: Verbreitung von *Pelargonium sidoides* (übernommen von Gödecke, 2005)

Im südlichen Afrika wird die Verwendung aller Pflanzenteile in der traditionellen Medizin gegen eine Reihe von Erkrankungen beschrieben; so zum Beispiel bei gastrointestinalen Störungen, bei Leberbeschwerden, zur Wundheilung und bei Erkrankungen des Respirationstraktes. Das Wurzelmaterial von *P. sidoides*, aber wahrscheinlich auch von der nah verwandten Art *P. reniforme* wurde lange Zeit mit „Umckaloabo“ bezeichnet, einem aus der Zulu-Sprache abgeleiteten Begriff. Nach unveröffentlichten Informationen ist jedoch das Wort „Umckaloabo“ selbst in der Zulu-Sprache unbekannt; es könnte sich also aus der lautlichen Umformung der beiden Worte „umKhulkane“ und „uHlabo“ herleiten, was „Beschwerden oder Erkrankung der Lunge“ beziehungsweise „Schmerzen im Brustbereich“ bedeutet (zitiert nach Gödecke, 2005).

Im 18. Jahrhundert wurde der therapeutische Wert vieler traditionell genutzter Pflanzen Südafrikas von europäischen Siedlern entdeckt. So stellte Major Stevens um den Beginn des 20. Jahrhunderts seine „Steven`s consumption cure“ in London als neue „Geheimwaffe“ gegen Tuberkulose vor (Helmstädter, 1996). Stevens glaubte, nach der Behandlung mit einem Pelargonium-Dekokt durch einen Medizinmann von seiner Tuberkulose geheilt worden zu sein. 1920 hörte der Schweizer Arzt Secheyayes von der „Steven`s Cure“, und behandelte ca. 800 Patienten in den folgenden 9 Jahren. Er erstattete Bericht an die Medical Society in Genf über erfolgreiche Anwendungen, allerdings ist in vielen Fällen die Diagnose einer Tuberkulose nicht gesichert.

Seit einigen Jahren wird nun das Medikament Umckaloabo®, ein wässrig-ethanolischer Auszug aus den Wurzeln von *P. sidoides* und *P. reniforme*, erfolgreich von der Firma Spitzner-Arzneimittel, Ettlingen vertrieben. Dieser gesetzlich geschützte Auszug wird mit dem Namen EPs®7630 bezeichnet und war zunächst indiziert bei akuten und chronischen Infektionen der Atemwege und des HNO-Bereichs wie z.B. Bronchitis, Sinusitis, Tonsillo- und Rhinopharyngitis. Im Rahmen des Nachzulassungsverfahrens wurde dem Präparat im Dezember 2005 aufgrund der vorliegenden Daten zur Wirksamkeit und Unbedenklichkeit nur die Zulassung zur Anwendung bei akuter Bronchitis erteilt.

1.2 Chemische Analyse von *P. sidoides* und *P. reniforme*

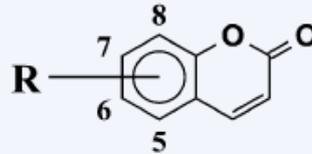
Die charakteristischen und vermutlich therapeutisch bedeutendsten Naturstoffe der jeweiligen Wurzel Droge sind Cumarine, einfache phenolische Verbindungen und Gerbstoffe vom Typ der Proanthocyanidine (Abb. 2). Strukturell auffällig ist der hohe Oxygenierungsgrad bei den Cumarinen, deren Vertreter entweder sehr seltene oder neue Naturstoffe repräsentieren und demzufolge als chemische Marker zur Identifizierung der Droge herangezogen werden können (Kolodziej, 2007). Erwähnenswert ist zudem die Anwesenheit von sulfatierten Cumarinen, die bisher erst in einer Pflanzenart (*Seseli libanotis*, Apiaceae) gefunden wurden. Bei den einfachen phenolischen Verbindungen handelt es sich in erster Linie um Gallussäure und ihren Methylester, welche im Pflanzenreich weit verbreitet und in *P. sidoides* reichlich enthalten sind.

Als Präkursoren der komplex zusammengesetzten Proanthocyanidine (kondensierte Gerbstoffe) wurden verschiedene monomere Flavan-3-ole identifiziert, mit Catechin und Galocatechin als dominierenden Bausteinen. Der hohe Anteil an den genannten Gerbstoffen könnte eine Erklärung für die traditionelle Anwendung zur Wundheilung und bei dysenterischen Beschwerden geben, gleichzeitig könnten sie als starke Radikalfänger eine Wirkung bei Leberkrankheiten haben (Latté, Kolodziej, 2004).

Interessant erscheint hierbei auch, dass Gallocatechine wichtige Inhaltsstoffe von grünem Tee darstellen, für die immunmodulatorische Eigenschaften nachgewiesen sind, so für Epigallocatechingallat (Matsunaga et al., 2001)

Eine detaillierte Beschreibung des metabolischen Pools von *P. sidoides*, *P. reniforme* bzw. EPs®7630 gibt Kolodziej in einem Review (Kolodziej, 2007).

Cumarine



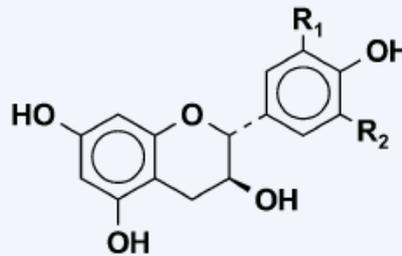
7-Hydroxy-6-methoxycumarin	5,6,7,8-Tetramethoxycumarin
5,6,7-Trimethoxycumarin	6,8-Dihydroxy-5,7-dimethoxycumarin
7-Hydroxy-5,6-dimethoxycumarin	5,7-Dimethoxycumarin-7-sulfat
7-Acetoxy-5,6-dimethoxycumarin	8-Hydroxy-5,7-dimethoxycumarin-6-sulfat
6,8-Dihydroxy-7-methoxycumarin	6-Hydroxy-5,7-dimethoxycumarin-8-sulfat
6,7,8-Trimethoxycumarin	

Gallussäure-Derivate



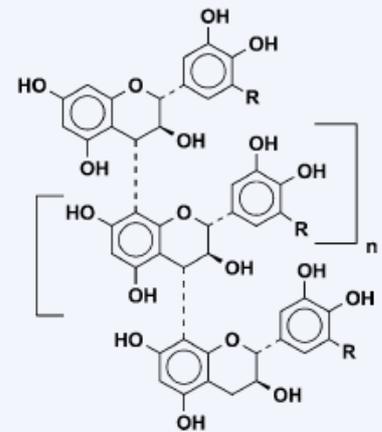
Gallussäure: R = H
 Gallussäure-methylester: R = CH₃

Flavan-3-ole



Afzelechin: R₁ = R₂ = H
 Catechin: R₁ = OH; R₂ = H
 Galocatechin: R₁ = R₂ = OH

Proanthocyanidin-Polymer



R = H oder OH

Abb.2: Charakteristische Inhaltsstoffe von *P. reniforme* bzw. *P. sidoides* (übernommen von Kolodziej, Schulz, 2003)

1.3 Klinische Studien zur Wirkung von Umckaloabo

Für den Einsatz von Umckaloabo bei akuter Bronchitis existieren sowohl bei Kindern als auch bei Erwachsenen mehrere randomisierte, kontrollierte klinische Studien, die eine signifikante Überlegenheit des Verums gegenüber Placebo zeigen. Die Wirksamkeit von Umckaloabo bei akuter Bronchitis wurde dabei mithilfe einer klinischen Bewertungsskala quantitativ erfasst, dem „*bronchitis severity score*“ (BSS). Dieser war die wichtigste konfirmatorische Zielgröße. In den BSS gehen die klinischen Parameter Husten, Auswurf, Rasselgeräusche, Brustschmerz und Dyspnoe ein.

Eine Meta-Analyse betrachtet sechs Studien zur Wirksamkeit von Umckaloabo bei akuter Bronchitis und kommt zu dem Schluss, dass die vier vergleichbaren Studien einen signifikanten Rückgang des BSS gegenüber Placebo zeigen. (Agbabiaka *et al.*, 2008)

Eine Meta-Analyse des Cochrane-Instituts dagegen kommt zu der Feststellung, dass Umckaloabo zwar möglicherweise die Symptome einer akuten Bronchitis bei Kindern und Erwachsenen lindere, aber aufgrund der großen Heterogenität der Studienanlagen Zweifel bestünden. Ebenso gelte dies für den Einsatz von Umckaloabo bei Erwachsenen für die Indikationen Rhinitis, Sinusitis und Rhinosinusitis (Timmer *et al.*, 2008)

Laut der Cochrane-Analyse sei das Auftreten von unerwünschten Nebenwirkungen bei Anwendung von Umckaloabo signifikant höher als bei Placebo, dabei handele es sich aber nicht um schwere Nebenwirkungen.

Zur Wirksamkeit von Umckaloabo bei akuter Tonsillopharyngitis existieren ebenso mehrere klinische Studien, die als Zielgröße analog zum BSS den TSS (*tonsillitis severity score*) verwenden. In den TSS gehen die klinischen Parameter Schluckbeschwerden, Halsschmerz, Speichelfluss, Fieber und Rötung von Mund und Rachen ein.

Drei plazebokontrollierte Studien zeigen hier ebenso einen signifikanten Rückgang des TSS (Kolodziej, Schulz, 2003), es existiert aber keine unabhängige Meta-Analyse wie zu den oben genannten Indikationen und seit 2005 auch keine Zulassung mehr für diese Indikation.

1.4 In-vitro-Untersuchungen zur Wirkungsweise von Umckaloabo

1.4.1 Antibakterielle Aktivität

Im Hinblick auf die beanspruchten klinischen Indikationen untersuchten verschiedene Arbeitsgruppen die antibakteriellen Eigenschaften von Extrakten aus *Pelargonium sidoides* und *Pelargonium reniforme* bzw. darin enthaltenen Einzelverbindungen (Kayser, Kolodziej, 1997; Seidel, Taylor, 2004). Experimentelle Untersuchungen gegenüber verschiedenen grampositiven (*Staphylococcus aureus*, *Streptococcus pneumoniae*, β -hämolisierende Streptokokken) und gramnegativen Bakterien (*Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Proteus mirabilis*, *Haemophilus influenzae*), großteils Erreger von Atemwegsinfektionen, ergaben für den Gesamtwurzelextrakt von *P. sidoides* MHK-Werte (minimale Hemmkonzentration) von 5 bis 7,5 mg/ml. Die MHK-Werte des fraktionierten Gesamtextraktes (Ethylacetat-, n-Butanol- und Wasserphase) lagen bei 0,6 bis 1,2 mg/ml je nach Testorganismus und Phase; die höchsten antibakteriellen Aktivitäten wurden stets für die wässrige Phase beobachtet. Bemerkenswert ist, dass vergleichbare bakteriostatische Eigenschaften auch gegenüber fünf verschiedenen multiresistenten *S. aureus*-Stämmen beobachtet wurden. Als potente antibakterielle Verbindungen erwiesen sich in den Labortests die Cumarine Umckalin und 6,8-Dihydroxy-5,7-dimethoxycumarin sowie Gallussäuremethylester mit MHK-Werten von 200 bis 500 μ g/ml.

Zwar sind die antibakteriellen Wirkungen der Extrakte aus *P. sidoides* im Vergleich zu Antibiotika wie z.B. Penicillin G (MHK-Werte von 5 bis 25 μ g/ml) deutlich schwächer (also etwa um den Faktor 1000), doch ist eine topische Wirkung bei lokaler Anwendung denkbar (Kolodziej, Schulz, 2003).

Ein weiterer antibakterieller Effekt ist die antiadhäsive Wirkung von Eps®7630: Die durch die Glykokalix vermittelte Interaktion der Bakterien mit Epithelzellen wird *in-vitro* durch die Zugabe von Umckaloabo behindert. Dabei zeigten sich schon bei deutlich niedrigeren Konzentrationen von Umckaloabo relevante Effekte: Die Adhäsion von *Helicobacter pylori* an Epithelzellen des Magens

wurde bei 50 µg/ml um 77%, bei 100µg/ml um 91% vermindert (Beil, Kilian, 2007). Ebenso konnte gezeigt werden, dass Umckaloabo in einer Konzentration von 30 µg/ml die Adhäsion von Gruppe-A-Streptokokken an Epithelzellen der Mundschleimhaut um 46% verringert (Conrad, Jung *et al.*, 2007).

1.4.2 Immunmodulierende Eigenschaften

Die oben genannten antibakteriellen Aktivitäten können die dokumentierte therapeutische Wirksamkeit von Umckaloabo nicht ausreichend erklären. Infektionen der Atemwege und des HNO-Bereichs sind initial oft virusbedingt, führen zu einer Schwächung der Immunabwehr und sekundär zu einer bakteriellen Superinfektion. Vor diesem Hintergrund erscheint es naheliegend, immunmodulierende Effekte, insbesondere auch antiviraler Art, in die Überlegungen zu den fraglichen Wirkmechanismen einzubeziehen. Die bisherigen Untersuchungen hinsichtlich der immunmodulierenden Eigenschaften von Umckaloabo bezogen sich dabei vor allem auf Makrophagen. Diese spielen als Phagozyten und immunpräsentierende Zellen eine Schlüsselrolle in allen Phasen der Immunabwehr: Sie können Bakterien durch die Bildung einer Vielzahl von toxischen Produkten wie reaktiven Sauerstoffspezies und Stickstoffmonoxid (NO) schädigen. Außerdem führen sie durch die Sekretion von Zytokinen in einem komplexen Zusammenspiel zur Aktivierung von Lymphozyten.

1.4.2.1 NO-Induktion und intrazelluläre Abwehr in Makrophagen

In Untersuchungen zur Aktivierung sauerstoffabhängiger Abwehrmechanismen durch Extrakte und Inhaltsstoffe von *P. sidoides* wurde bisher schwerpunktmäßig die Bildung und Freisetzung des mikrobiziden Effektormoleküls NO erforscht. Eine Arbeitsgruppe inkubierte zu diesem Zwecke Leishmanien-infizierte murine Makrophagen mit Testsubstanzen und

bestimmte die intrazellulär gebildeten NO-Mengen nach 72 h mithilfe des Griess-Assays. Die Ergebnisse zeigen, dass verschiedene getestete Verbindungen (6,8-dihydroxy-5,7-dimethoxycumarin, Umckalin, Gallussäure, Methylgallat, Scopoletin) ebenso wie Umckaloabo die Produktion von NO induzieren (Kolodziej, Kiderlen, 2007). Im Vergleich zum maximalen Stimulus (LPS + IFN) lag die Makrophagen-stimulierende Aktivität von Umckaloabo in der Konzentration 50 µg/ml im Bereich von 10 bis 45% und war damit eher moderat. Das Ausmaß der NO-Induktion in aktivierten Makrophagen korreliert aber nicht zwingend mit der Wirkung des NO auf die intrazellulären Parasiten (Kolodziej, Schulz, 2003). Um diese beurteilen zu können, wurde nach Lyse der Makrophagen die relative Zahl der überlebenden Leishmanien mithilfe des MTT-Tests ermittelt. Mit Gallussäure als dem potentesten NO-Induktor aus der Reihe der Testsubstanzen wurde eine Überlebensrate von nur ca. 1% ermittelt. Für die getesteten Cumarine betrug die leishmanizide Aktivität 20 bis 50% des maximalen Stimulus (LPS + IFN-γ), die Wirkung des Extraktes von *P. sidoides* lag bei 64 %. (Kolodziej et al., 2005).

Eine andere Arbeitsgruppe (Conrad, Hansmann *et al.*, 2007) untersuchte die Auswirkungen von Umckaloabo auf die Aktivität von humanen Phagozyten aus peripherem Blut (PBP). Als Zielorganismus wurde hier *Candida albicans* eingesetzt; Zielorganismen und Vollblut wurden zusammen inkubiert und nach 0, 2, 4, 6, 10 und 30 Minuten analysiert. Durchflusszytometrisch wurden die Parameter Phagozytose-Aktivität und Freisetzung reaktiver Sauerstoff-Spezies („oxidativer Burst“) gemessen; die intrazelluläre Keimabtötung wurde in einem mikrobiologischen Test bestimmt. Die eingesetzten Konzentrationen von Umckaloabo betragen hierbei 0 – 30 µg/ml. Im Vergleich mit den Kontrollen steigerte die Koinkubation mit Umckaloabo hierbei die Anzahl der phagozytierenden PBP bei Inkubationszeiten von 2 bis 10 Minuten in Abhängigkeit von der Konzentration, bei einer maximalen Steigerung von 56% bei 2 Minuten. Ebenso steigerte die Koinkubation mit Umckaloabo auch die Anzahl „burst-aktiver“ PBP: Die maximale Steigerung betrug 120% nach einer Inkubationszeit von 4 Minuten unter Einsatz der höchsten Konzentrationsstufe

(30 µg/ml). Auch die intrazelluläre Abtötung von *C.albicans* wurde bei dieser Konzentrationsstufe am deutlichsten gesteigert.

1.4.2.2 Zytokinproduktion in Makrophagen

Die Bildung und Freisetzung von Zytokinen sind ein essentieller Bestandteil der Infektabwehr. Zytokine können entweder direkt durchflusszytometrisch oder mittels ELISA erfasst werden, sie können aber auch indirekt mit funktionellen Tests oder molekularbiologisch auf Transkriptionsebene erfasst werden.

Die oben genannte Arbeitsgruppe untersuchte mithilfe eines funktionellen (bezüglich TNF- α bzw. TNF- β nichtdiskriminierenden) TNF-Nachweises das TNF-Induktionspotenzial von Umckaloabo bzw. verschiedenen Fraktionen daraus. Die Testlösungen wurden ebenfalls mit Leishmanien-infizierten murinen Makrophagen inkubiert, der Konzentrationsbereich lag jeweils bei 25 µg/ml (Kolodziej *et al.*, 2001). Während Umckaloabo dabei nur ein zu vernachlässigendes TNF-Induktionspotenzial aufwies, wurde für Gallussäure das höchste TNF-Induktionspotenzial beobachtet, gefolgt von Gallussäuremethylester. Cumarine zeigten dagegen nur ein schwaches TNF-Induktionsvermögen. Auch die Ethylacetat- und n-Butanol-Fraktion erwiesen sich diesbezüglich als relativ potent (Kolodziej, Schulz, 2003).

Die molekularbiologischen Methoden, die die Induktion von Zytokinen auf Transkriptionsebene zeigen, lieferten ein differenzierteres Bild (Trun *et al.*, 2006). Hierbei wurde die Expression von Zytokin-mRNA mithilfe der RT-PCR (Polymerase-Kettenreaktion nach Umschreibung von mRNA in DNA mittels reverser Transkriptase) untersucht. Der grundlegende Versuchsaufbau war mit dem zuvor geschilderten identisch.

Umckaloabo in einer Konzentration von 50 µg/ml steigerte dabei deutlich nicht nur die mRNA-Expression von TNF- α und der NO-Synthase (iNOS), sondern auch von IL-1, IL-12, IL-18, Interferon- α (IFN- α) und Interferon- γ (IFN- γ). Letzteres ist eher ungewöhnlich, da Makrophagen zwar stark auf Interferon- γ als Stimulus reagieren, selbst aber kaum Interferon- γ produzieren (Mogensen,

Virelizier, 1987). IL-10 als ein spätes Signal mit gegenregulierenden immunmodulatorischen Eigenschaften (Mocellin et al., 2003) war nach frühestens 6 bis 8 h detektierbar. Von den verschiedenen Fraktionen von Umckaloabo zeigte nur die Methanol-unlösliche Fraktion, die einen hohen Gehalt an Proanthocyanidinen aufweist, ein ähnliches Vermögen, ebenso wie die Reinsubstanz Gallussäure. Bei letzterer waren aber sehr hohe Konzentrationen (250 µM) für die beschriebenen Effekte nötig. Diese molekularbiologischen Ergebnisse konnten mit zwei weiteren Methoden (Sandwich-ELISA bzw. Durchflusszytometrie) bestätigt werden. Deutlich war bei all diesen Experimenten, dass die Zytokin-Induktion in Leishmanien-infizierten Zellen deutlich höher ausfiel als in nichtinfizierten Zellen (Kolodziej, Kiderlen, 2007).

1.4.2.3 Zytoprotektive Effekte durch Interferon-Produktion in Fibroblasten

Zur Untersuchung zytoprotektiver Effekte durch eine induzierte Interferon (IFN)-Produktion wurde ein Fibroblasten/Enzephalomyokarditis-Virus (EMCV)-Modell genutzt. In diesem Testmodell wurden Makrophagen zunächst mit den Testsubstanzen vorinkubiert und die Überstände mit induziertem IFN auf die murine IFN-sensitive Fibroblasten-Zelllinie L 929 übertragen, welche nachfolgend mit EMCV-Suspensionen infiziert wurde. Nicht ausreichend geschützte Zellen wurden dabei zerstört. Die Viabilität der Fibroblasten wurde spektralphotometrisch nach Anfärbung mit Kristallviolett bestimmt und als relative Viabilität der Fibroblasten angegeben, bezogen auf einen IFN-Standard als positive Kontrolle.

Die Mehrzahl der getesteten Cumarine zeigte im EMCV-Modell über den gesamten Konzentrationsbereich nur moderate zytoprotektive Effekte durch IFN-Induktion (20 bis 30%). Eine signifikante Zytoprotektion war für Gallussäure bei einer Konzentration von 100 µg/ml zu beobachten. Für den Extrakt aus *P. sidoides* wurde dagegen ein sehr ausgeprägtes zytoprotektives Wirkpotenzial beobachtet: Bereits bei einer Konzentration von 0,8 µg/ml erreichte die Viabilität

der Fibroblasten 60% des Kontrollwertes und stieg dann rasch an bis auf den doppelten Wert als Ausdruck einer zunehmenden Proliferation.

Diese Beobachtungen sind Belege für interferonartige Wirkungen des Extrakts aus *P. sidoides*, die die Wirkung der Gallussäure übersteigen und daher nur durch synergistische Effekte von Inhaltsstoffen oder durch noch unbekannte Wirkstoffe erklärbar sind (Kolodziej et al., 2003).

1.4.2.3 IFN- β -Synthese in humanen Osteosarkomzellen

In einer anderen experimentellen Anordnung wurde zu humanen MG-63-Osteosarkomzellen doppelsträngige RNA als virales Analogon gegeben. Bei Zugabe von Umckaloabo konnte die dadurch induzierte Produktion von INF- β deutlich gesteigert werden. Der größte Effekt war bei einer Konzentration von 3 $\mu\text{g/ml}$ zu erkennen und führte im Vergleich mit den Kontrollen zu einer 200%-igen Zunahme der IFN- β -Produktion. Die IFN- β -Synthese konnte nur in Anwesenheit des Stimulus ausgelöst werden (Kolodziej et al., 2003).

1.5 Ziel dieser Arbeit

Wie beschrieben, beschränkten sich die bisherigen *in-vitro*-Untersuchungen bezüglich immunmodulatorischer Effekte von Umckaloabo auf das angeborene Immunsystem, insbesondere Makrophagen, und virusinfizierte Fibroblasten bzw. Osteosarkomzellen.

In der vorliegenden Arbeit sollte nun die Wirkung von Umckaloabo auf Zellen des erworbenen Immunsystems (B-Zellen, T-Helferzellen und T-Killerzellen), aber auch auf Natürliche Killerzellen (NK-Zellen) *in-vitro* näher beleuchtet werden. Dabei sollten insbesondere unterschiedliche Wirkungen auf T_{H1}- und T_{H2}-Immunreaktionen betrachtet werden: Voruntersuchungen unserer Arbeitsgruppe an PBMC von 3 Spendern mit bekanntem T_{H1}- bzw. T_{H2}-Reaktionsmuster zeigten nämlich eine deutlich unterschiedliche Beeinflussung

der jeweiligen Zellproliferation und Cytokinexpression durch Umckaloabo, je nach vorherrschendem Reaktionstyp.

Diese Beobachtungen sollten nun mit größerem methodischen Aufwand und einer größeren Fallzahl (20 gesunde Probanden) genauer untersucht werden. Zum Einsatz sollten dabei folgende Methoden kommen: PBMC-Isolierung aus Vollblut, deren anschließende Kultivierung mit verschiedenen stimulierenden Antigenen, quantitative Zytokinbestimmungen mittels Sandwich-ELISA und Proliferationsassays mit radioaktiven und durchflusszytometrischen Detektionsmethoden. Mit dem Durchflusszytometer sollte weiterhin mittels Dreifach-Färbungen die Expression des frühen Aktivierungsmarkers CD69 und verschiedener Zelloberflächenmoleküle (CD3, CD4, CD8, CD19, CD45, CD56) bestimmt werden. Nach Permeabilisierung der Zellmembran sollte die Expression des intrazellulären Proteins Foxp3 gemessen werden, um so auf den Anteil regulatorischer T-Zellen innerhalb der CD4-positiven Population rückschließen zu können. Außerdem sollte die Kinetik der Immunreaktion studiert werden, um daraus evtl. weitere Rückschlüsse auf die Wirkungsweise von Umckaloabo ziehen zu können.

Durch entsprechende kostimulierende Antigene (BCG, PPD und Tetanus-Toxoid) sollten T_{H1} - bzw. T_{H2} -Immunreaktionen provoziert und der Einfluss von Umckaloabo in unterschiedlichen Konzentrationen innerhalb dieses *in-vitro* Testsystems untersucht werden. Da bisher keine Informationen zur Wirkung von Umckaloabo auf Zellen des erworbenen Immunsystems vorlagen, wurde eine große Spannweite der Konzentrationsstufen von 0,1 mg/ml bis 10000 µg/ml gewählt, wobei die Verdünnungsstufen jeweils in Zehnerpotenzen angelegt wurden.

2 PROBANDEN, MATERIAL UND METHODIK

2.1 Probanden

Aus Gründen der Praktikabilität wurden die Probanden ohne spezielle Auswahlkriterien aus der Bewohnerschaft eines Tübinger Studentenwohnheims rekrutiert. Die acht weiblichen und zwölf männlichen Individuen wiesen zum Zeitpunkt der Experimente ein Altersspektrum zwischen 20 und 36 Jahren auf. Ausschlusskriterien stellten eine akute Infektionskrankheit oder ein akutes allergisches Geschehen dar. Bei allen Probanden wurde nach etwaigen Allergien gefragt und diese notiert. Vier Probanden wiesen eine Pollenallergie auf, ein Proband eine Wespenstichallergie. Weiterhin wurde eruiert, ob die Probanden zuvor schon einmal in Kontakt mit Umckaloabo gekommen waren. Dabei zeigte sich, dass zwei der Probanden Umckaloabo Jahre zuvor eingenommen hatten.

2.2 Material

2.2.1 Reagenzien für die Isolierung von Lymphozyten aus Vollblut

- Heparin-Natrium ratiopharm[®] Injektionslösung 5000 IE
Ratiopharm GmbH
- RPMI 1640 Medium (1x) 5,5 g/l NaCl, 5 mg/l Phenolrot
2 g/l NaHCO₃, 25 mM HEPES
BIOCHROM AG

Wird in dieser Arbeit RPMI 1640 Medium erwähnt, ist immer 100 mg/l Refobacin[®] als Breitbandantibiotikum mit enthalten.

- Refobacin[®] Gentamicinsulfat
MERCK

- HBSS (1x) Hanks' Balanced Salt Solution
w/o CaCl₂, w/o MgCl₂
GIBCO / Invitrogen
- Biocoll separating solution (Ficoll) Dichte: 1,077 g/ml
BIOCHROM AG
- Acridin-Orange *Merck*

2.2.2 Reagenzien für den Lymphozytentransformationstest (LTT)

- [Methyl-³H] Thymidin 74 GBq/mmol *Hartmann Analytic*
- ULTIMA Gold *Packard*

2.2.3 Reagenzien für die Durchführung des Zytokin-ELISA

- PBS-Puffer (60 mM; pH 7,4) 6,81 g KH₂PO₄; 43,83 g NaCl;
44,49 g Na₂HPO₄;
gelöst in 5 l Aqua_{dest}
- Waschpuffer (pH 7,4) 1 x PBS + 0,05% BSA
- Bicarbonat-Puffer (0,2 M; pH 9,6) 33,90 g Na₂CO₃;
57,12 g NaHCO₃;
gelöst in 5 l Aqua_{dest}
- Citrat-Puffer (0,1 M; pH 5,0) 82,36 g tri-Natriumcitrat-Dihydrat;
25,20 g
Citronensäure-Monohydrat;
gelöst in 4 l Aqua_{dest}
- Substrat-Lösung 0,5mg o-Phenyldiamin /
ml Citratpuffer;
33 µl H₂O₂ (30%) /100 ml Puffer
- Avidin-Peroxidase *Sigma*
- 25%-ige Schwefelsäure *Merck*

2.2.4 Reagenzien für die Standardverdünnungen beim Zytokin-ELISA

- IL-1 α , IL-5, IL-6, IL-10, IL-13,
GM-CSF, INF- γ , TNF- α , TNF- β *BD Biosciences Pharmingen*

2.2.5 Antikörper für den Zytokin-ELISA

- Maus anti-human:
IL-5, IL-6, IL-10, IL-13,
GM-CSF, INF- γ , TNF- α , TNF- β *BD Biosciences Pharmingen*
- anti-human IL-1 α *R&D Systems*
- Ratte anti-human biotinyliert
IL-5, IL-6, IL-10, IL-13,
GM-CSF, INF- γ , TNF- α , TNF- β *BD Biosciences Pharmingen*
- anti-human IL-1 α biotinyliert *R&D Systems*

2.2.6 Reagenzien für die Vorbereitung der Zellen zur Durchflusszytometrie

- BD CellFIX™ *10x Konzentrat
BD Biosciences*
- PBS-Puffer *6,81 g KH₂PO₄ ; 43,83 g NaCl;
44,49 g Na₂HPO₄ ;
gelöst in 5 l Aqua_{dest}*
- Waschpuffer *1xPBS + 0,05% BSA*
- FITC BrdU Flow Kit *BD Biosciences Pharmingen*
- FITC anti-human Foxp3 staining set *NatuTec / eBioscience*

2.2.7 Antikörper für durchflusszytometrische Untersuchungen

- **Isotypkontrollen**

FITC Maus anti-human IgG1 κ

PE Maus anti-human IgG1 κ

PerCP Maus anti-human IgG1 κ *BD Biosciences Pharmingen*

- **Antikörper für die Detektion CD69-exprimierender Zellen**

FASTIMMUNE™ CD4/CD69/CD3 CD4 FITC, CD69 PE, CD3 PerCP

FASTIMMUNE™ CD 8/CD69/CD3 CD8 FITC, CD69 PE, CD3 PerCP

FASTIMMUNE™ CD19/CD69/CD45 CD19 FITC, CD69 PE,
CD45 PerCP

FASTIMMUNE™ CD56/CD69/CD45 CD56 FITC, CD69 PE,
CD45 PerCP

BECTON-DICKINSON

- **Antikörper für die Detektion proliferierender Zellen**

FITC anti-BrdU

PE Maus anti-human CD4

PE Maus anti-human CD8

PE Maus anti-human CD9

PE Maus anti-human CD56 *BD Biosciences Pharmingen*

- **Antikörper für die Detektion regulatorischer T-Zellen**

PE Maus anti-human CD4

APC Maus anti-human CD 25 *BD Biosciences Pharmingen*

FITC anti-human Foxp3 *NatuTec / eBioscience*

2.2.8 Antigene

- BCG-medac
2x10⁸ - 3x10⁹ Einheiten von BCG
(Stamm RIVM); Pulver
medec GmbH
- Pokeweed Mitogen (PWM)
0,4 mg Protein/Flasche
BIOCHROM AG
- Tetanol[®] pur
Konservierungsmittelfreier
Tetanus-Toxoid-Absorbat-
Impfstoff (mind. 40 I.E./ 0,5 ml)
Chiron Vaccines Behring
- Tuberkulin PD RT 23 SSI
0,4 µg Tuberkulin PPD / ml
STATENS SERUM INSTITUT

2.2.9 Medikamente

- Umckaloabo[®] (Eps[®]7630)
Lösung zum Einnehmen.
100 g Lösung enthalten 80,0 g
ethanolischen Auszug aus den
Wurzeln von *Pelargonium*
reniforme/ sidoides.
Enthält 12Vol.-% Alkohol.
ISO-Arzneimittel

2.2.10 Verbrauchsmaterialien/Geräte

- BLUE MAX™ 50 ml,
Konische Röhrchen, Polypropylen *Becton Dickinson Labware*
- 1,5 ml Reaktionsgefäße *Greiner*
- Cellstar® Zellkulturröhrchen, 12 ml, steril *Greiner*
- Cellstar® Zellkulturplatte 24well, steril *Greiner*
- Glasfiberfilter *Wollac*
- Einmalpipetten 5ml, 10 ml, 25ml *Becton Dickinson Labware*
- Pipetten 10µl, 100µl, 1000µl *Eppendorf*
- NUNCLON™ 96well Zellkulturplatte *Nalge Nunc International*
- BD Falcon™ 5 ml
Rundbodenröhrchen, Polystyrol *BD Biosciences*
- Zentrifuge Rotixa *Hettich*
- Neubauer-Zählkammer *Assistent*
- Fluoreszenzmikroskop *Ernst Leitz*
- CO₂-Brutschrank *Forma Scientific*
- LKB Wallac 1205 Betaplate® Liquid Scintillation Counter
- SKATRON Combi Cell Harvester
- BD FACSCalibur™ - Durchflusszytometer

2.3 Methoden

2.3.1 Probengewinnung

Den Probanden wurden jeweils 60 ml Blut aus einer Unterarmvene entnommen. Durch Zusatz von 25 IE Heparin pro ml Blut wurde die Gerinnung verhindert. Die Blutabnahme erfolgte kurz vor der Bearbeitung bzw. am Abend des Vortages, um die Lebensfähigkeit der darin enthaltenen Zellen zu gewährleisten.

2.3.2 PBMC-Isolierung

Die Isolierung von PBMC aus peripherem Blut erfolgte unter sterilen Bedingungen über eine Ficoll-Hypaque-Dichtegradientenzentrifugation. Je 30 ml heparinisiertes Blut wurden zunächst mit 5 ml HBSS verdünnt und dann in einem weiteren Blaukopfröhrchen (50 ml) vorsichtig auf 15 ml Biocoll Separating Solution überschichtet. Nach 30-minütiger Zentrifugation bei 740 g reicherten sich die peripheren mononukleären Zellen (PBMC; Lymphozyten und Monozyten) in der Grenzschicht zwischen Plasma und Trennmedium an, während Erythrozyten und Granulozyten unterhalb des Trennmediums sedimentierten. Das Plasma wurde bis 5 ml über der PBMC-Schicht abpipettiert und separat aufbewahrt. Die PBMC-Schicht wurde vollständig in ein weiteres Blaukopfröhrchen überpipettiert und auf ein Volumen von 50 ml mit HBSS verdünnt. Nach 10-minütiger Zentrifugation bei 370 g wurde der Überstand verworfen, das Sediment mit HBSS auf ein Volumen von 25 ml resuspendiert und mit dem Inhalt eines weiteren Blaukopfröhrchens vereinigt, der bis dahin dasselbe Protokoll durchlaufen hatte. Der vorhergehende Waschvorgang wurde ein zweites Mal durchgeführt und das Sediment mit RPMI 1640 Medium resuspendiert. Für je 10 ml Blut wurde je 1 ml RPMI 1640 Medium eingesetzt.

2.3.3 Zellzahlbestimmung

Zum Auszählen der Zellen wurden zu je 20 µl der Zellsuspension 180 µl Acridin-Orange zugesetzt und in eine Neubauer-Zählkammer überführt. Bei 16-facher Vergrößerung wurden die Lymphozyten aus 4 Quadraten à 16 Feldern unter dem Fluoreszenzmikroskop ausgezählt. Mit folgender Formel berechnete sich die Zellzahl: $\text{Summe}/40 = x \text{ Mio. Zellen/ml}$

Vor der Durchführung der weiteren Experimente wurde die Zellzahl auf 1 Mio. Zellen/ml mit RPMI 1640 Medium eingestellt. Dieser Zellsuspension wurden 25 Vol.-% autologes Plasma zugesetzt.

2.3.4 Titration von Antigenen, Positiv- und Negativkontrolle

PPD (tuberculin purified protein derivate) ist ein Antigen, das überwiegend T_{H1}-Zellen stimuliert. Die käuflich erworbene Lösung wurde in der Verdünnung 1:40 eingesetzt.

Das überwiegend T_{H2}-Zellen stimulierende Antigen TT (Tetanus-Toxoid) wurde in der Konzentration von 0,1 IU/ml eingesetzt.

Der Tuberkuloseimpfstoff BCG (Bacillus Calmette-Guérin) stimuliert vor allem die Makrophagenproliferation. Eine Flasche mit 2×10^8 - 3×10^9 Einheiten von BCG wurde in 10 ml RPMI gelöst. Eine 1:8 Verdünnung der BCG-Suspension mit RPMI ergab die Konzentration BCG1000. Hier verwendet wurde die noch einmal 1:10 verdünnte Konzentration BCG100.

Pokeweed Mitogen (PWM) ist ein polyklonales Mitogen pflanzlichen Ursprungs (*Phytolacca americana*, Kermesbeere), das die Aktivierung und Proliferation von B- und T-Zellen bewirkt. In allen Untersuchungen wurde das käuflich erworbene Produkt in einer Verdünnung von 1:40 als Positivkontrolle eingesetzt. Als Negativkontrolle diente jeweils dieselbe Menge an Nährmedium (RPMI 1640).

2.3.5 Konzentrationen des untersuchten Medikamentes

Die vom Hersteller bezogene Lösung von Umckalobo (80 g Pflanzenauszug/100 g) wurde sterilfiltriert, und die Verdünnungen wurden mit Nährmedium (RPMI 1640) angesetzt.

Die höchste eingesetzte Konzentration enthielt 10000 µg Pflanzenauszug/ml (UZT), die weiteren Verdünnungen 1000 µg/ml (UT), 100 µg/ml (UH), 10 µg/ml (UZ), 1 µg/ml (U1) und 0,1 µg/ml (U0,1).

2.3.6 Lymphozytentransformationstest (LTT)

Dieser Test wird zur Analyse der durch spezifische Antigenreize induzierten Lymphozytenproliferation eingesetzt. (Barth, Berg, Klein, 2002)

Für den LTT wurden in einer Mikrotiterplatte mit 96 Vertiefungen je 1×10^5 Zellen pro Vertiefung ausgesät (dies entspricht 5×10^5 Zellen/ml), mit Antigenen und/oder dem zu untersuchenden Medikament versetzt und für sieben Tage bei 37°C und 5% CO_2 kultiviert. Alle Ansätze wurden vierfach angesetzt. Sechzehn Stunden vor Ablauf der Inkubationszeit wurde den Kulturen ^3H -Thymidin (0,74 MBq/ml, 20 μl /Ansatz) zugesetzt. Schließlich wurden die Ansätze mit dem SKATRON Combi Cell Harvester auf Filtermatten überführt, die anschließend für mindestens 3 h getrocknet wurden. Nach dem Einschweißen der Filter und Zugabe der Szintillationsflüssigkeit (ULTIMA Gold) erfolgte die Messung der von den Zellen ausgehenden β -Strahlung in einem Szintillationsmessgerät. Die Zählrate (cpm) diente als Maß für die proliferative Aktivität. Um trotz interindividuell unterschiedlicher Spontanproliferation vergleichbare Werte zu haben, wurde der Stimulationsindex (SI) definiert als Quotient der cpm in Kulturen mit Antigenen und der cpm in Kulturen ohne Antigen.

2.3.7 Durchflusszytometrische Analyse CD69-exprimierender Zellen

Es wurden 5×10^5 PBMC/ml in 24-well Zellkulturplatten (das entspricht 8×10^5 PBMC/Ansatz) bei 37°C und 5% CO_2 mit den verschiedenen Antigenen und dem zu untersuchenden Medikament kultiviert. Nach einem Tag Inkubationszeit wurden die Ansätze in Rundbodenröhrchen überpipettiert. Die Zellen wurden bei 370g abzentrifugiert, zwei Mal mit Waschpuffer gewaschen und in 500 μl Waschpuffer aufgenommen. Diese Zellsuspension wurde gleichmäßig auf fünf Rundbodenröhrchen aufgeteilt, die zuvor mit 5 μl der jeweiligen Antikörpersuspension bestückt worden waren. Das erste Röhrchen enthielt dabei die drei Isotypkontrollen, die anderen vier Röhrchen jeweils eine der oben angegebenen Antikörper-Kombinationen. Pro Röhrchen lagen somit etwa

160.000 Zellen vor. Nach 30-minütiger Inkubation bei RT im Dunkeln wurde die Reaktion mit Waschpuffer abgestoppt. Nach zwei weiteren Waschschrritten wurden die antikörpermarkierten Zellen in 150 µl Waschpuffer und 50 µl Fixierlösung (BD CellFIX™) aufgenommen. Die Messung der von den drei antikörpergekoppelten Farbstoffen ausgehenden Fluoreszenzen erfolgte mit dem BD FACSCalibur™ - Durchflusszytometer. Es wurden pro Röhrchen je 10000 Zellen gezählt. Die Messung und Auswertung wurde mit Hilfe des Programms BD CellQuest™ Pro durchgeführt.

2.3.8 Durchflusszytometrische Analyse proliferierender Zellen

Das Vorgehen richtete sich hierbei nach den Herstellerangaben des FITC BrdU Flow Kit und Angaben aus der Literatur (Mahta und Maino, 1997). Die Zellen wurden kultiviert wie im vorherigen Abschnitt beschrieben, jedoch betrug die Inkubationszeit in diesem Falle sieben Tage. Sechzehn Stunden vor deren Ablauf wurden je 16 µl einer 1-milli-molaren BrdU-Lösung zu jedem Ansatz hinzugefügt, so dass jeweils eine Konzentration von 10 µMol BrdU/ml vorlag. Als Negativkontrolle diente ein PWM-stimulierter Ansatz, der nicht mit BrdU markiert wurde, sondern mit einer äquivalenten Menge an Nährmedium. Nach Ablauf der Inkubationszeit wurden die Zellsuspensionen wie im vorherigen Abschnitt beschrieben gewaschen und auf je fünf Rundbodenröhrchen verteilt. Diese waren zuvor mit PE-markierten Antikörpern bzw. mit einer PE-Isotypkontrolle beschickt worden. Nach 30-minütiger Inkubationszeit wurden die Zellen mit den im FITC BrdU Flow Kit mitgelieferten Pufferlösungen, wie im Herstellerprotokoll beschrieben, fixiert, gewaschen, permeabilisiert, gewaschen und refixiert, jeweils unter Einhaltung der jeweiligen Inkubationszeiten. Nach einem weiteren Waschschrtritt wurden jedem Rundbodenröhrchen je 30 µg DNase zugegeben und diese bei 37° C für eine Stunde inkubiert. Danach wurde das in den Zellen enzymatisch freigesetzte BrdU mit je 50 µl der mitgelieferten Anti-BrdU-Antikörper-Lösung angefärbt. Die als Isotypkontrolle mitgeführten Proben wurden jeweils mit FITC-markierten anti-human IgG1k kontrollgefärbt.

Nach weiteren 20 min Inkubationszeit wurden die Zellen mit je 200 µl Waschpuffer resuspendiert und wie im vorherigen Abschnitt beschrieben mit dem Durchflusszytometer analysiert.

2.3.9 Durchflusszytometrische Analyse regulatorischer T-Zellen

Das Vorgehen richtete sich hierbei nach den Herstellerangaben des *FITC anti-human Foxp3 staining set* und Angaben aus der Literatur (Hori, Nomura, Sakaguchi, 2003). Um dem geringen Anteil an regulatorischen T-Zellen im peripheren Blut Beachtung zu zollen, wurde die Zellzahl bei der Lymphozytenisolierung auf 2 Millionen Zellen/ml eingestellt. Die Inkubationszeit betrug 7 Tage, ansonsten entsprach das Vorgehen dem, wie es in den beiden vorherigen Abschnitten beschrieben wurde. Da die Ansätze nur auf je zwei Rundbodenröhrchen verteilt wurden, lagen pro Röhrchen je 500.000 Zellen vor. Das jeweils erste Röhrchen enthielt die Isotypkontrolle, das jeweils zweite fluoreszenzmarkierte Antikörper gegen CD4 und CD25. Nach 30-minütiger Inkubation wurden die Zellen gemäß den Herstellerangaben fixiert und permeabilisiert, unter Einhaltung der angegebenen Inkubationszeiten. Sodann wurden je 10 µl einer FITC-markierten Isotypkontrolle bzw. FITC-markierter Anti-Foxp3-Antikörper zugegeben und die Zellen für 30 Minuten bei 4°C inkubiert. Nach Resuspendierung mit 200 µl Waschpuffer pro Röhrchen wurden die Zellen mit dem Durchflusszytometer analysiert und der Anteil der dreifachmarkierten Zellen mit Hilfe des Programms BD CellQuest™ Pro bestimmt.

2.3.10 Bestimmung von Zytokinen im Kulturüberstand (Cytokin-ELISA)

Zur Untersuchung der Zytokinproduktion wurden je 5×10^5 PBMC/ml (das entspricht 8×10^5 PBMC/Ansatz) in 24-well Zellkulturplatten bei 37°C, 5% CO₂ mit den verschiedenen Antigenen und Medikamenten kultiviert. Am siebten Tag

wurden die Überstände abpipettiert und bei -20 °C eingefroren. Nach Ablauf einiger Wochen wurden die Überstände mehrerer Versuchsreihen gleichzeitig aufgetaut, um so eine größere Probenzahl für den Cytokin-ELISA zu haben.

Die gegen die zu messenden Zytokine gerichteten Antikörpern wurden, wie vom Hersteller angegeben, in Bicarbonatpuffer verdünnt. Sodann wurden mit jeweils 100 µl der jeweiligen Antikörpersuspension 96-well-Mikrotiterplatten beschichtet und über Nacht bei 4°C inkubiert. Anschließend wurden die Platten drei mal mit Waschpuffer gewaschen und in diesem für 1 h bei RT belassen. Danach wurden die Platten mit jeweils 75 µl der zu untersuchenden Überstände beschichtet und für zwei Stunden bei 37°C inkubiert. Um Vergleichswerte zu erhalten, wurden auf jeder Platte je 100 µl einer Standard-Verdünnungsreihe mit acht Verdünnungsstufen mitgeführt. Nach erneutem dreimaligem Waschen wurden je 100 µl einer Suspension mit biotinylierten Antikörper zugegeben, die zuvor nach Herstellerangaben verdünnt worden waren. Nach weiteren 90 Minuten Inkubation bei 37°C erfolgte die Zufuhr von je 25 µl Avidin-gekoppelter Peroxidase (2,5 µg/ml Waschpuffer). Nach 40-minütiger Inkubation bei 37°C wurden je 150 µl der Substrat-Lösung (0,5 mg O-Phenyldiamin/ml Citratpuffer) dazugegeben und die sofort einsetzende, durch Verfärbung sichtbare, enzymatische Reaktion individuell nach der optimalen Zeit mit 25%iger Schwefelsäure abgestoppt. Als Maß der Reaktion wurde die Extinktion bei 450 nm in einem ELISA-Reader gemessen. Mit Hilfe des Computerprogramms Easyfit wurden die gemessenen Extinktionen mit der jeweils errechneten Standardkurve abgeglichen. Die so errechnete Menge des entsprechenden Zytokins wurde in pg/ml angegeben.

2.3.11 Kinetische Analyse der untersuchten Immunreaktionen

Um die Kinetik der untersuchten proliferativen und sekretorischen Vorgänge innerhalb der ersten Tage besser erfassen zu können, wurden zum selben Zeitpunkt sechs identische LTT-Ansätze in 96-well-Mikrotiterplatten erstellt, denen unterschiedliche Inkubationszeiten zugewiesen wurden: 2, 4, 5, 6, 7 bzw.

8 Tage. Jeweils 16h vor deren Ablauf wurden die Überstände vorsichtig abpipettiert und die Zellen mit ^3H -Thymidin radioaktiv markiert. Die Überstände wurden bei $-20\text{ }^\circ\text{C}$ eingefroren und später mittels des oben beschriebenen Zytokin-ELISA untersucht, die Zellkulturen wurden nach Ablauf der jeweiligen Inkubationszeit auf Filtermatten überführt und die von den Zellen ausgehende Radioaktivität gemessen. Dabei war das Vorgehen identisch mit dem, welches im Abschnitt 2.3.6 erläutert wurde.

2.3.12 Statistische Auswertung der untersuchten Immunreaktionen

Die statistische Auswertung wurde mit dem Wilcoxon-Test durchgeführt. Dieser ist ein nicht-parametrischer Test für gepaarte Stichproben. Verglichen wurde jede Konzentration mit der jeweiligen Null-Konzentration. Als signifikant wurden dabei p - Werte < 0.05 gewertet.

Zur schnellen Orientierung sind in den Diagrammen p-Werte < 0.05 mit *, Werte < 0.01 mit ** und Werte < 0.001 mit *** gekennzeichnet.

3 ERGEBNISSE

3.1 Einfluss von Umckaloabo auf die Proliferation von PBMC

3.1.1 Kinetik der Zellproliferation (Tab. 1 und 2)

Die bei einem Probanden (Allergiker, T_{H2}-Typ) untersuchte Kinetik zeigte, dass die proliferative Reaktion auf Umckaloabo in den Konzentrationen UH und UT am Tag 4 begann, sich aber bis zum Tag 8 noch deutlich steigerte, während bei der hohen Konzentration UZT diese Steigerung ausblieb.

Die Reaktion auf den Stimulus BCG erfolgte ebenso ab Tag 4, sank aber zum Tag 8 hin schon wieder ab. Die Umckaloabo-Konzentrationen UZ, UH vermochten dabei ab Tag 6, UT und UZT bereits ab Tag 4 die BCG-induzierte Proliferation zu hemmen. Bei der hohen Konzentration UZT wurde die Proliferation dabei sehr deutlich gehemmt (siehe Tab. 1).

	Spontan	PW-Mitogen	Umckaloabo						BCG H + Umckaloabo						
			0,1	1	Z	H	T	ZT	0	0,1	1	Z	H	T	ZT
Tag 2	71	269	101	93	95	110	110	115	90	100	98	105	105	110	120
		3,8	1,4	1,3	1,4	1,5	1,5	1,6	1,3	1,4	1,5	1,5	1,5	1,6	1,7
Tag 4	107	17267	132	159	184	330	574	473	6577	8784	7861	7255	6930	5521	1324
		160	1,2	1,5	1,7	3,1	5,4	4,4	61,3	81,8	73,2	67,6	64,5	51,4	12,3
Tag 5	104	29381	211	169	196	361	780	461	16154	16934	16184	1490	15855	11045	2175
		282	2	1,6	1,9	3,5	7,5	4,4	155	163	155	143	152	106	21
Tag 6	193	27673	160	136	162	1403	3438	1105	34267	31732	31842	30658	25365	25961	5010
		143	0,8	0,7	0,8	7,3	17,8	5,7	177	164	165	159	131	134	26
Tag 7	210	21541	253	184	134	2208	3045	1248	35075	33758	31463	36288	28554	22750	3865
		103	1,2	0,9	0,7	10,5	14,5	5,9	167	161	150	173	136	108	18,4
Tag 8	286	11837	190	237	201	3080	10184	743	25328	25448	26671	20270	18542	18081	4271
		41,3	0,7	0,8	0,7	10,8	35,5	2,6	88,4	88,8	93,1	70,7	64,7	63,1	14,9

Tab. 1: Kinetik der proliferativen Antwort innerhalb der ersten Woche. Der obere Wert gibt die Zählrate in cpm an, der untere Wert den auf den Spontanwert bezogenen Stimulationsindex (SI).

Die Reaktion auf den Stimulus TT erfolgte langsamer als bei BCG, sie steigerte sich jeweils bis zum Tag 8. Ab Tag 7 war die Verstärkung der Reaktion durch Umckaloabo in den Konzentrationsstufen UH, UZ und UT deutlich zu erkennen, ab Tag 8 auch in der Konzentration U1. Dagegen hemmte die Konzentrationsstufe UZT die TT-induzierte Proliferation schon ab Tag 4.

Während PPD alleine bei diesem Probanden keine Reaktion zeigte, konnten ab der Konzentration UH deutlich positive Stimulationsindizes verzeichnet werden. Fraglich bleibt, welcher Anteil der so gemessenen Proliferation von PPD ausging, da Umckaloabo alleine schon zu ähnlichen Stimulationsindizes führte (siehe Tab. 2).

	Tetanus 1:100 + Um.							PPD 5 + Um.						
	0	0,1	1	Z	H	T	ZT	0	0,1	1	Z	H	T	ZT
Tag 2	112	111	118	113	122	121	125	98	100	89	95	123	123	138
	1,3	1,3	1,4	1,3	1,4	1,4	1,5	1,2	1,2	1	1,1	1,4	1,5	1,6
Tag 4	1557	1622	1118	1347	1424	2198	822	122	139	143	169	293	1542	781
	13,5	14,1	9,7	11,7	12,4	19,1	8	1,1	1,2	1,3	1,5	2,6	13,4	6,8
Tag 5	3056	2917	2635	3451	3772	2715	881	108	127	124	145	602	1032	444
	29,7	28,4	25,6	33,6	36,7	26,4	8,6	1,05	1,21	1,21	1,4	5,9	10	4,3
Tag 6	4100	3254	2155	3387	4201	4233	1501	123	150	185	138	818	2286	899
	27,4	21,8	14,4	22,6	28,1	28,3	10	0,8	1	1,2	0,9	5,5	15,3	6
Tag 7	4640	5259	4011	7249	17780	16950	1879	117	130	164	270	1585	5385	1166
	25,4	28,8	22	39,8	97,5	92,9	10,3	0,7	0,7	0,9	1,5	8,7	29,5	6,4
Tag 8	8116	7553	10884	9335	19066	17346	2407	137	150	166	160	5344	11094	1385
	38,4	35,7	51,5	44,1	90,2	82	11,4	0,7	0,7	0,8	0,8	25,2	52,5	6,6

Tab. 2: Kinetik der proliferativen Antwort innerhalb der ersten Woche. Der obere Wert gibt die Zählrate in cpm an, der untere Wert den auf den jeweiligen Spontanwert bezogenen Stimulationsindex (SI).

3.1.2 Einfluss von Umckaloabo ohne Kostimulation der PBMC (Abb.3 und 4)

Aus der Erfahrung der Allergiediagnostik ist bekannt, dass SI-Werte von über 3 als positive Testreaktion gewertet werden können (Berg et al. 1988). Von den zwanzig Probanden zeigten bei der Konzentration UZ sieben, bei der Konzentration UH dreizehn eine solche positive Reaktion. Sechs der Probanden zeigten in keiner Konzentration Werte über 3, davon aber die Hälfte immerhin Werte über 2. Sieben Probanden dagegen wiesen sehr hohe Stimulationsindizes auf mit Werten über 10. Bei der Konzentrationsstufe UH stieg der SI im Mittel auf das 13-fache an, wenn auch bei großer Standardabweichung. Bei den Konzentrationen UT und UZT nahmen die Werte bei allen Probanden wieder ab, blieben aber deutlich über dem Ausgangswert.

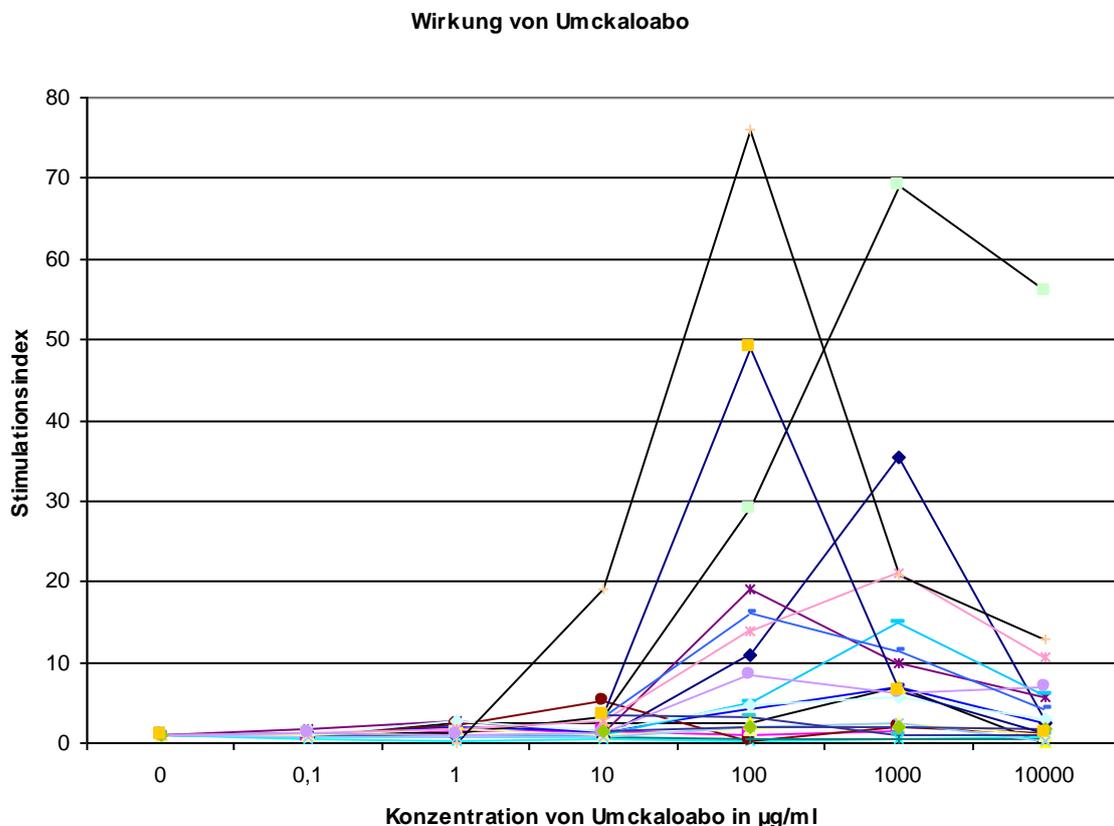


Abb. 3: Vergleich der proliferativen Reaktion auf Umckaloabo bei verschiedenen Probanden in Abwesenheit anderer Antigene .

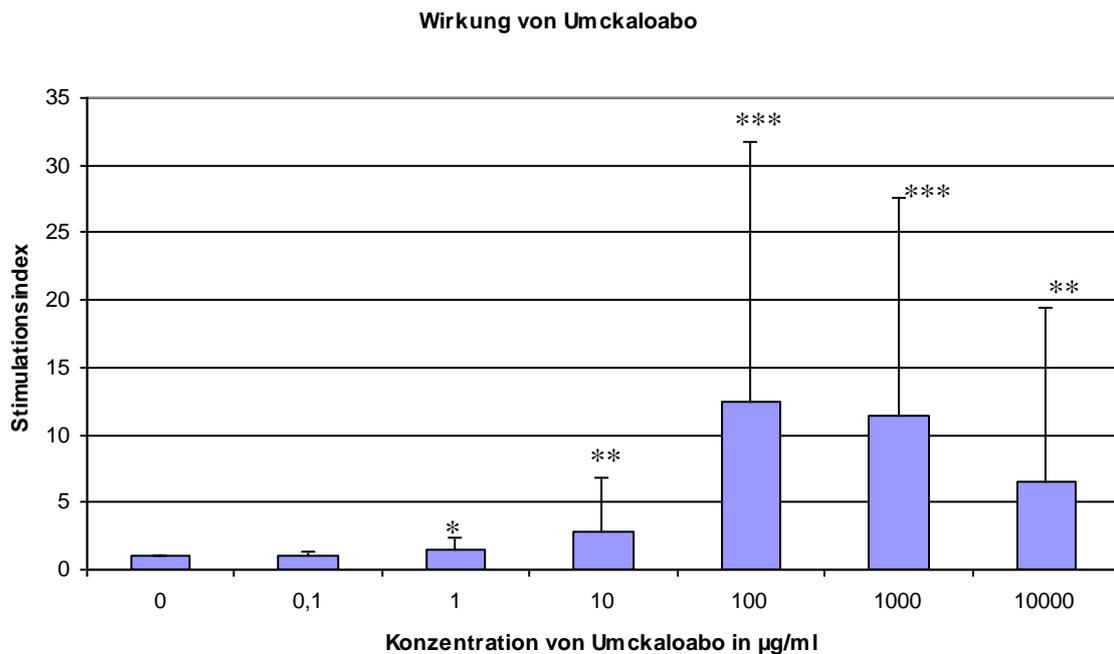


Abb. 4: Vergleich der proliferativen Reaktion auf Umckaloabo bei verschiedenen Probanden in Abwesenheit anderer Antigene. Gemittelte Werte von zwanzig Probanden unter Angabe der Standardabweichung. Statistisch signifikante p-Werte sind folgendermaßen gekennzeichnet: $p < 0.05$ mit *, $p < 0.01$ mit ** und $p < 0.001$ mit ***.

3.1.3 Einfluss von Umckaloabo nach Kostimulation der PBMC durch BCG (Abb. 5)

Die Stimulationindizes durch BCG alleine nahmen bei den zwanzig Probanden Werte zwischen 8 und 451 an. Durch die Zugabe von Umckaloabo änderten sie sich nur wenig. Um die Reaktionen verschiedener Probanden vergleichen zu können, wurde der SI bei alleiniger Anwesenheit von BCG jeweils mit einer „relativen Proliferation“ von 1 gleichgesetzt (Abb.5). So lässt sich deutlich erkennen, dass in Anwesenheit von Umckaloabo bei den hohen Konzentrationen UT und UZT eine Verminderung der proliferativen Antwort zu verzeichnen war. In den niedrigeren Konzentrationen schien Umckaloabo dagegen keinen Einfluss auf die Proliferation in Anwesenheit des starken Kostimulus BCG auszuüben.

Wirkung von Umckaloabo bei Kostimulation mit BCG

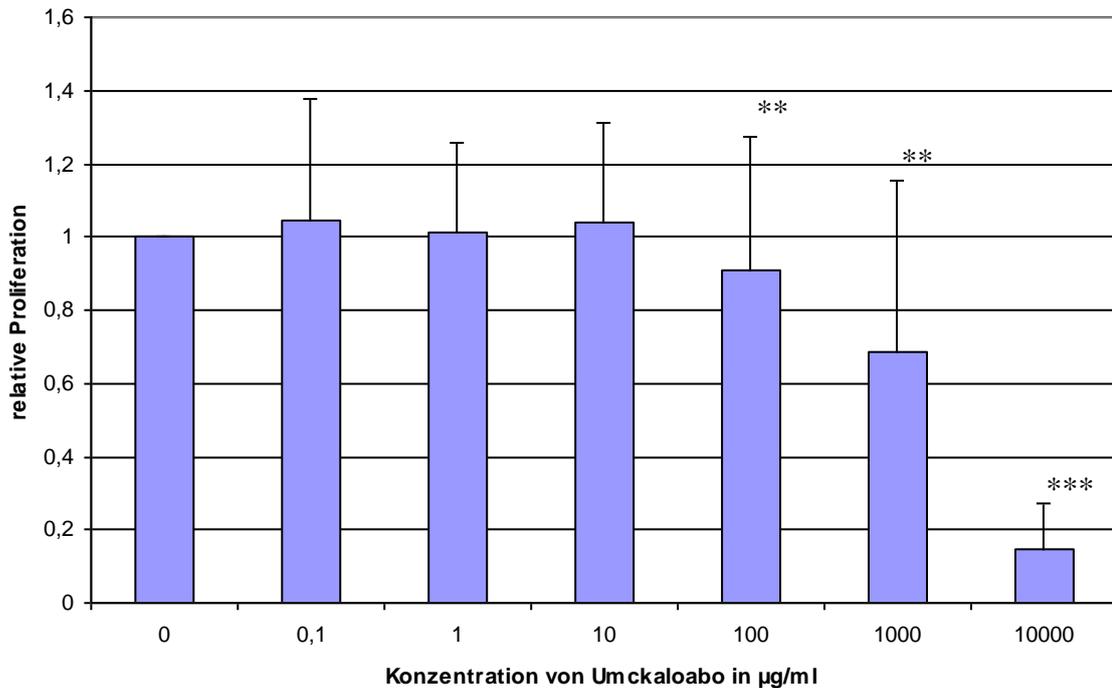


Abb. 5: Relative Proliferation der Zellen unter Kostimulation durch BCG H bei unterschiedlichen Konzentrationen von Umckaloabo. Gemittelte Werte von zwanzig Probanden unter Angabe der Standardabweichung. Statistisch signifikante p-Werte sind folgendermaßen gekennzeichnet: $p < 0.05$ mit *, $p < 0.01$ mit ** und $p < 0.001$ mit ***.

3.1.4 Einfluss von Umckaloabo nach Kostimulation der PBMC durch TT (Abb. 6 und 7)

Die Stimulationsindizes durch TT alleine nahmen bei den zwanzig Probanden Werte zwischen 7 und 268 an. Obwohl also in ähnlichen Dimensionen gelegen wie bei Kostimulation durch BCG, konnten sie durch die Zugabe von Umckaloabo bei der Konzentration UH im Durchschnitt auf das Doppelte gesteigert werden. Alle Kurven zeigen dabei einen bemerkenswert synchronen Verlauf (Abb.6): Die stärkste Proliferation ist jeweils bei UH, bei noch höheren Konzentrationen fallen die Stimulationsindizes wieder ab.

Wirkung von Umckaloabo bei Kostimulation mit TT

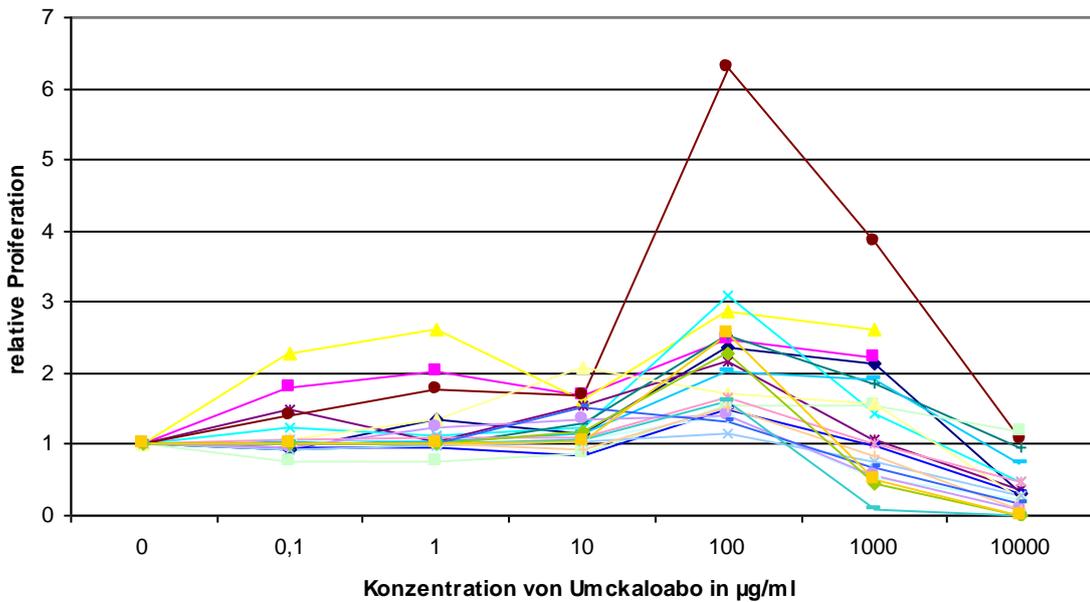


Abb. 6: Relative Proliferation der Zellen unter Kostimulation durch TT bei unterschiedlichen Konzentrationen von Umckaloabo. Werte von zwanzig Probanden.

Wirkung von Umckaloabo bei Kostimulation mit TT

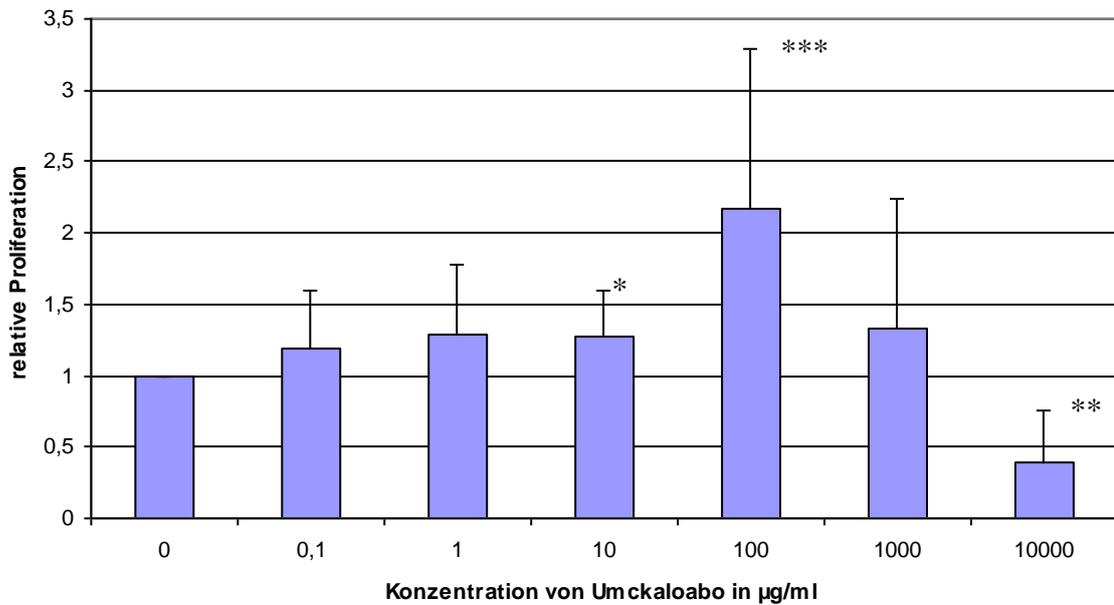


Abb. 7: Relative Proliferation der Zellen unter Kostimulation durch TT bei unterschiedlichen Konzentrationen von Umckaloabo. Gemittelte Werte von zwanzig Probanden unter Angabe der Standardabweichung. Statistisch signifikante p-Werte sind folgendermaßen gekennzeichnet: $p < 0.05$ mit *, $p < 0.01$ mit ** und $p < 0.001$ mit ***.

3.1.5 Einfluss von Umckaloabo nach Kostimulation der PBMC durch PPD (Abb. 8, 9, 10)

Die alleinige Stimulation durch das spezifisch auf T_{H1}-Zellen einwirkende Antigen PPD bewirkte nur bei vier von sechzehn Probanden eine eindeutig positive Reaktion. Dieses Problem, nur wenige T_{H1}-Responder in einer Stichprobe zu haben, ist in unserem Labor bekannt. Durch die Zugabe von Umckaloabo konnte aber bei allen Probanden eine deutliche Steigerung der Proliferation bewirkt werden (Abb. 8 und 9). Dabei gab es aber ebenso große interindividuelle Unterschiede wie bei der Reaktion auf Umckaloabo ohne Kostimulus (vgl. Abb. 3). Das Ausmaß der Proliferationssteigerung korrelierte mit der Steigerung, die durch Umckaloabo alleine verursacht wurde: Die Probanden, bei denen Umckaloabo alleine schon zu Stimulationsindizes über 10 geführt hatte, wiesen jeweils auch eine Vervielfachung der durch PPD stimulierten relativen Proliferation von über 10 auf. Dies erkennt man nicht nur daran, dass Abb. 4 und Abb. 9 sich nahezu gleichen, sondern auch in der direkten Gegenüberstellung der jeweiligen absoluten Stimulationsindizes (Abb. 10).

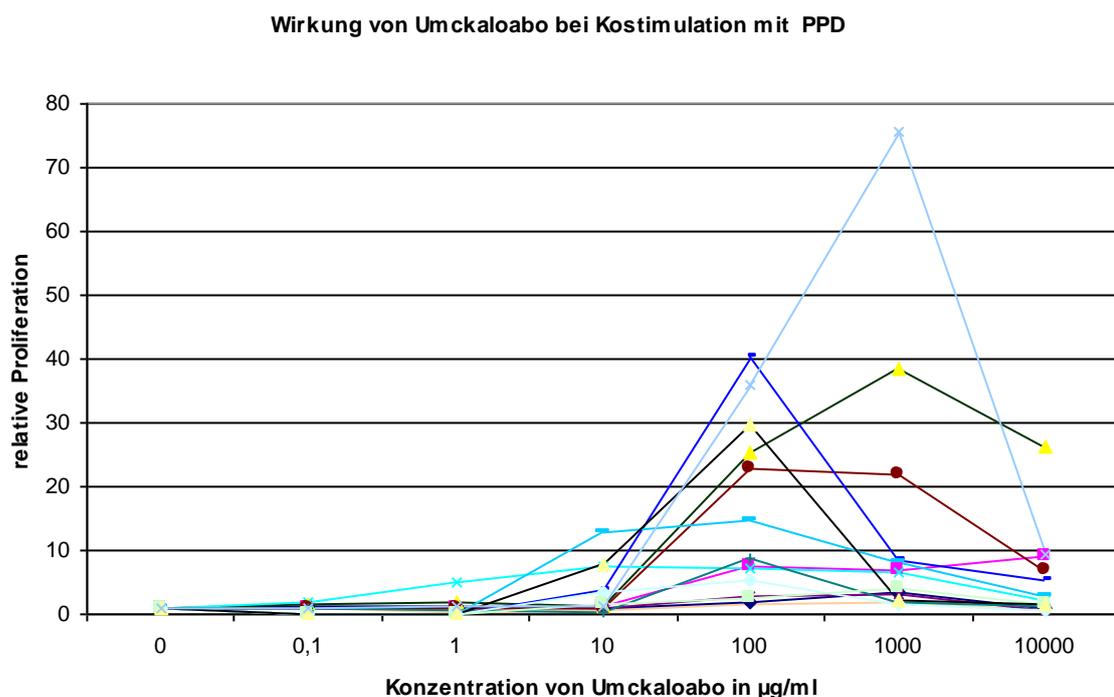


Abb. 8: Relative Proliferation der Zellen unter Kostimulation durch PPD bei unterschiedlichen Konzentrationen von Umckaloabo. Werte von 16 Probanden.

Wirkung von Umckaloabo bei Kostimulation durch PPD

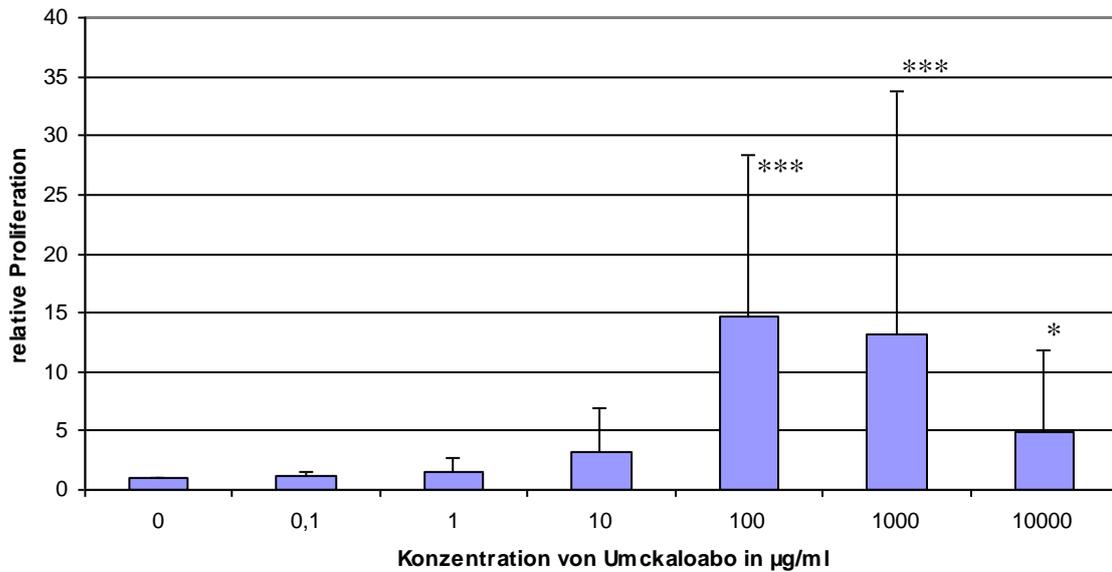


Abb. 9: Relative Proliferation der Zellen unter Kostimulation durch PPD bei unterschiedlichen Konzentrationen von Umckaloabo. Gemittelte Werte von 16 Probanden unter Angabe der Standardabweichung. Statistisch signifikante p-Werte sind folgendermaßen gekennzeichnet: $p < 0.05$ mit *, $p < 0.01$ mit ** und $p < 0.001$ mit ***.

Wirkung von Umckaloabo mit bzw. ohne Kostimulation von PPD

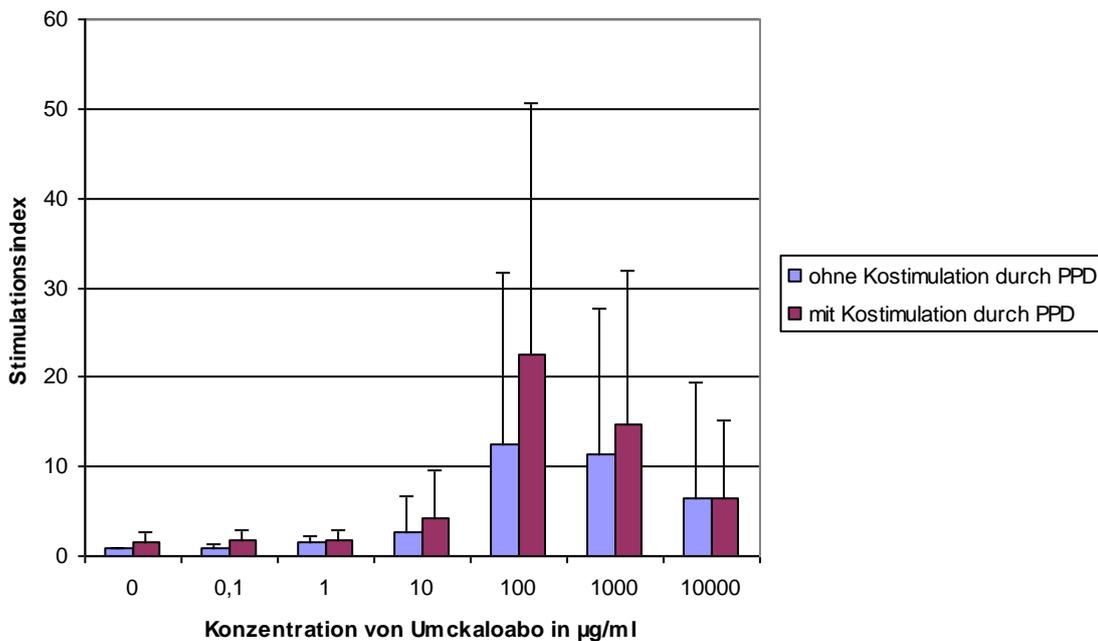


Abb.10: Direkter Vergleich der absoluten Stimulationsindizes ohne Kostimulation (gemittelte Werte von 20 Probanden) bzw. mit Kostimulation durch PPD (gemittelte Werte von 16 Probanden).

3.1.6 Durchflusszytometrische Analyse der Zellproliferation (Tab. 3)

Trotz der eindeutigen Aussage der LTT-Auswertung, dass die Teilungsaktivität der kultivierten Zellen ansteigt, kann aus diesem Test nicht auf die Art der proliferierenden Zellen geschlossen werden. Dazu wurde eigens eine durchflusszytometrische Untersuchung durchgeführt, mit der am Tag 7 gleichzeitig die extrazellulären Marker CD4, CD8, CD19 und CD56 detektiert und die proliferative Aktivität mittels BrdU nachgewiesen werden konnten. Doppeltmarkierte Zellen stellen somit proliferierende Zellen dar. Da proliferierende Zellen größer als ruhende Lymphozyten sind, wurden bei der durchflusszytometrischen Auswertung die Auswahlfenster sehr groß gesetzt und Zellen bis zu FSC-Werten von 1000 in die Zielpopulation miteingeschlossen. Auffällig war, dass die errechneten „spezifischen Stimulationsindizes“ meist deutlich unter den im parallel angesetzten LTT bestimmten Stimulationsindizes lagen. Dies ist durch die unterschiedliche Art der verwendeten Sonde (Thymidin bzw. BrdU) und der Detektion (Radioaktivität bzw. antikörpergekoppelte Fluoreszenz) begründet. Außerdem fiel auf, dass bei niedrigem SI trotzdem schon erhöhte spezifische Stimulationen zu detektieren waren. Dies erklärt sich durch die höhere Sensitivität der BrdU-Methode, die nicht wie die radioaktive Methode eine hohe Hintergrund-DNS-Synthese aufweist (Zhu et al. 2004).

	Absoluter Anteil doppelmarkierter Zellen				"Spezifischer SI"				SI im LTT
	CD 4	CD 8	CD 19	CD 56	CD 4	CD 8	CD 19	CD 56	
spontan	0,51	0,2	0,13	0,34	1	1	1	1	1
PWM	9,05	10,9	0,68	9,82	17,7	54,5	5,23	28,9	97
Umc ZT	0,42	0,26	0,51	0,75	0,82	1,3	3,92	2,21	2,1
Umc T	0,46	0,29	0,25	0,64	0,9	1,45	1,92	1,88	21,5
Umc H	3,11	0,79	0,39	1,52	6,1	3,95	3	4,47	10,4
Umc Z	0,61	0,43	0,19	0,25	1,2	2,15	1,46	0,74	0,9
BCG + Umc ZT	0,52	0,43	0,57	0,41	1,02	2,15	4,38	1,21	2
BCG + Umc T	1,79	2,86	0,75	8,34	3,51	14,3	5,77	24,5	113
BCG + Umc H	1,54	3,38	0,49	10,05	3,02	16,9	3,77	29,6	185
BCG + Umc Z	0,96	3,57	0,19	8,37	1,88	17,85	1,46	24,6	199
BCG H	1,39	4,09	0,06	8,75	2,73	20,45	0,46	25,7	321
Tet + Umc ZT	0,49	0,75	0,58	0,82	0,96	3,75	4,46	2,41	1,3
Tet + Umc T	2,6	3,36	0,46	6,14	5,1	16,8	3,54	18,1	60
Tet + Umc H	15,43	4,48	0,4	6,69	30,3	22,4	3,08	19,7	130
Tet + Umc Z	4,37	2,04	0,37	3,5	8,57	10,2	2,85	10,3	36,3
Tet. 1:100	3,48	1,46	0,22	1,92	6,82	7,3	1,69	5,65	43,6
PPD + Umc ZT	0,51	0,16	0,42	0,43	1	0,8	3,23	1,26	1,7
PPD + Umc T	0,42	0,35	0,09	0,95	0,82	1,75	0,69	2,79	8,6
PPD + Umc H	2,9	0,46	0,32	1,43	5,69	2,3	2,46	4,21	6,7
PPD + Umc Z	0,76	0,31	0,28	0,86	1,49	1,55	2,15	2,53	0,9
PPD	0,29	0,29	0,33	0,24	0,57	1,45	2,54	0,71	0,9

Tab. 3: Durchflusszytometrische Analyse der Proliferation. Im linken Teil der Tabelle die prozentualen Anteile proliferierender Zellen der jeweiligen Zellpopulation an der Gesamtzahl intakter PBMC. Im rechten Teil wurde die jeweilige Spontanproliferation gleich 1 gesetzt und die entsprechenden relativen Werte als „spezifischer SI“ bezeichnet.

Dabei zeigte sich, dass sowohl ohne Kostimulus als auch in den Antigenkombinationen mit TT und PPD insbesondere die CD4-positiven Zellen durch Umckaloabo zur Proliferation angeregt wurden, und zwar bis einschließlich zur Konzentration UH. Ohne Kostimulation stieg ihr spezifischer SI um den Faktor 6 an, bei Kostimulation mit TT um den Faktor 4, bei Kostimulation mit PPD sogar um den Faktor 10.

Bei den CD8-positiven und CD56-positiven Zellen war dieser Effekt ebenfalls deutlich zu sehen, doch insgesamt etwas schwächer: bei den CD8-positiven Zellen vergrößerte sich der spezifische SI um den Faktor 4,5 ohne Kostimulation, bei Kostimulation durch TT um den Faktor 3 und bei Kostimulation durch PPD um den Faktor 6.

Sehr ähnlich verhielt es sich mit den CD56-positiven Zellen: ihr spezifischer SI stieg um den Faktor 4,5 ohne Kostimulation, bei Kostimulation mit TT um den Faktor 3,5 und bei Kostimulation mit PPD um den Faktor 6.

Bei den noch höheren Konzentrationen UT und UZT fiel die Proliferationsrate dieser Zellen wieder ab. In diesen hohen Konzentrationen stieg nur der spezifische SI der CD19-positiven Zellen an - ein Effekt, der in dieser extrem hohen Konzentration des Medikaments möglicherweise durch winzige LPS-Spuren zustande kommen könnte, die als B-Zell-Mitogen wirken (Yazawa et al. 2003). Demgegenüber steht die Untersuchung des Endotoxingehaltes der verwendeten Umckaloabo-Probe: Im Limulus-Amöbozyten-Lysat-Test (LAL), der eine Sensitivität von 0,06 U/ml aufweist, konnten wir kein Endotoxin detektieren. In niedrigeren Konzentrationen wie beispielsweise bei UH erhöhte sich der spezifische SI der CD19-positiven Zellen nur um den Faktor 3 ohne Kostimulation, um den Faktor 2 bei Kostimulation mit TT und überhaupt nicht bei PPD als Kostimulus.

Bei der Kostimulation durch BCG änderte sich an der spezifischen Stimulation von CD4-positiven Zellen und CD56-positiven Zellen fast nichts, während die der CD8-positiven Zellen abnahm. Nur die Anzahl der proliferierenden CD19-positiven Zellen stieg bei der Konzentration UT auf das zehnfache an, allerdings bei niedriger absoluter Zellzahl.

3.2 Einfluss von Umckaloabo auf die CD69-Expression von PBMC

Um die Expression des frühen Aktivierungsmarkers CD69 am besten erfassen zu können, wurde dieser schon nach 18 – 24h Zellkulturdauer untersucht (Borges et al., 2007). Durch diese kurze Inkubationszeit konnten allerdings kaum proliferative Ereignisse stattfinden, wie die Proliferationskinetik nahelegt. So zeigten sich in der durchflusszytometrischen Auswertung auch erwartungsgemäß nur geringste Verschiebungen des prozentuellen Anteils der Zellpopulationen CD4, CD8, CD19 und CD56, die unsystematisch und zufallsbedingt erscheinen. Deswegen beschränkt sich die Darstellung der Ergebnisse hier auf die Expressionsstärke des Aktivierungsmarkers CD69. Dieser ist im übrigen nicht gleichzusetzen mit proliferativer Aktivität (Borges *et al.*, 2007).

Bei der durchflusszytometrischen Auswertung wurde das Auswahlfenster um die Lymphozytenpopulation gesetzt, die im Punktdiagramm von Zellgröße (FSC) und Granularität (SSC) deutlich als Population von ihrer Umgebung abzugrenzen ist. Als aussagekräftigster Parameter wurde der absolute Prozentsatz an doppelpositiven Zellen (CD69 + CD4/CD8/CD19/CD56) innerhalb der Lymphozytenpopulation betrachtet. Um die Expression von CD69 zwischen unterschiedlichen Zellpopulationen und Individuen besser vergleichen zu können, wurden die in Abwesenheit von Umckaloabo ermittelten absoluten Prozentsätze gleich 1 gesetzt und als „relativer Anteil“ doppelpositiver Zellen bezeichnet. Die gezeigten Schaubilder gründen jeweils auf diesen Werten.

3.2.1 Einfluss von Umckaloabo ohne Kostimulation der PBMC (Abb. 11-14)

Im Vergleich zu den Ergebnissen des LTT fiel bei allen vier untersuchten Zellpopulationen auf, dass hier bei den Konzentrationen U0,1 bis UH nur bei einzelnen Probanden die Expression von CD69 anstieg. Die Probanden mit schwacher Reaktion in der Proliferation zeigten auch in der Durchflusszytometrie keinen oder nur einen schwachen Anstieg der CD69-

Expression, insgesamt jedoch fielen die Veränderungen der CD69-Expression geringer aus als dies von der proliferativen Aktivität her zu erwarten gewesen wäre. Dies wird aber auch von anderen Arbeitsgruppen in der Literatur berichtet (Borges *et al.*, 2007). Insgesamt waren im Vergleich zur Proliferation nach sieben Tagen die erkennbaren Effekte bei der CD69-Expression am zweiten Tag bei allen Probanden wesentlich schwächer, vor allem bei den niedrigen Umckaloabo-Konzentrationen. Desweiteren lag, anders als bei den LTT-Ergebnissen, bei der höchsten Umckaloabo-Konzentration UZT fast durchgehend auch die höchste CD69-Expression vor, so dass man den Eindruck erhält, die Kurve der CD69-Expression sei im Vergleich zur Proliferationskurve um zwei Verdünnungsstufen nach rechts verschoben. Dies liegt zum einen sicherlich an den unterschiedlichen Untersuchungszeitpunkten: Die Proliferationskinetik konnte zeigen, dass am Tag 2 die höchste Umckaloabo-Konzentration UZT auch zur höchsten Proliferationsrate führte (Tab.1), wenn diese mit einem SI von 1,6 auch sehr niedrig war. Ab dem Tag 4 kehrte sich dieses Verhältnis im Vergleich zu den Konzentrationen UH und UT um, und hemmende bzw. toxische Effekte der hohen Konzentration traten zu Tage (siehe Abschnitt 4.1). Andererseits scheint die CD69-Detektion am Tag 2 weniger sensitiv als die radioaktive Thymidin-Detektion am Tag 7 zu sein. So wird trotz langjähriger Bemühungen um den Ersatz durch die schnellere CD69-Methode auch in unserem Labor immer noch der LTT zur Diagnostik von Medikamenten-Allergien eingesetzt.

Die Mittelwerte der jeweiligen CD69-Expression zeigen bei allen vier untersuchten Lymphozytenpopulationen einen eindeutigen Anstieg zu den hohen Konzentrationen hin. Dabei ist der besonders hohe Anstieg der CD69-Expression bei den CD19-positiven Zellen auffällig. Diese äußerst starke Ansprache der B-Zellen auf die Konzentrationsstufe UZT bestätigt damit die Ergebnisse der unter 3.3 beschriebenen durchflusszytometrischen Proliferationsanalyse und könnte wieder auf Vorliegen winziger Mengen von LPS hindeuten. Bei physiologisch eher erreichbaren Konzentrationen traten die signifikanten Expressionssteigerungen von CD8- bzw. CD56-positiven Zellen bei einer Konzentration von 100 µl/ml hervor (Abb.12 und Abb.14).

Wirkung von Umckaloabo auf die Aktivierung von CD4-positiven Zellen

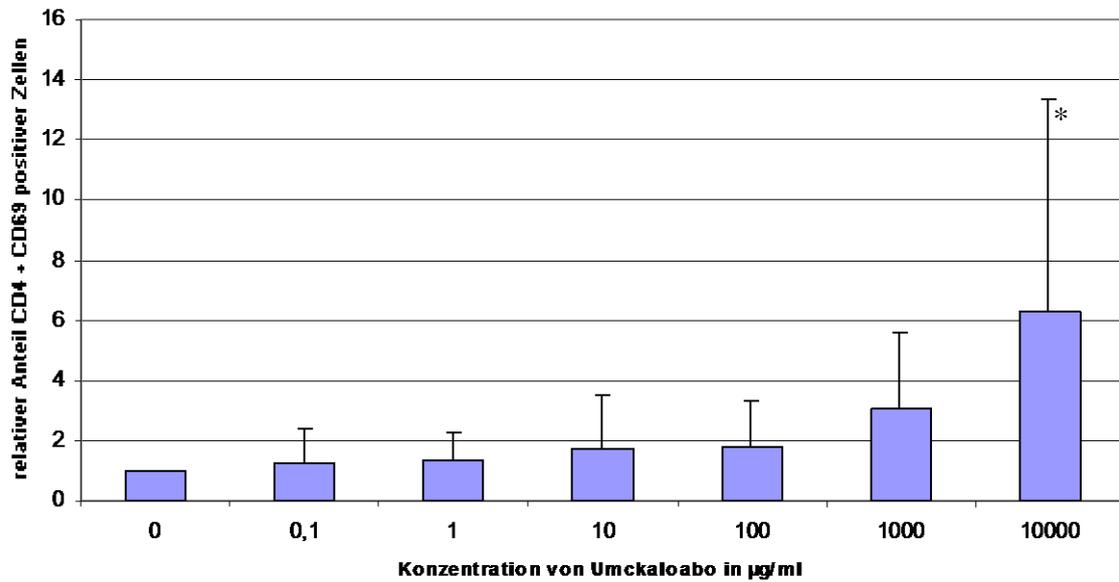


Abb. 11: Relativer Anteil CD4+CD69 doppelpositiver Zellen bei unterschiedlichen Konzentrationen von Umckaloabo ohne weiteren Kostimulus. Gemittelte Werte von zwanzig Probanden unter Angabe der Standardabweichung. Statistisch signifikante p-Werte sind folgendermaßen gekennzeichnet: $p < 0.05$ mit *, $p < 0.01$ mit ** und $p < 0.001$ mit ***.

Wirkung von Umckaloabo auf die Aktivierung von CD8-positiven Zellen

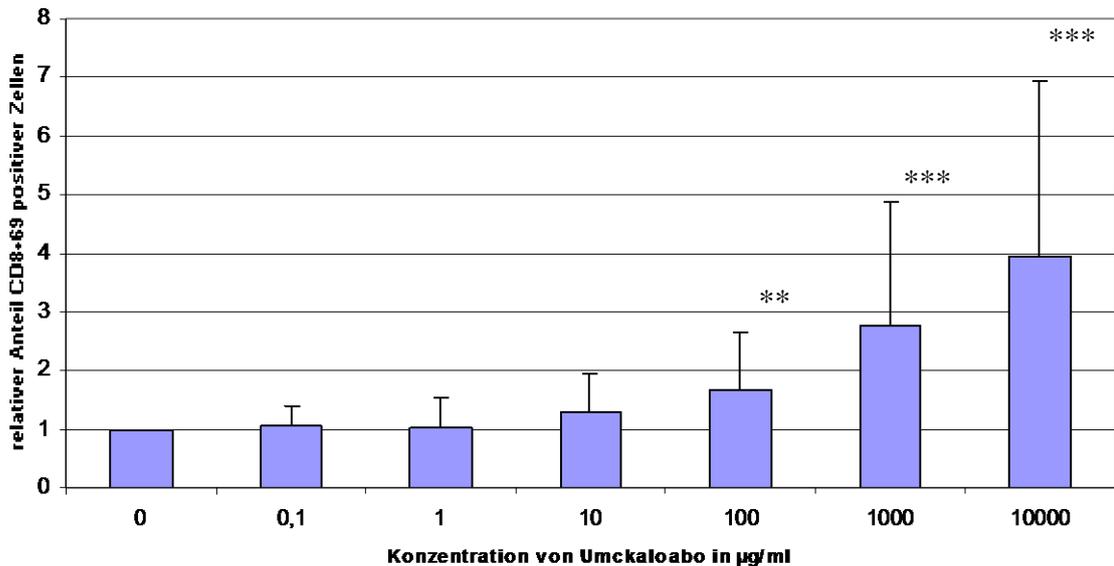


Abb. 12: Relativer Anteil CD8+CD69 doppelpositiver Zellen bei unterschiedlichen Konzentrationen von Umckaloabo ohne weiteren Kostimulus. Gemittelte Werte von zwanzig Probanden unter Angabe der Standardabweichung. Statistisch signifikante p-Werte sind folgendermaßen gekennzeichnet: $p < 0.05$ mit *, $p < 0.01$ mit ** und $p < 0.001$ mit ***.

Wirkung von Umckaloabo auf die Aktivierung von CD19-positiven Zellen

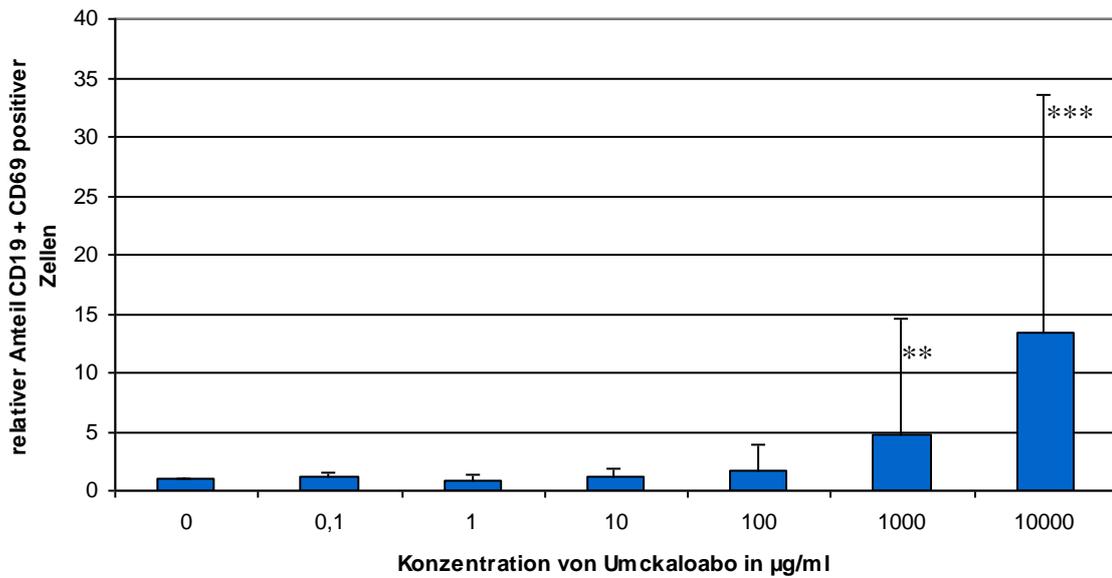


Abb. 13 Relativer Anteil CD19+CD69 doppelpositiver Zellen bei unterschiedlichen Konzentrationen von Umckaloabo ohne weiteren Kostimulus. Gemittelte Werte von zwanzig Probanden unter Angabe der Standardabweichung. Statistisch signifikante p-Werte sind folgendermaßen gekennzeichnet: $p < 0.05$ mit *, $p < 0.01$ mit ** und $p < 0.001$ mit ***.

Wirkung von Umckaloabo auf die Aktivierung von CD56-positiven Zellen

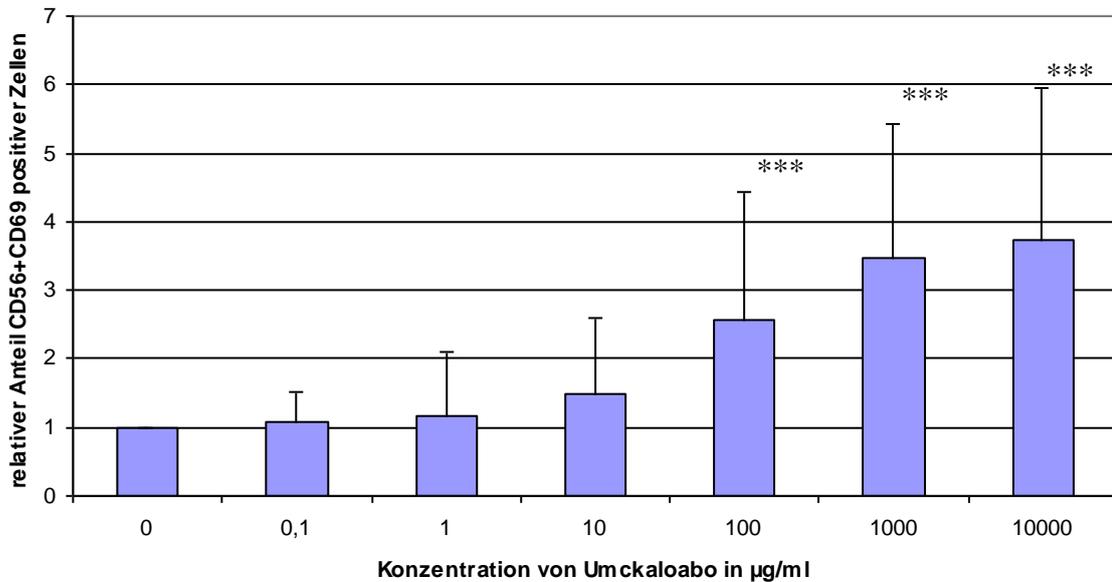


Abb. 14: Relativer Anteil CD56+CD69 doppelpositiver Zellen bei unterschiedlichen Konzentrationen von Umckaloabo ohne weiteren Kostimulus. Gemittelte Werte von zwanzig Probanden unter Angabe der Standardabweichung. Statistisch signifikante p-Werte sind folgendermaßen gekennzeichnet: $p < 0.05$ mit *, $p < 0.01$ mit ** und $p < 0.001$ mit ***.

3.2.2 Einfluss von Umckaloabo bei Kostimulation der PBMC durch BCG (Abb. 15-18)

Ähnlich wie bei den Ergebnissen der Proliferation zeigte sich nur eine geringe Beeinflussung der CD69-Expression durch Umckaloabo bei Kostimulation mit BCG. Bei den CD4-positiven Zellen war zu den höheren Konzentrationen von Umckaloabo hin eine leichte Expressionsminderung zu erkennen (signifikant ab UT). Die Populationen von CD8- und CD56-Zellen schienen nicht beeinflusst zu werden, während CD19-positive Zellen bei höheren Konzentrationen von Umckaloabo zu einer minimalen Steigerung der CD69-Expression tendierten. Dies entspricht weitgehend den unter 3.3 beschriebenen Ergebnissen der durchflusszytometrischen Proliferations-Analyse.

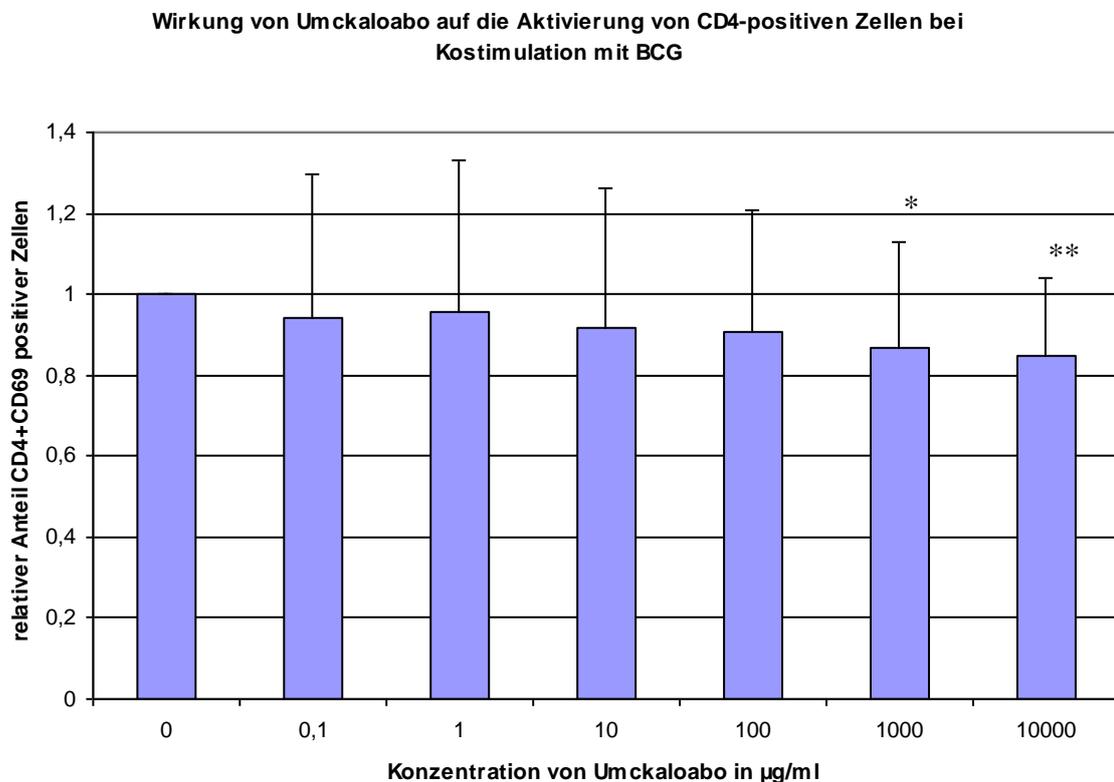


Abb. 15: Relativer Anteil CD4+CD69 doppelpositiver Zellen bei Kostimulation mit BCG und unterschiedlichen Konzentrationen von Umckaloabo. Gemittelte Werte von zwanzig Probanden unter Angabe der Standardabweichung. Statistisch signifikante p-Werte sind folgendermaßen gekennzeichnet: $p < 0.05$ mit *, $p < 0.01$ mit ** und $p < 0.001$ mit ***.

Wirkung von Umckaloabo auf die Aktivierung von CD8-positiven Zellen bei Kostimulation mit BCG

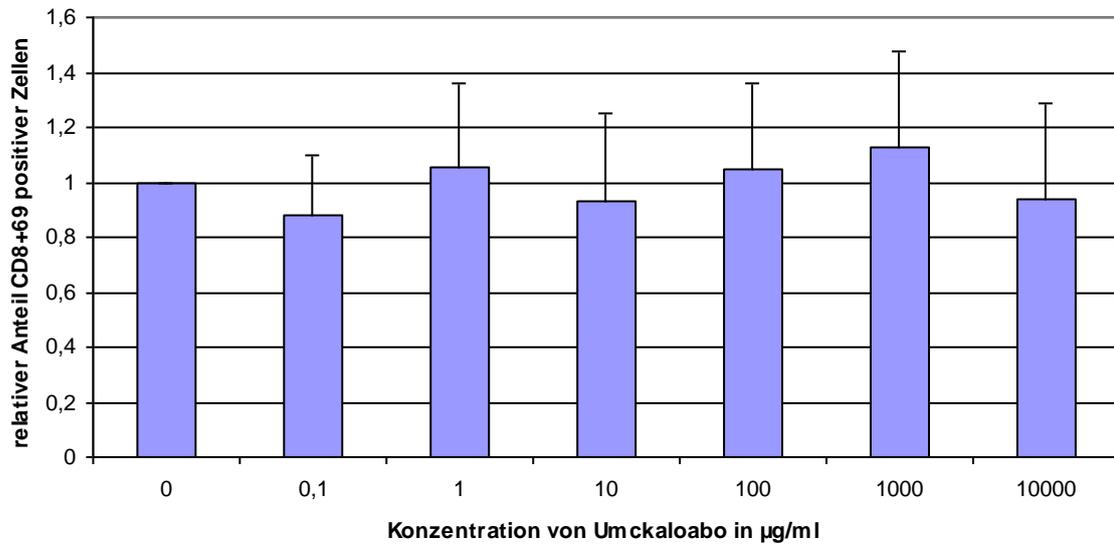


Abb. 16: Relativer Anteil CD8+CD69 doppelpositiver Zellen bei Kostimulation mit BCG und unterschiedlichen Konzentrationen von Umckaloabo. Gemittelte Werte von zwanzig Probanden unter Angabe der Standardabweichung. Keine signifikanten Werte.

Wirkung von Umckaloabo auf die Aktivierung von CD19-positiven Zellen bei Kostimulation mit BCG

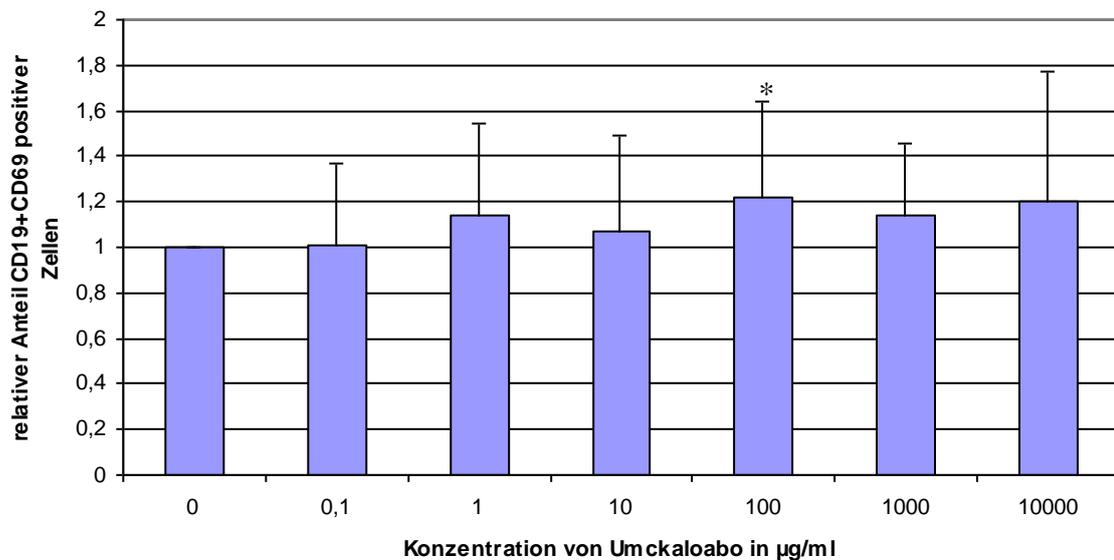


Abb. 17: Relativer Anteil CD19+CD69 doppelpositiver Zellen bei Kostimulation mit BCG und unterschiedlichen Konzentrationen von Umckaloabo. Gemittelte Werte von zwanzig Probanden unter Angabe der Standardabweichung. Statistisch signifikante p-Werte sind folgendermaßen gekennzeichnet: $p < 0.05$ mit *, $p < 0.01$ mit ** und $p < 0.001$ mit ***.

**Wirkung von Umckaloabo auf die Aktivierung von CD56-positiven Zellen bei
Kostimulation mit BCG**

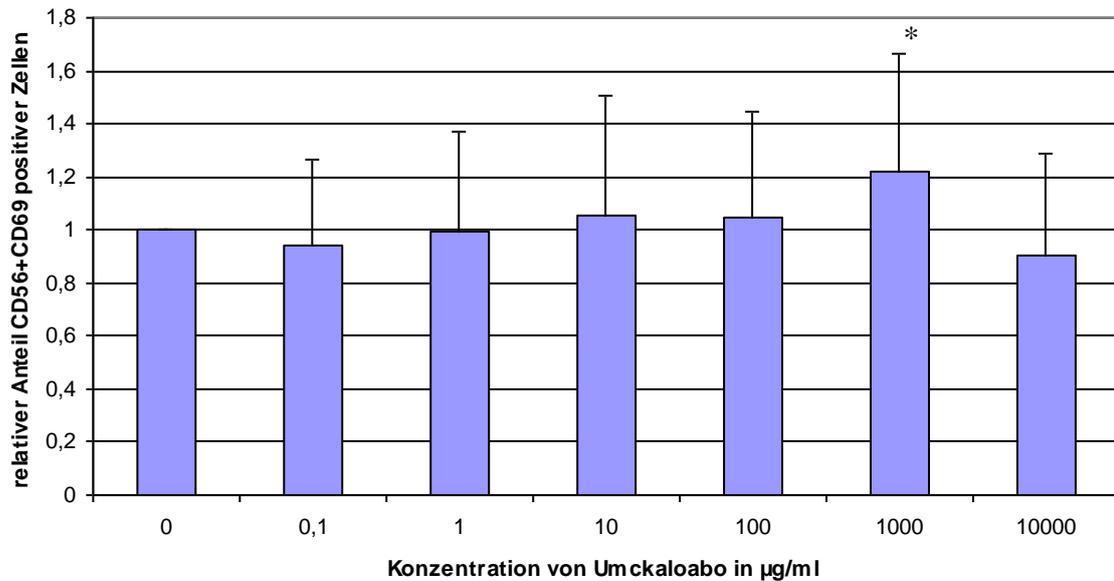


Abb. 18: Relativer Anteil CD56+CD69 doppelpositiver Zellen bei Kostimulation mit BCG und unterschiedlichen Konzentrationen von Umckaloabo. Gemittelte Werte von zwanzig Probanden unter Angabe der Standardabweichung. Statistisch signifikante p-Werte sind folgendermaßen gekennzeichnet: $p < 0.05$ mit *, $p < 0.01$ mit ** und $p < 0.001$ mit ***.

**3.2.3 Einfluss von Umckaloabo bei Kostimulation der PBMC durch TT
(Abb. 19-22)**

Die Ergebnisse ähneln denen, die unter 3.4.1 beschrieben wurden. Fast alle Probanden zeigten innerhalb aller untersuchter Zellpopulationen eine Stimulation ihrer CD69-Expression, doch wird diese erst bei den Konzentrationen UT und UZT deutlich erkennbar. Auch hier ist wieder eine Diskrepanz zwischen dem frühen Aktivierungsmarker CD69 und der proliferativen Aktivität nach einer Woche zu sehen. Bei letzterer lag die optimale Konzentration bei UH, danach fielen die Stimulationsindizes wieder ab. Als Erklärung dieser zunächst uneinheitlich wirkenden Ergebnisse können wieder die unter 3.4.1 gegebenen Argumente dienen, unter Verweis auf die Proliferationskinetik und die verwendeten unterschiedlichen Methoden.

Offensichtlich vermag aber Umckaloabo im Beisein von TT (im Gegensatz zu BCG) alle vier untersuchten Zellpopulationen über die schon starke Vorstimulation hinaus weiter zu aktivieren – eine Beobachtung, die die entsprechenden Ergebnisse des LTT und der durchflusszytometrischen Proliferationsanalyse bestätigt. Auffällig ist wieder, dass bei den „physiologischen“ Konzentrationen UZ bzw. UH die CD8- bzw. CD56-positiven Zellen signifikante Expressionssteigerungen zeigen (Abb. 20 und Abb.22).

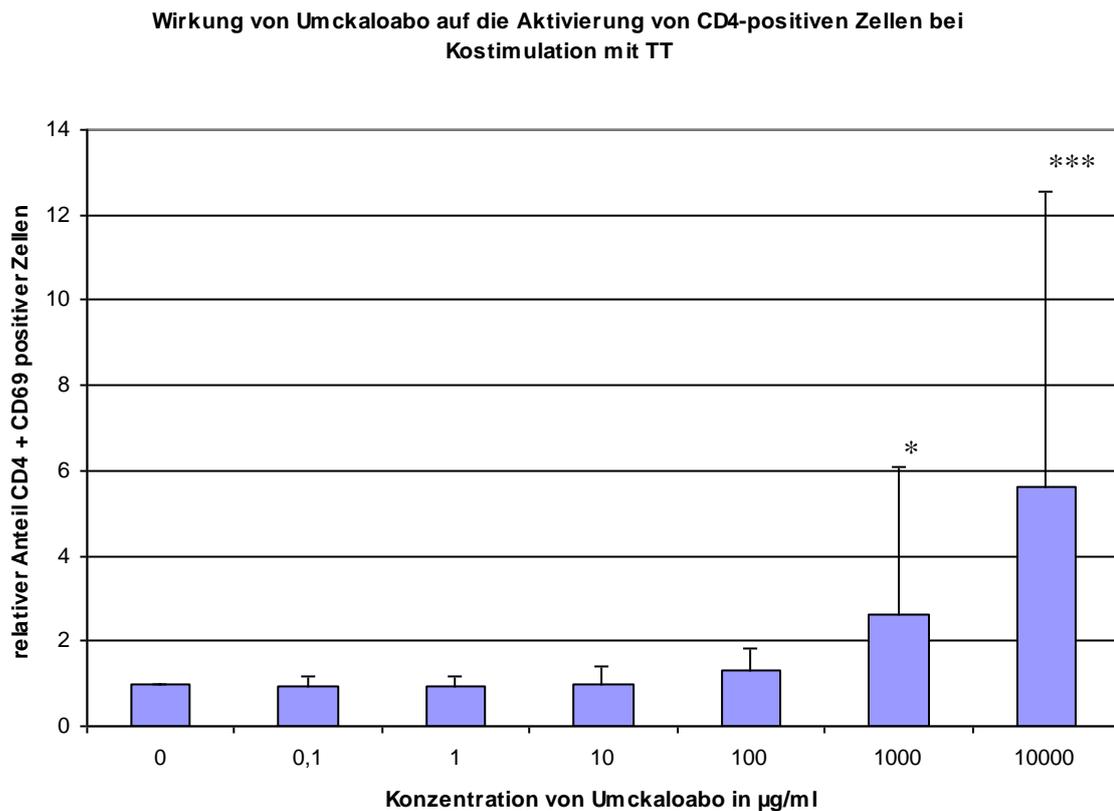


Abb. 19: Relativer Anteil CD4+CD69 doppelpositiver Zellen bei Kostimulation mit TT und unterschiedlichen Konzentrationen von Umckaloabo. Gemittelte Werte von zwanzig Probanden unter Angabe der Standardabweichung. Statistisch signifikante p-Werte sind folgendermaßen gekennzeichnet: $p < 0.05$ mit *, $p < 0.01$ mit ** und $p < 0.001$ mit ***.

Wirkung von Umckaloabo auf die Aktivierung von CD8-positiven Zellen bei Kostimulation mit TT

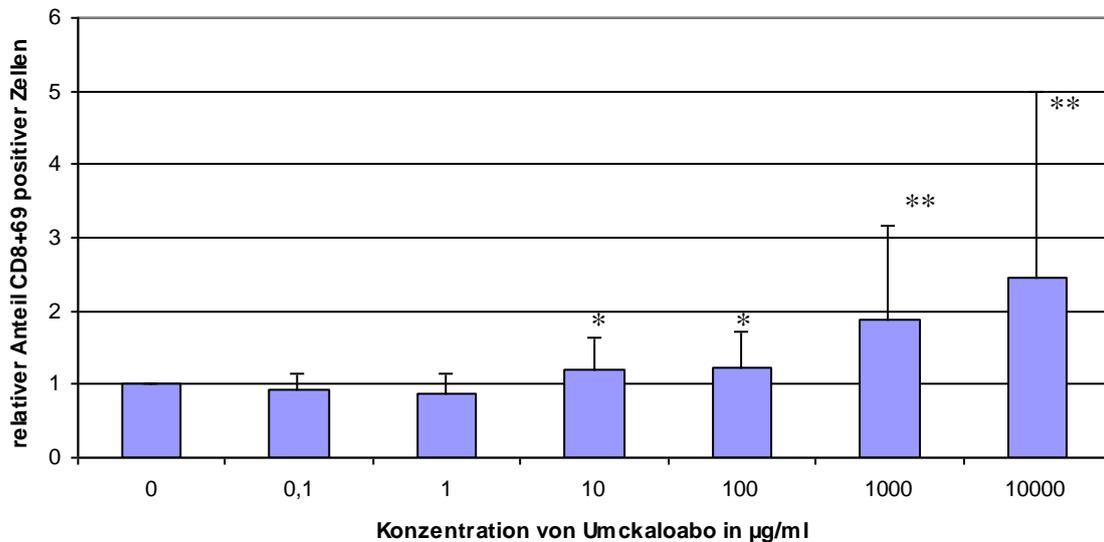


Abb. 20: Relativer Anteil CD8+CD69 doppeltpositiver Zellen bei Kostimulation mit TT und unterschiedlichen Konzentrationen von Umckaloabo. Gemittelte Werte von zwanzig Probanden unter Angabe der Standardabweichung. Statistisch signifikante p-Werte sind folgendermaßen gekennzeichnet: $p < 0.05$ mit *, $p < 0.01$ mit ** und $p < 0.001$ mit ***.

Wirkung von Umckaloabo auf die Aktivierung von CD19-positiven Zellen bei Kostimulation mit TT

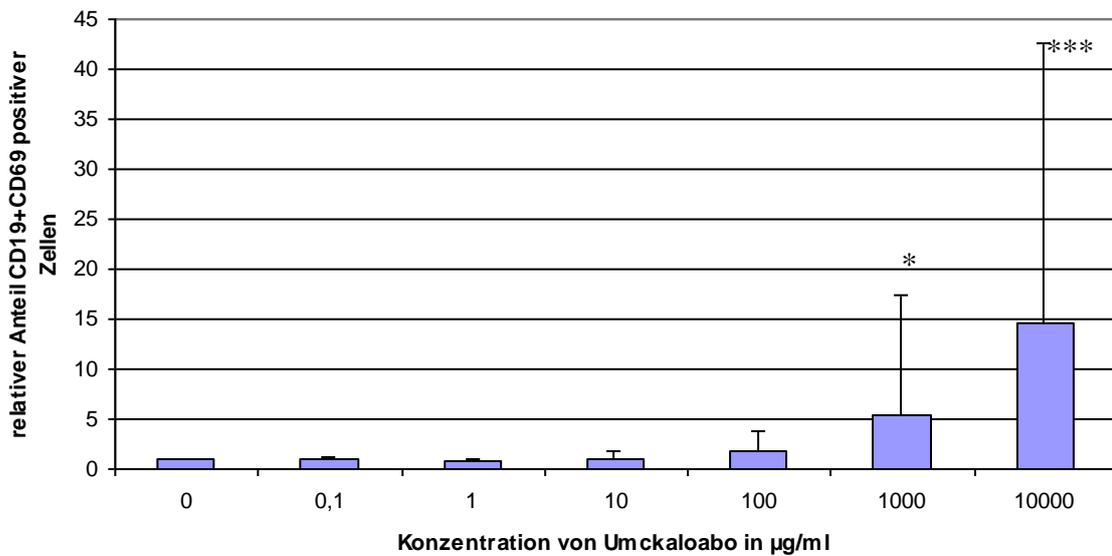


Abb. 21: Relativer Anteil CD19+CD69 doppeltpositiver Zellen bei Kostimulation mit TT und unterschiedlichen Konzentrationen von Umckaloabo. Gemittelte Werte von zwanzig Probanden unter Angabe der Standardabweichung. Statistisch signifikante p-Werte sind folgendermaßen gekennzeichnet: $p < 0.05$ mit *, $p < 0.01$ mit ** und $p < 0.001$ mit ***.

Wirkung von Umckaloabo auf die Aktivierung von CD56-positiven Zellen bei Kostimulation mit TT

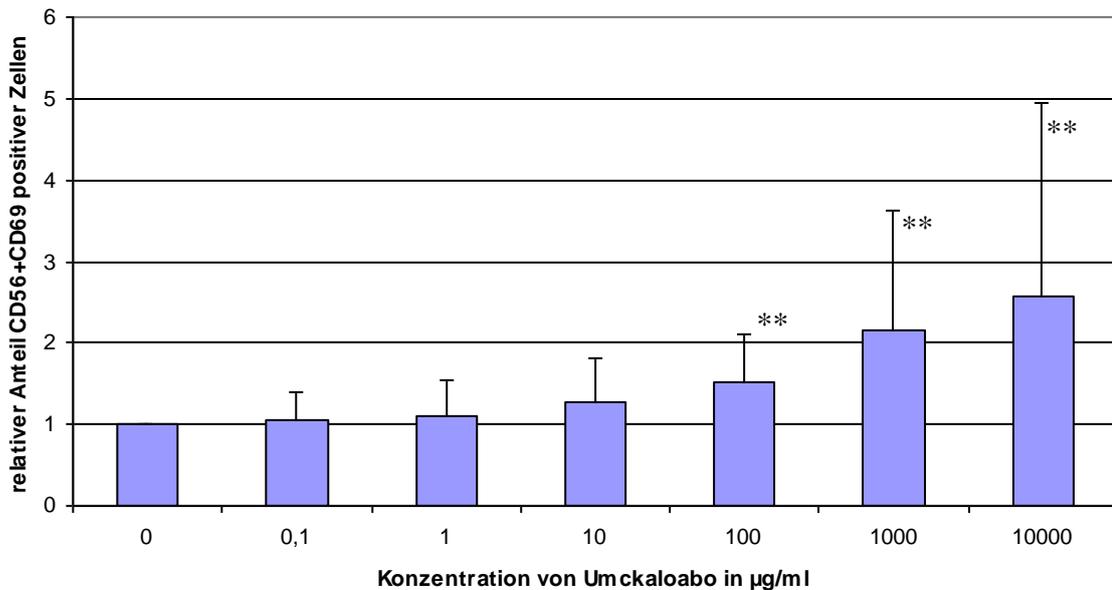


Abb. 22: Relativer Anteil CD56+CD69 doppelpositiver Zellen bei Kostimulation mit TT und unterschiedlichen Konzentrationen von Umckaloabo. Gemittelte Werte von zwanzig Probanden unter Angabe der Standardabweichung. Statistisch signifikante p-Werte sind folgendermaßen gekennzeichnet: p < 0.05 mit *, p < 0.01 mit ** und p < 0.001 mit ***.

3.2.4 Einfluss von Umckaloabo bei Kostimulation der PBMC durch PPD (Abb. 23 – 26)

Alle vier untersuchten Zellpopulationen wurden durch PPD alleine nur sehr schwach stimuliert. Dies hängt sicher auch damit zusammen, dass (nach der Zytokinausschüttung geurteilt, s.u.) keine Probanden vom „klassischen“ T_{H1}-Typ untersucht wurden (Barth, Berg, Klein, 2003). Die Wirkung von Umckaloabo unterschied sich bei Kostimulation mit PPD nur geringfügig von der Wirkung von Umckaloabo ohne Kostimulation. So korrelierten die entsprechenden Werte nicht nur, sondern waren auch von den absoluten Werten her nahezu identisch. Auch die Signifikanzen verhielten sich gleich. Deswegen sei an dieser Stelle auf die Erläuterungen unter 3.4.1 verwiesen.

Wirkung von Umckaloabo auf die Aktivierung von CD4-positiven Zellen bei Kostimulation mit PPD

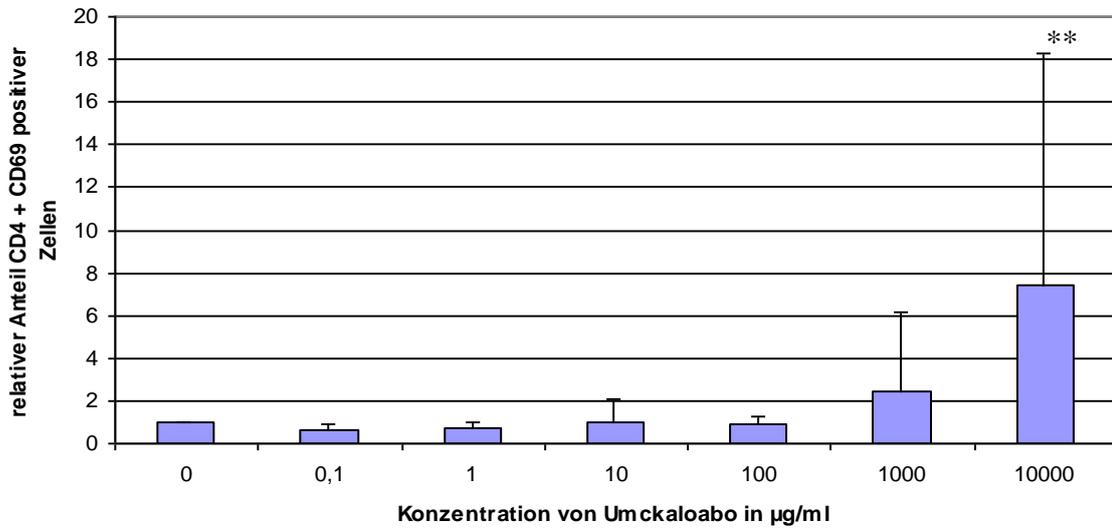


Abb. 23: Relativer Anteil CD4+CD69 doppelpositiver Zellen bei Kostimulation mit PPD und unterschiedlichen Konzentrationen von Umckaloabo. Gemittelte Werte von vierzehn Probanden unter Angabe der Standardabweichung. Statistisch signifikante p-Werte sind folgendermaßen gekennzeichnet: $p < 0.05$ mit *, $p < 0.01$ mit ** und $p < 0.001$ mit ***.

Wirkung von Umckaloabo auf die Aktivierung von CD8-positiven Zellen bei Kostimulation mit PPD

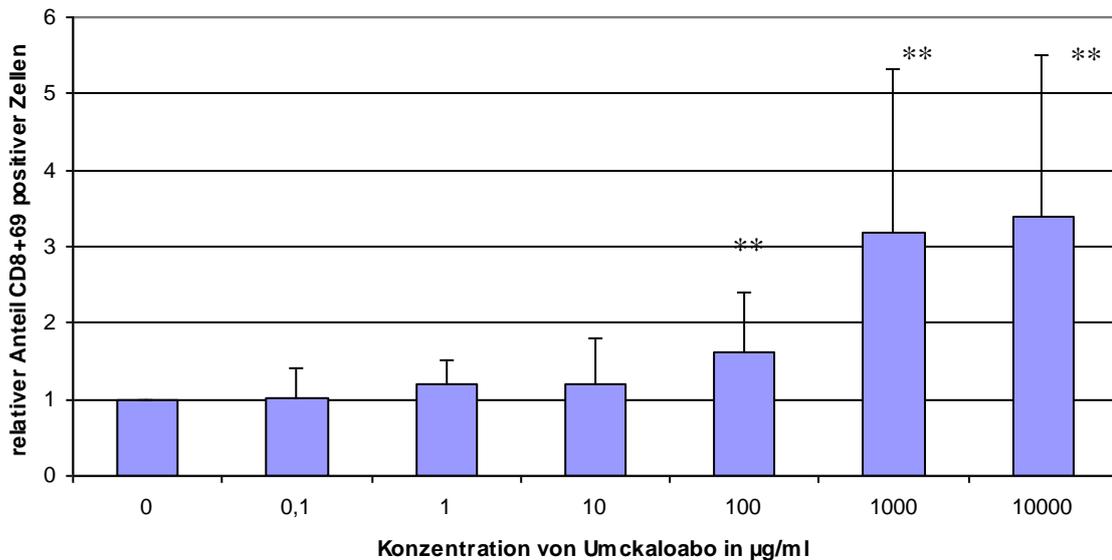


Abb. 24: Relativer Anteil CD8+CD69 doppelpositiver Zellen bei Kostimulation mit PPD und unterschiedlichen Konzentrationen von Umckaloabo. Gemittelte Werte von vierzehn Probanden unter Angabe der Standardabweichung. Statistisch signifikante p-Werte sind folgendermaßen gekennzeichnet: $p < 0.05$ mit *, $p < 0.01$ mit ** und $p < 0.001$ mit ***.

Wirkung von Umckaloabo auf die Aktivierung von CD19-positiven Zellen bei Kostimulation mit PPD

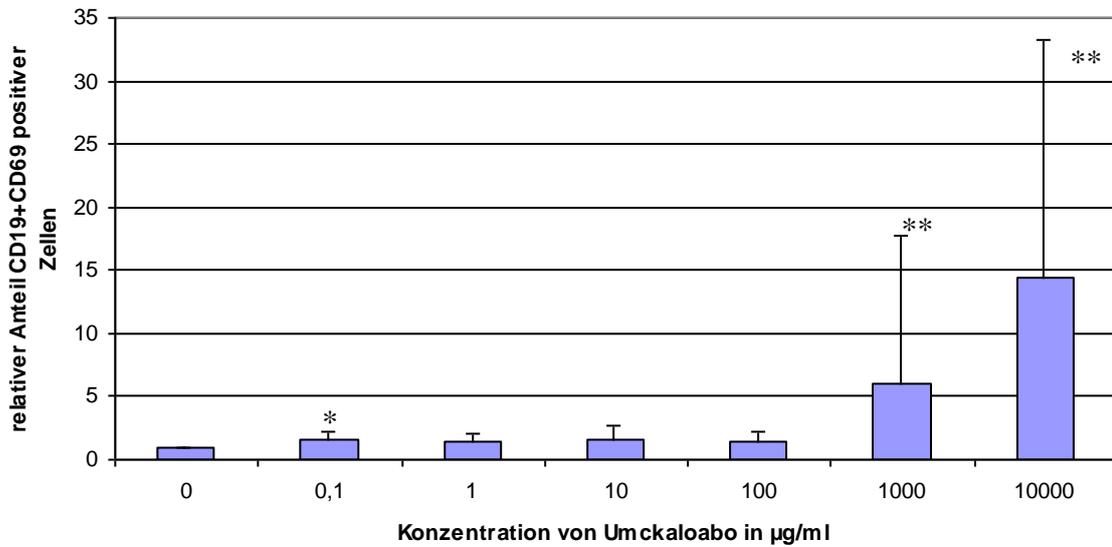


Abb. 25: Relativer Anteil CD19+CD69 doppelpositiver Zellen bei Kostimulation mit PPD und unterschiedlichen Konzentrationen von Umckaloabo. Gemittelte Werte von vierzehn Probanden unter Angabe der Standardabweichung. Statistisch signifikante p-Werte sind folgendermaßen gekennzeichnet: $p < 0.05$ mit *, $p < 0.01$ mit ** und $p < 0.001$ mit ***.

Wirkung von Umckaloabo auf die Aktivierung von CD56-positiven Zellen bei Kostimulation mit PPD

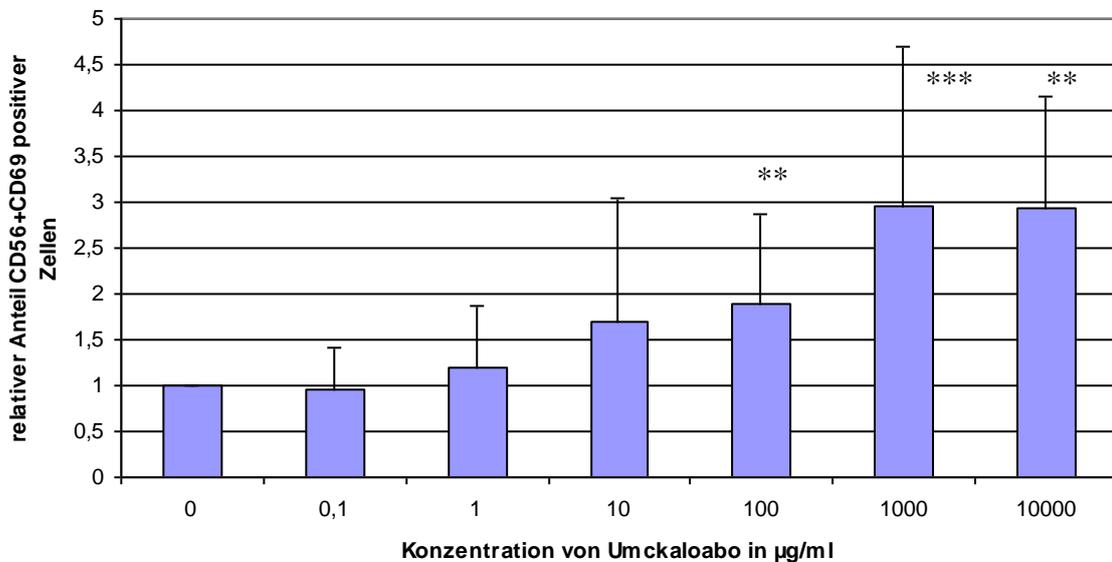


Abb. 26: Relativer Anteil CD56+CD69 doppelpositiver Zellen bei Kostimulation mit PPD und unterschiedlichen Konzentrationen von Umckaloabo. Gemittelte Werte von vierzehn Probanden unter Angabe der Standardabweichung. Statistisch signifikante p-Werte sind folgendermaßen gekennzeichnet: $p < 0.05$ mit *, $p < 0.01$ mit ** und $p < 0.001$ mit ***.

3.3 Durchflusszytometrische Analyse regulatorischer T-Zellen (Tab.4, Abb. 27)

Bei einem Probanden wurde beispielhaft das Verhalten der regulatorischen T-Zellen untersucht. Da die bereits dargestellten Untersuchungen der CD69-Expression kaum Einfluss von Umckaloabo auf BCG-vorstimulierte PBMC zeigten, beschränkte sich die Untersuchung der regulatorischen T-Zellen auf PBMC bei Kostimulation durch TT bzw. durch PPD. Die Detektion von regulatorischen T-Zellen erfolgte durch die gleichzeitige Gabe von drei verschiedenen unterschiedlich fluoreszenzmarkierten Antikörpern. Mit diesen wurden zum einen die extrazellulären Marker CD4, CD25, andererseits aber auch der intrazelluläre Marker Foxp3 erfasst. Bei der Auswertung mit dem Programm BD CellQuest™ Pro wurde zunächst (wie unter 3.3 beschrieben) ein großes Auswahlfenster gezogen, um auch proliferierende Zellen erfassen zu können. Die Population der CD4-positiven Zellen wurde sodann mit einem zweiten Auswahlfenster eingegrenzt und bezüglich der Expression der anderen beiden Marker untersucht. Der so errechnete Anteil dreifach markierter Zellen innerhalb der CD4-Population wird im folgenden angegeben (Tab. 4, Abb. 27).

Auffallend war der starke Anstieg dieses Anteils bei zunehmenden Konzentrationen von Umckaloabo. So betrug er bei der Konzentration UH mehr als das Doppelte des Ausgangswertes.

Ähnlich war die Situation bei TT: Hier lag durch das Antigen alleine schon ein doppelt so hoher Anteil an regulatorischen T-Zellen vor wie beim Spontanwert. Auch hier stieg dieser um etwa ein Viertel an, allerdings schon bei der niedrigeren Konzentration UZ.

In Anwesenheit von PPD war eine parallele Entwicklung zu sehen: Der Anteil der regulatorischen T-Zellen ohne Umckaloabo lag etwas höher als beim Spontanwert, aber niedriger als bei Stimulation mit TT. Er stieg in Anwesenheit von Umckaloabo bei der Konzentrationsstufe UH ebenso um ein Viertel an.

Das ansonsten als Positivkontrolle eingesetzte Mitogen PWM führte dagegen zu einer Halbierung des Anteils an regulatorischen T-Zellen.

spontan	10,9
PWM	5,4
Umc ZT	8,7
Umc T	18,4
Umc H	23,5
Umc Z	14,6
Umc 1	13,7

Tet + Umc ZT	8,7
Tet + Umc T	16,6
Tet + Umc H	23,9
Tet + Umc Z	25,6
Tet + Umc 1	19,9
Tet	19,6

PPD + Umc ZT	8,9
PPD + Umc T	15,6
PPD + Umc H	17,9
PPD + Umc Z	14,1
PPD + Umc 1	13,5
PPD	14,2

Tab. 4: Durchflusszytometrische Analyse des prozentualen Anteils regulatorischer T-Zellen (CD4, CD25, Foxp3 positiv) an der Gesamtpopulation der CD4-positiven Zellen.

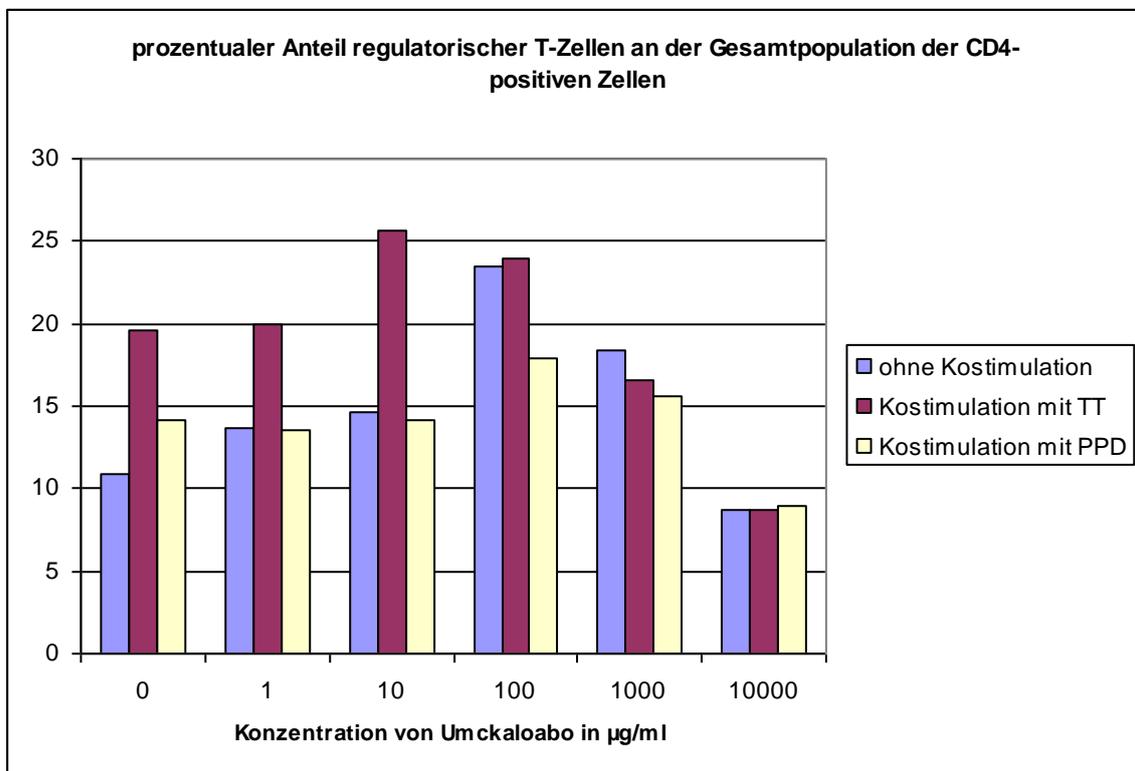


Abb. 27: Direkter Vergleich des prozentualen Anteils regulatorischer T-Zellen (CD4, CD25, Foxp3 positiv) an der Gesamtpopulation der CD4-positiven Zellen mit und ohne Kostimulation. Nicht dargestellt ist die Reaktion auf PWM.

3.4 Einfluss von Umckaloabo auf die Zytokinproduktion durch PBMC

Zur Beschreibung der immunologischen Grunddisposition der untersuchten Probanden bezieht sich diese Arbeit auf das T_{H1}/T_{H2} -Konzept (Mosmann, Coffman, 1989). Dabei wird ein Typ1-Profil durch eine Produktion von IFN- γ und/oder TNF- β nach Stimulation durch PPD bei gleichzeitig fehlender Reaktion gegenüber TT definiert. Im Gegensatz dazu wird ein Typ2-Profil durch den Nachweis von IL-4, IL-5 und/oder IL-13 nach Stimulation durch TT bei gleichzeitig fehlender Reaktion auf PPD beschrieben. Bei gleichzeitiger Reaktion gegenüber PPD und TT liegt ein sogenannter Mischtyp (Typ1/Typ2-Profil) vor (Barth, Klein, Börtlein *et al.*, 2002).

Die Analyse der Zytokinprofile der zwanzig Probanden ergab, dass neunzehn Probanden ein Typ2-Profil und ein Proband ein Mischtyp-Profil in ihrem Reaktionsmuster aufwiesen. Kein Proband wies ein Typ1-Profil auf.

3.4.1 Kinetik der Umckaloabo-induzierten Zytokinproduktion durch PBMC (Abb. 28-30)

Die Ausschüttung der Makrophagen-typischen Zytokine IL-1, IL-6 und TNF- α war schon am Tag 2 auf dem höchsten Stand und nahm zu den Tagen 4 bis 8 hin leicht ab, verblieb aber auf hohem Niveau. Dagegen war die Ausschüttung von IFN- γ am Tag 2 noch diskret und steigerte sich zu den Tagen 4-8 hin deutlich. Einen Vergleich der Kinetik von TNF- α und IFN- γ zeigt Abb. 28.

Die Sekretion von IL-10 hatte schon am Tag 2 ihren Höchststand und fiel danach deutlich ab. Dagegen blieben die Spiegel von GM-CSF auf niedrigem, aber konstantem Niveau (Abb. 29 und 30).

Einfluss von Umckaloabo auf die TNF- α - und IFN- γ -Produktion durch PBMC im zeitlichen Verlauf

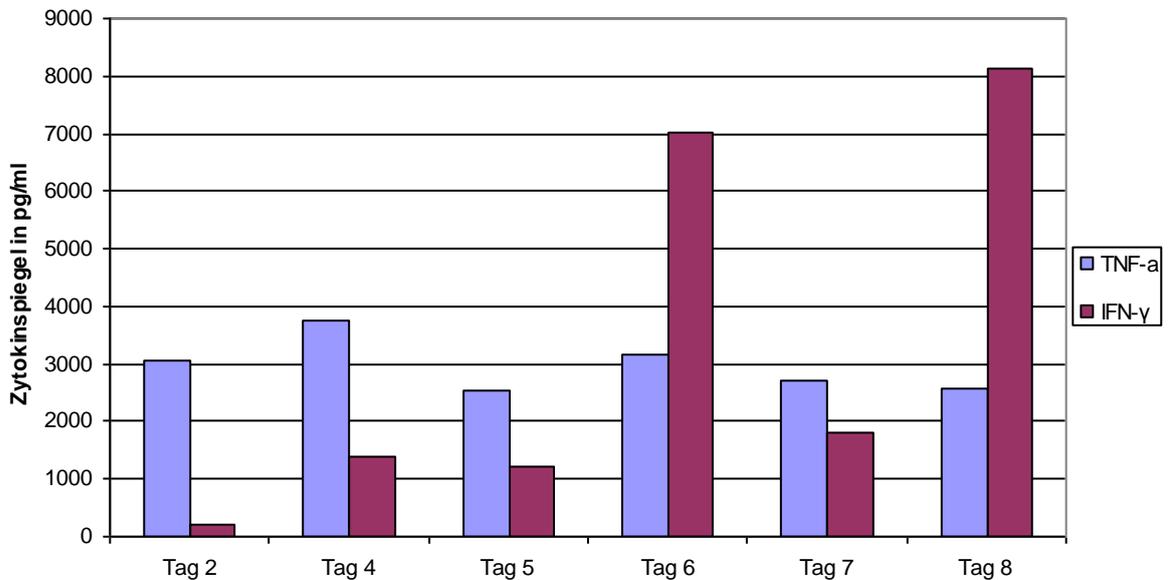


Abb. 28: Produktion von TNF- α und IFN- γ bei einer Umckaloabo-Konzentration von 1000 μ g/ml ohne Kostimulation. Werte eines Probanden nach unterschiedlich langen Inkubationszeiten. Werte über 312 pg/ml TNF- α bzw. über 624 pg/ml IFN- γ gelten als positiv.

Einfluss von Umckaloabo auf die IL-10- und GM-CSF-Produktion durch PBMC im zeitlichen Verlauf

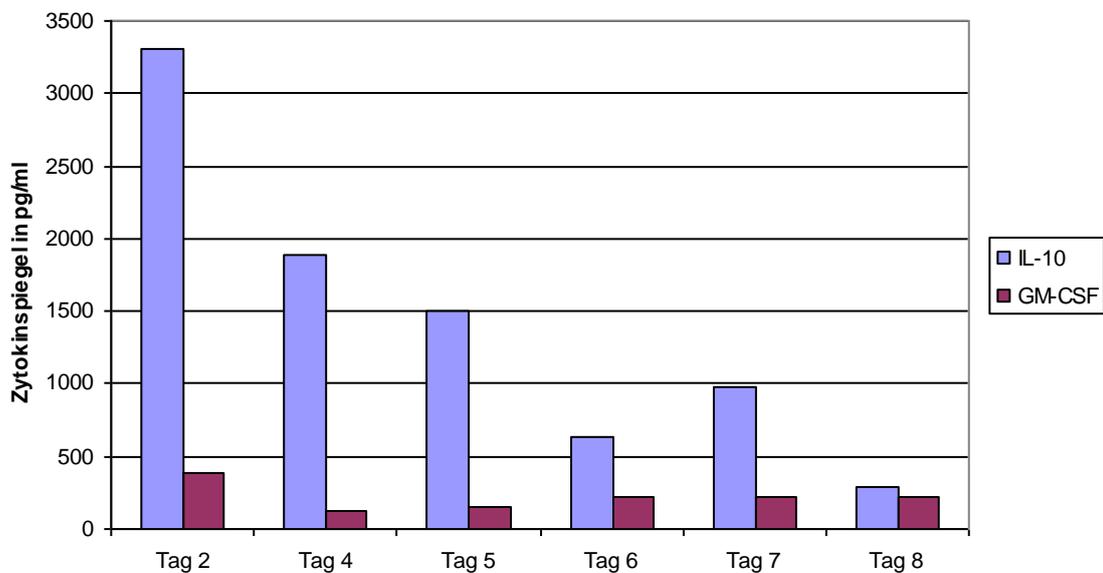


Abb. 29: Produktion von IL-10 und GM-CSF bei einer Umckaloabo-Konzentration von 1000 μ g/ml ohne Kostimulation. Werte eines Probanden nach unterschiedlich langen Inkubationszeiten. Werte über 156 pg/ml IL-10 bzw. über 312 pg/ml GM-CSF gelten als positiv.

Einfluss von Umckaloabo auf die IL-10- und GM-CSF-Produktion durch PBMC bei Kostimulation mit PPD im zeitlichen Verlauf

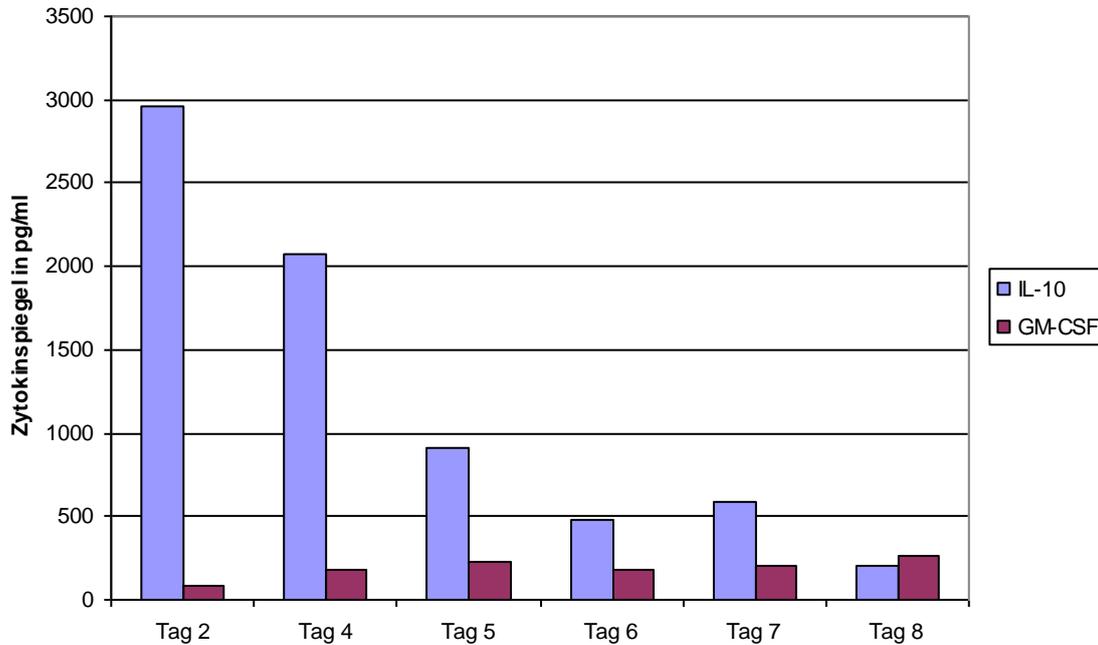


Abb. 30: Produktion von IL-10 und GM-CSF bei einer Umckaloabo-Konzentration von 1000 µg/ml bei Kostimulation mit PPD. Werte eines Probanden nach unterschiedlich langen Inkubationszeiten. Werte über 156 pg/ml IL-10 bzw. über 312 pg/ml GM-CSF gelten als positiv.

3.4.2 Einfluss von Umckaloabo auf die Produktion Makrophagen-typischer Zytokine (IL-1, IL-6, TNF- α) durch PBMC (Abb. 31-36)

In Abwesenheit von Umckaloabo war die Konzentration von IL-1, IL-6 und TNF- α bei den meisten Probanden sehr niedrig, doch teilweise über der Grenze, ab der der Nachweis als positiv gilt (IL-1 und IL-6: 250 pg/ml; TNF- α : 312 pg/ml).

Bei niedrigen Konzentrationen von Umckaloabo (U0,1 bis U100) stiegen die Konzentrationen von IL-1 und TNF- α nur leicht, um dann aber bei den Konzentrationsstufen UT und UZT sprunghaft anzusteigen. Bei IL-6 war dieser Sachverhalt ähnlich, doch war hier schon bei der Konzentration UH der sprunghafte Anstieg zu sehen (siehe Abb. 31-33). Ebenso verhielten sich die Signifikanzen.

Bei Kostimulation mit TT lagen die Ergebnisse ähnlich: Die Reaktionen von TNF- α und IL-6 waren nahezu gleich mit den zuvor beschriebenen, bei IL-1 jedoch war der steile Anstieg schon ab der Konzentration UH zu erkennen und fiel etwas stärker aus (siehe Abb. 34-36).

Im Beisein von BCG, einem vor allem auf Makrophagen wirkenden Stimulus, waren die genannten Zytokine bei allen Probanden deutlich positiv. Besonders stark war die Ausschüttung von IL-6. Bei Zugabe von Umckaloabo blieben die jeweiligen Zytokinspiegel in allen Konzentrationsstufen weitgehend unbeeinflusst (ohne Abb.).

Bei Kostimulation durch PPD war dasselbe Verhalten wie ohne Kostimulation zu sehen (ohne Abb.)

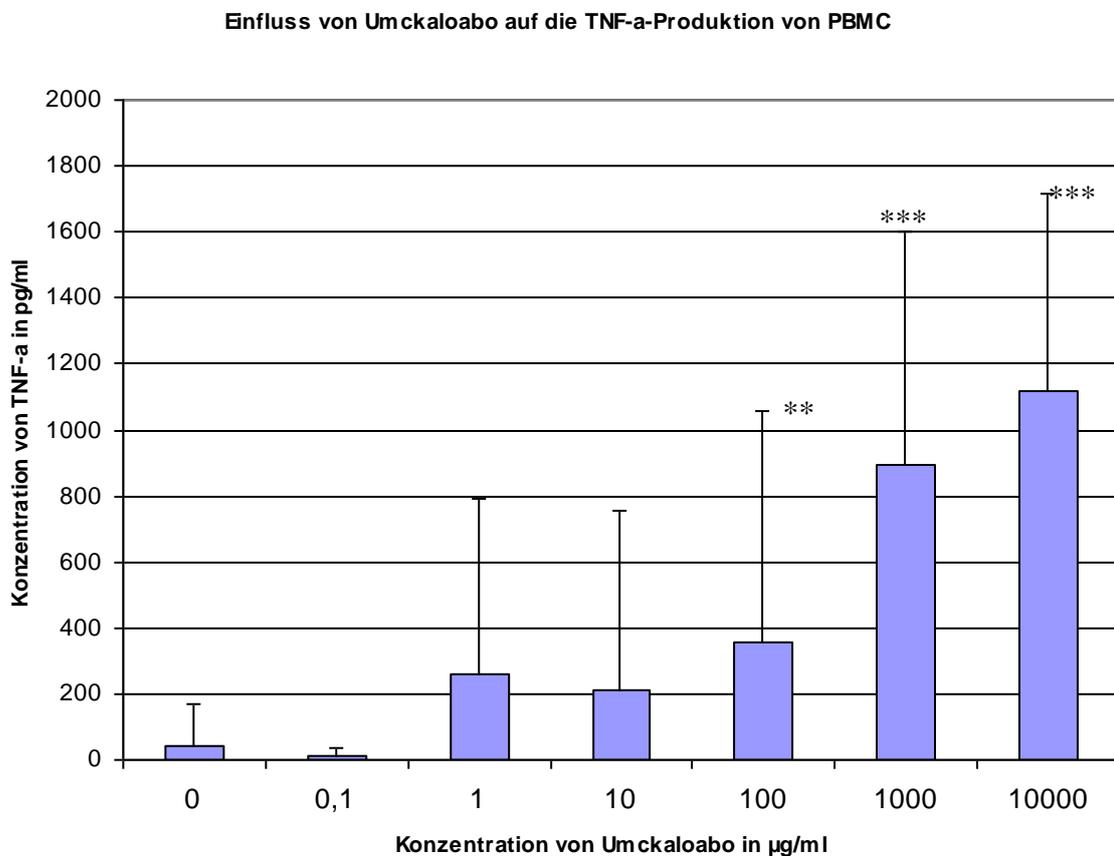


Abb. 31: TNF- α -Produktion bei unterschiedlichen Konzentrationen von Umckaloabo ohne weiteren Kostimulus. Gemittelte Werte von zwanzig Probanden unter Angabe der Standardabweichung. Werte über 312 pg/ml gelten als positiv. Statistisch signifikante p-Werte sind folgendermaßen gekennzeichnet: $p < 0.05$ mit *, $p < 0.01$ mit ** und $p < 0.001$ mit ***.

Einfluss von Umckaloabo auf die IL-1-Produktion von PBMC

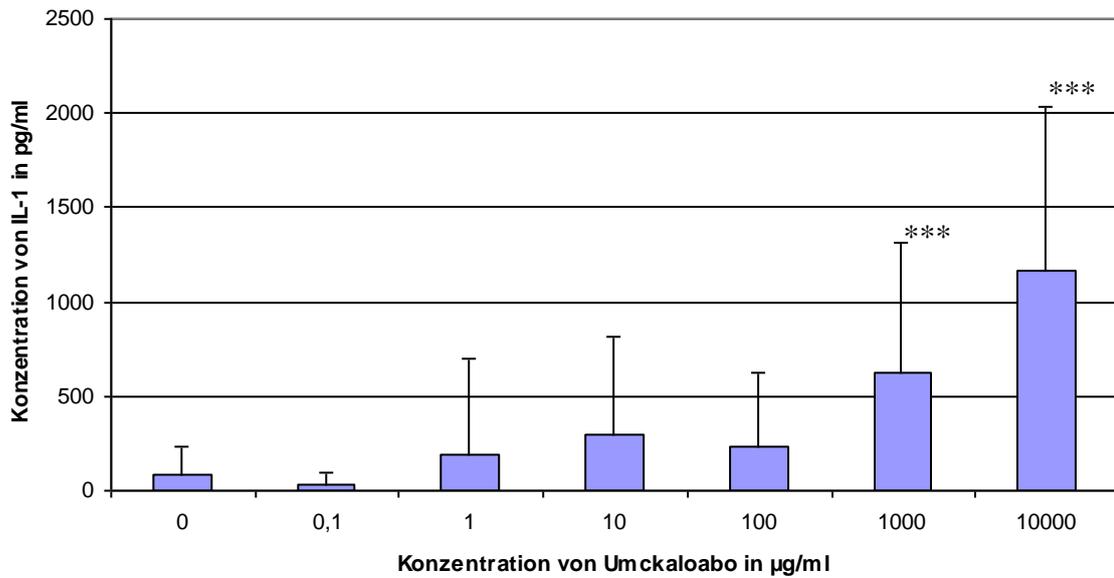


Abb. 32: IL-1-Produktion bei unterschiedlichen Konzentrationen von Umckaloabo ohne weiteren Kostimulus. Gemittelte Werte von zwanzig Probanden unter Angabe der Standardabweichung. Werte über 250 pg/ml gelten als positiv. Statistisch signifikante p-Werte sind folgendermaßen gekennzeichnet: $p < 0.05$ mit *, $p < 0.01$ mit ** und $p < 0.001$ mit ***.

Einfluss von Umckaloabo auf die IL-6 Produktion von PBMC

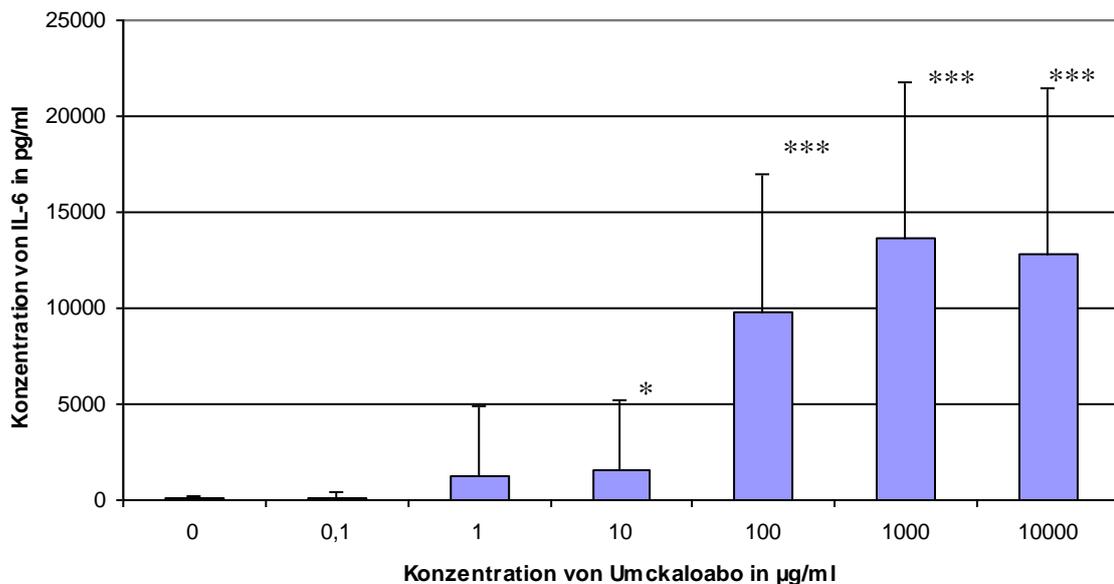


Abb. 33: IL-6-Produktion bei unterschiedlichen Konzentrationen von Umckaloabo ohne weiteren Kostimulus. Gemittelte Werte von zwanzig Probanden unter Angabe der Standardabweichung. Werte über 250 pg/ml gelten als positiv. Statistisch signifikante p-Werte sind folgendermaßen gekennzeichnet: $p < 0.05$ mit *, $p < 0.01$ mit ** und $p < 0.001$ mit ***.

Einfluss von Umckaloabo auf die TT-induzierte TNF- α -Produktion von PBMC

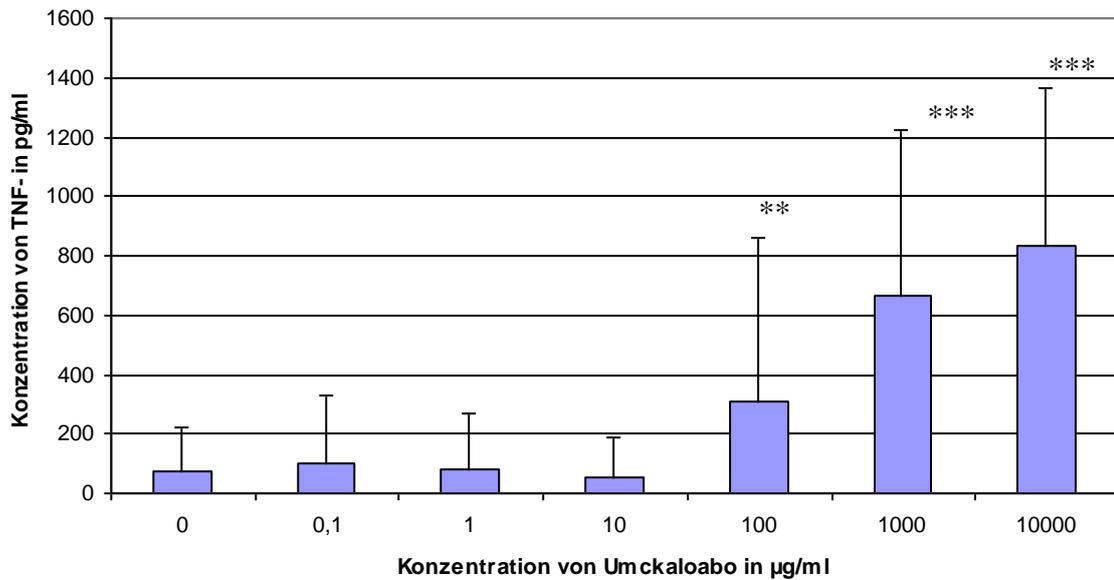


Abb. 34: TNF- α -Produktion bei unterschiedlichen Konzentrationen von Umckaloabo unter Kostimulation mit TT. Gemittelte Werte von zwanzig Probanden unter Angabe der Standardabweichung. Werte über 312 pg/ml gelten als positiv. Statistisch signifikante p-Werte sind folgendermaßen gekennzeichnet: $p < 0.05$ mit *, $p < 0.01$ mit ** und $p < 0.001$ mit ***.

Einfluss von Umckaloabo auf die TT-induzierte IL-1-Produktion von PBMC

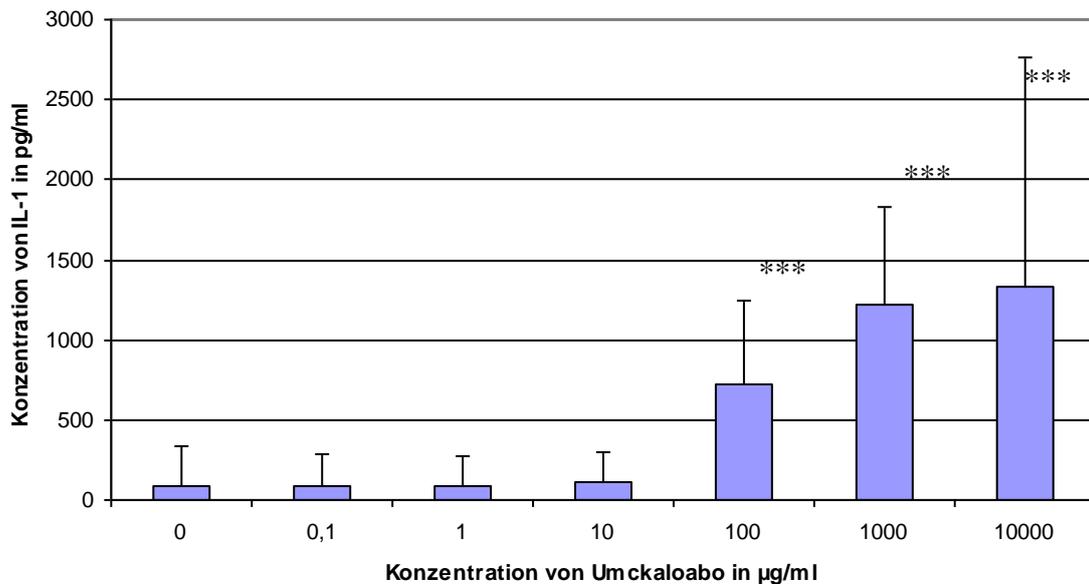


Abb. 35: IL-1-Produktion bei unterschiedlichen Konzentrationen von Umckaloabo unter Kostimulation mit TT. Gemittelte Werte von zwanzig Probanden unter Angabe der Standardabweichung. Werte über 250 pg/ml gelten als positiv. Statistisch signifikante p-Werte sind folgendermaßen gekennzeichnet: $p < 0.05$ mit *, $p < 0.01$ mit ** und $p < 0.001$ mit ***.

Einfluss von Umckaloabo auf die TT-induzierte IL-6-Produktion von PBMC

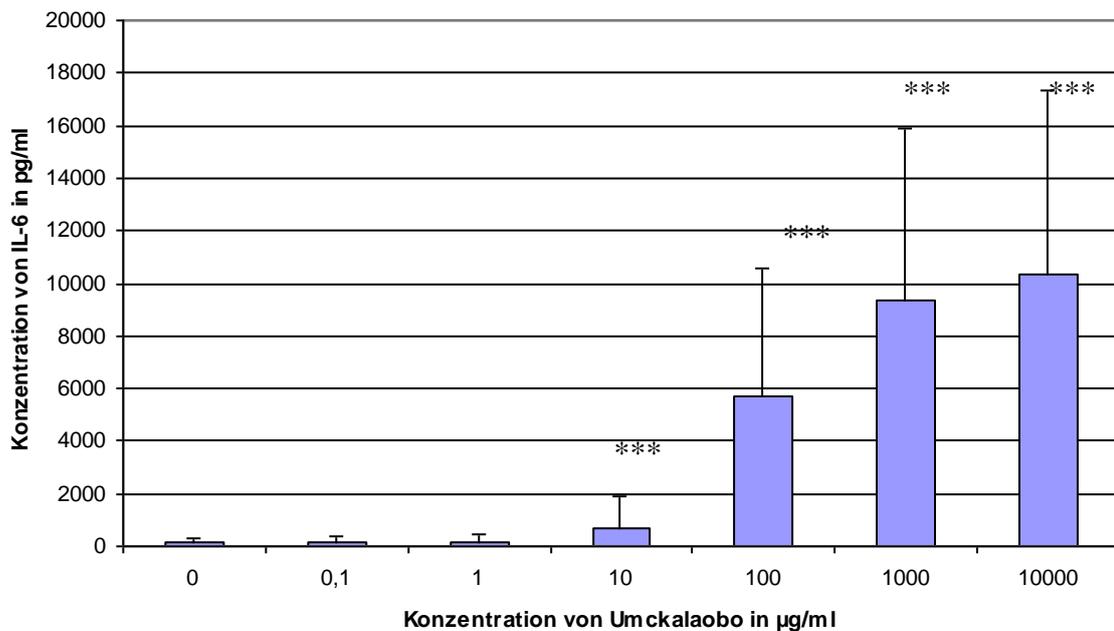


Abb. 36: IL-6-Produktion bei unterschiedlichen Konzentrationen von Umckaloabo unter Kostimulation mit TT. Gemittelte Werte von zwanzig Probanden unter Angabe der Standardabweichung. Werte über 250 pg/ml gelten als positiv. Statistisch signifikante p-Werte sind folgendermaßen gekennzeichnet: p < 0.05 mit *, p < 0.01 mit ** und p < 0.001 mit ***.

3.4.3 Einfluss von Umckaloabo auf die Produktion T_{H1} -typischer Zytokine (TNF- β , IFN- γ) durch PBMC (Abb. 37-40)

Bei keinem Probanden führte Umckaloabo alleine zur Ausschüttung von TNF- β . Auch durch BCG konnte bei keinem Probanden eine als positiv einzustufende Menge an TNF- β (> 312 pg/ml) hervorgerufen werden. Dies blieb durch Zugabe von Umckaloabo unverändert.

PPD führte definitionsgemäß nur beim einzigen T_{H1}/T_{H2} -Typ zur Ausschüttung von TNF- β . Bei Zugabe von Umckaloabo fielen die Werte aber in allen Konzentrationsstufen wieder in den negativen Bereich.

TT bewirkte etwa bei der Hälfte der Probanden eine als positiv einzustufende Ausschüttung von TNF- β . Bei Zugabe von Umckaloabo fielen diese ab der Konzentrationsstufe UZ wieder in den negativen Bereich (Abb. 37).

Einfluss von Umckaloabo auf die TT-induzierte TNF- β -Produktion von PBMC

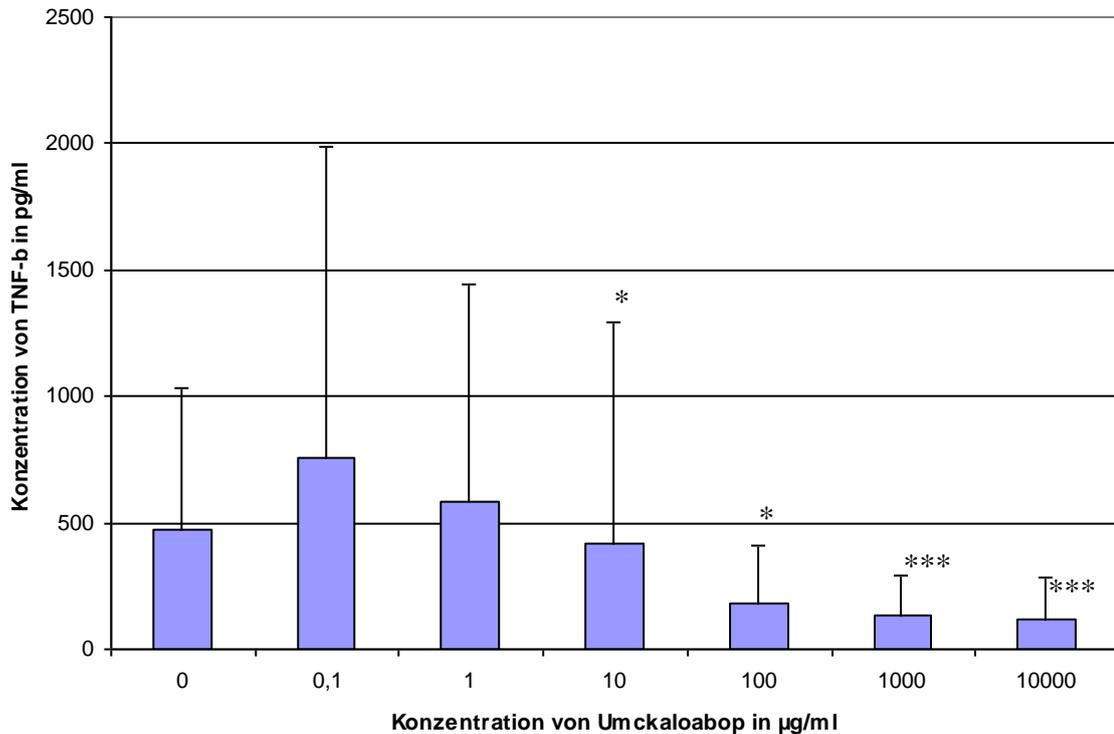


Abb. 37: TNF- β -Produktion bei unterschiedlichen Konzentrationen von Umckaloabo unter Kostimulation mit TT. Gemittelte Werte von zwanzig Probanden unter Angabe der Standardabweichung. Werte über 312 pg/ml gelten als positiv. Statistisch signifikante p-Werte sind folgendermaßen gekennzeichnet: p < 0.05 mit *, p < 0.01 mit ** und p < 0.001 mit ***.

Durch Umckaloabo allein konnte bei der Konzentrationsstufe UH bei vier, bei UT bei fünf Probanden eine positiv zu wertende IFN- γ -Produktion (> 624 pg/ml) erreicht werden (siehe Abb. 38). Bei Kostimulation mit PPD erhöhten sich die IFN- γ -Werte bei UH bei fünf, bei UT bei sechs Probanden (siehe Abb. 39). Signifikant waren die Anstiege ab der Konzentrationsstufe UH.

BCG bewirkte bei allen Probanden einen hohen Pegel an IFN- γ . Dieser wurde durch die zusätzliche Gabe von Umckaloabo nur unwesentlich beeinflusst.

Über die Hälfte der Probanden reagierte auf Stimulation durch TT mit einer positiven IFN- γ -Produktion. Bei allen Probanden konnten die durch TT erreichten Werte durch Zugabe von Umckaloabo ab der Konzentrationsstufe UH und UT deutlich gesteigert werden, schon ab UZ war dies signifikant (siehe Abb. 40).

Einfluss von Umckaloabo auf die Interferon-g-Produktion von PBMC

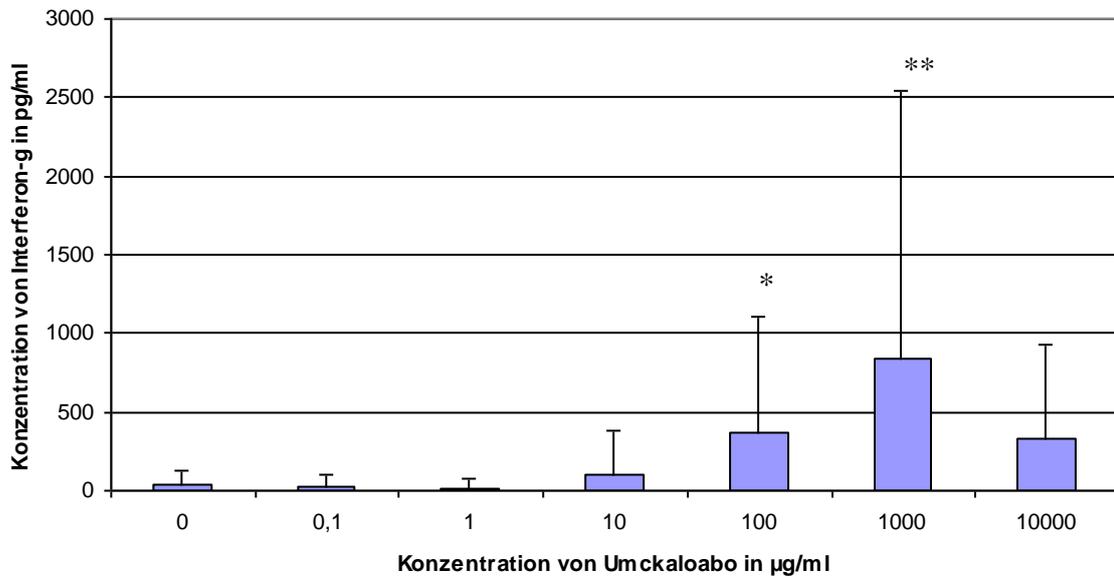


Abb. 38: IFN- γ -Produktion bei unterschiedlichen Konzentrationen von Umckaloabo ohne Kostimulation. Gemittelte Werte von zwanzig Probanden unter Angabe der Standardabweichung. Werte über 624 pg/ml gelten als positiv. Statistisch signifikante p-Werte sind folgendermaßen gekennzeichnet: $p < 0.05$ mit *, $p < 0.01$ mit ** und $p < 0.001$ mit ***.

Einfluss von Umckaloabo auf die PPD-induzierte Interferon-g-Produktion von PBMC

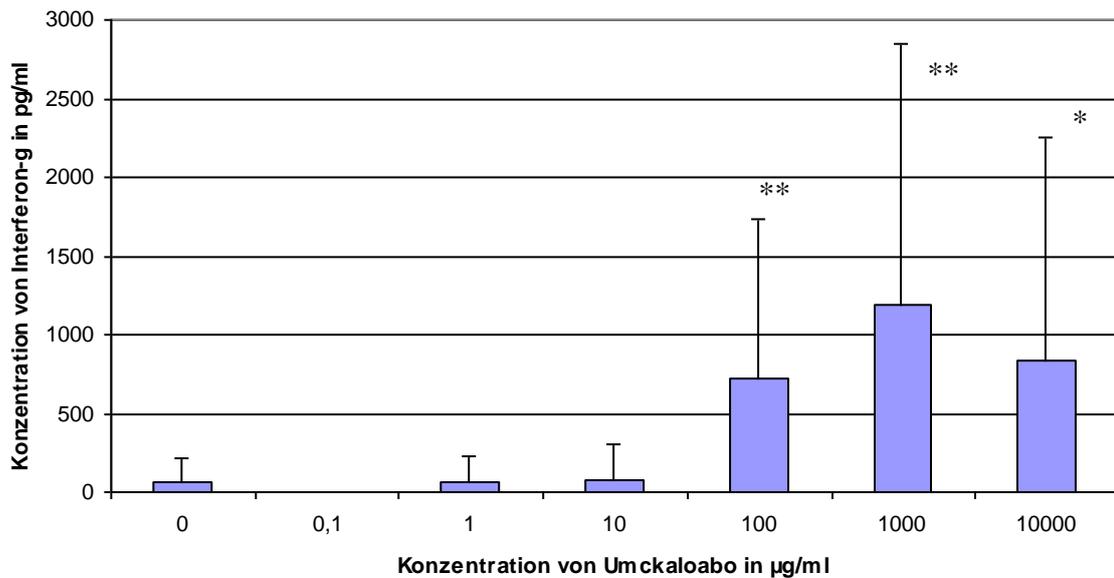


Abb. 39: IFN- γ -Produktion bei unterschiedlichen Konzentrationen von Umckaloabo unter Kostimulation mit TT. Gemittelte Werte von zwanzig Probanden unter Angabe der Standardabweichung. Werte über 624 pg/ml gelten als positiv. Statistisch signifikante p-Werte sind folgendermaßen gekennzeichnet: $p < 0.05$ mit *, $p < 0.01$ mit ** und $p < 0.001$ mit ***.

Einfluss von Umckaloabo auf die TT-induzierte Interferon-g-Produktion von PBMC

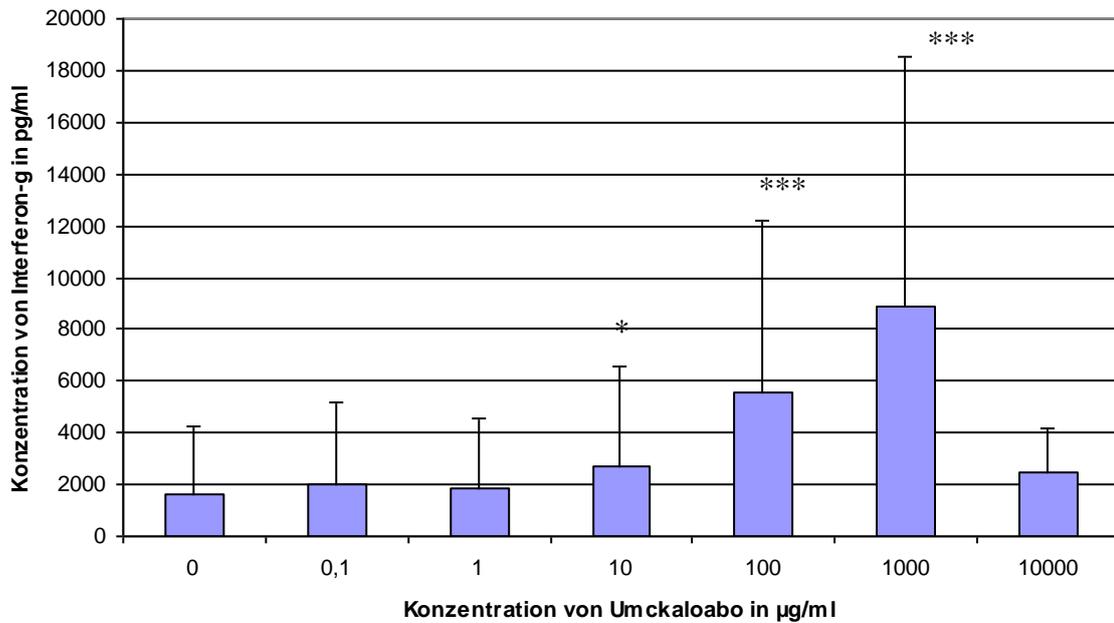


Abb. 40: IFN- γ -Produktion bei unterschiedlichen Konzentrationen von Umckaloabo unter Kostimulation mit TT. Gemittelte Werte von zwanzig Probanden unter Angabe der Standardabweichung. Werte über 624 pg/ml gelten als positiv. Statistisch signifikante p-Werte sind folgendermaßen gekennzeichnet: $p < 0.05$ mit *, $p < 0.01$ mit ** und $p < 0.001$ mit ***.

3.4.4 Einfluss von Umckaloabo auf die Produktion T_{H2} -typischer Zytokine (IL-5, IL-13) durch PBMC (Abb. 41 und 42)

Weder Umckaloabo alleine noch PPD führten zu einer über dem Grenzwert (>468 pg/ml) liegenden Ausschüttung von IL-5. Dagegen konnte durch BCG bei drei von zwanzig Probanden eine deutliche IL-5-Produktion festgestellt werden, die bei Zugabe von Umckaloabo stark absank. TT bewirkte bei fünfzehn der zwanzig Probanden eine positive IL-5-Antwort, die bei vierzehn von diesen durch Zugabe von Umckaloabo gehemmt wurde. Ab der Konzentrationsstufe UZ war dies signifikant (siehe Abb. 41).

Einfluss von Umckaloabo auf die TT-induzierte IL-5-Produktion von PBMC

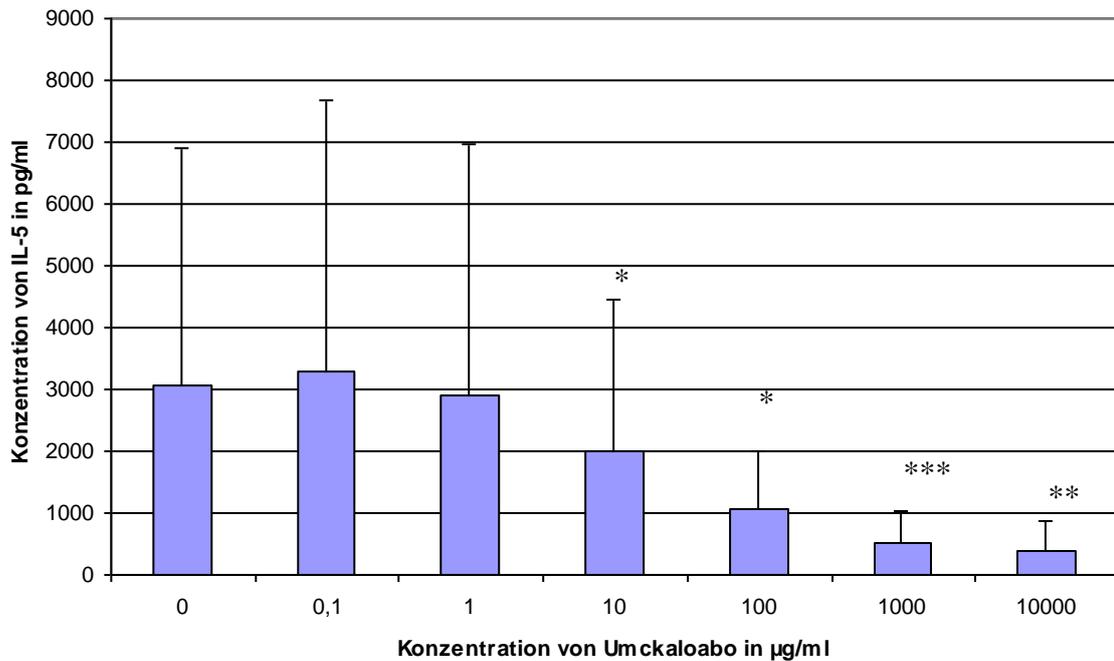


Abb. 41: IL-5-Produktion bei unterschiedlichen Konzentrationen von Umckaloabo unter Kostimulation mit TT. Gemittelte Werte von zwanzig Probanden unter Angabe der Standardabweichung. Werte über 468 pg/ml gelten als positiv. Statistisch signifikante p-Werte sind folgendermaßen gekennzeichnet: $p < 0.05$ mit *, $p < 0.01$ mit ** und $p < 0.001$ mit ***.

Ähnlich verhielt es sich mit der Produktion von IL-13: Weder Stimulation durch Umckaloabo alleine noch durch PPD führte zu einem positiven Wert (>312 pg/ml).

Hingegen vermochte es BCG bei sechs Probanden, eine hohe IL-13-Produktion mit positiven Werte zu bewirken, die bei Zugabe von Umckaloabo wieder unter die Schwelle abfielen. Bei neunzehn Probanden wurde die Stimulation durch TT mit einer positiven IL-13-Ausschüttung beantwortet, die bei allen neunzehn durch Zugabe von Umckaloabo signifikant und stark abnahm (siehe Abb. 42).

Einfluss von Umckaloabo auf die TT-induzierte IL-13-Produktion von PBMC

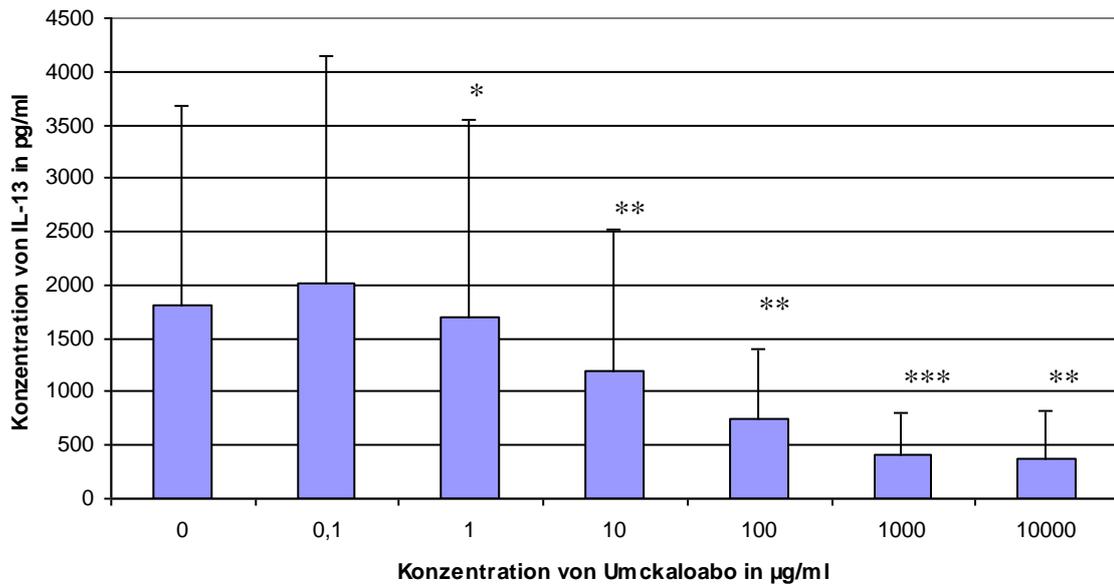


Abb. 42: IL-13-Produktion bei unterschiedlichen Konzentrationen von Umckaloabo unter Kostimulation mit TT. Gemittelte Werte von zwanzig Probanden unter Angabe der Standardabweichung. Werte über 312 pg/ml gelten als positiv. Statistisch signifikante p-Werte sind folgendermaßen gekennzeichnet: $p < 0.05$ mit *, $p < 0.01$ mit ** und $p < 0.001$ mit ***.

3.4.5 Einfluss von Umckaloabo auf die Produktion von IL-10 durch PBMC (Abb.43 und 44)

Die Produktion des u.a. für regulatorische T-Zellen typischen Zytokins IL-10 wurde durch Umckaloabo alleine ab der Konzentrationsstufe U1 signifikant gesteigert und lag ab UH über der als positiv zu wertenden Grenze von 156 pg/ml (siehe Abb. 43). Ähnlich verhielt es sich bei Kostimulation mit PPD, doch lagen hier die Werte in Abwesenheit von Umckaloabo höher (siehe Abb. 44).

Durch TT konnte bei zehn Probanden eine überschwellige Ausschüttung von IL-10 erreicht werden. Diese blieb durch Umckaloabo aber weitgehend unverändert (ohne Abb.).

Unter Kostimulation mit BCG wurde bei dreizehn von zwanzig Probanden eine überschwellige IL-10-Ausschüttung gefunden, die durch Umckaloabo ebenso weitgehend unbeeinflusst blieb (ohne Abb.).

Einfluss von Umckaloabo auf die IL-10-Produktion von PBMC

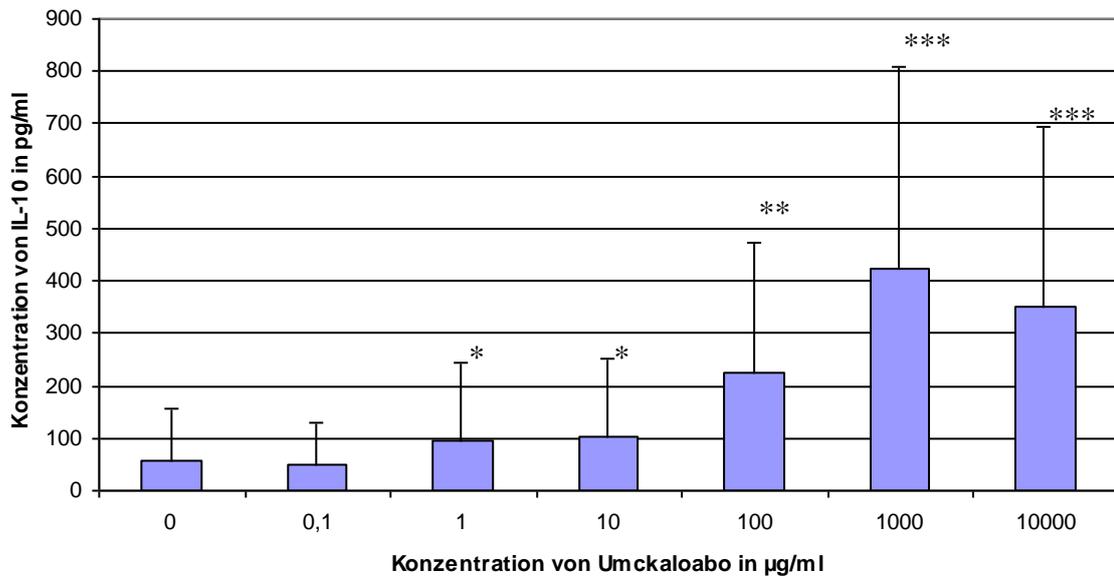


Abb. 43: IL-10-Produktion bei unterschiedlichen Konzentrationen von Umckaloabo ohne weitere Kostimulation. Gemittelte Werte von zwanzig Probanden unter Angabe der Standardabweichung. Werte über 156 pg/ml gelten als positiv. Statistisch signifikante p-Werte sind folgendermaßen gekennzeichnet: $p < 0.05$ mit *, $p < 0.01$ mit ** und $p < 0.001$ mit ***.

Einfluss von Umckaloabo auf die PPD-induzierte IL-10-Produktion von PBMC

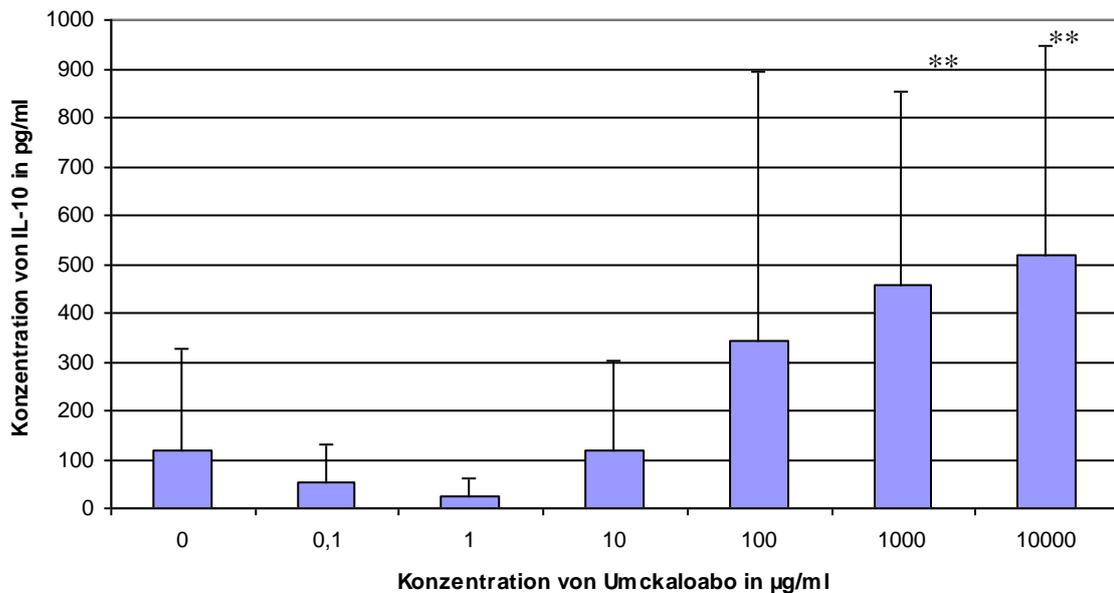


Abb. 44: IL-10-Produktion bei unterschiedlichen Konzentrationen von Umckaloabo unter Kostimulation mit PPD. Gemittelte Werte von vierzehn Probanden unter Angabe der Standardabweichung. Werte über 156 pg/ml gelten als positiv. Statistisch signifikante p-Werte sind folgendermaßen gekennzeichnet: $p < 0.05$ mit *, $p < 0.01$ mit ** und $p < 0.001$ mit ***.

3.4.6 Einfluss von Umckaloabo auf die Produktion von GM-CSF durch PBMC (Abb. 45-48)

Die Produktion von GM-CSF stieg zwar bei zunehmenden Konzentrationen von Umckaloabo ab U1 signifikant an, doch erreichten die Werte erst bei der höchsten Konzentrationsstufe UZT eine als positiv zu wertende Höhe (>312pg/ml). Bei dieser Konzentration erreichten dreizehn Probanden überschwellige Werte (siehe Abb. 45).

Eine ähnliche Situation lag bei Kostimulation mit PPD vor (siehe Abb. 46).

TT löste allein eine starke Ausschüttung von GM-CSF aus, die bei Zugabe von Umckaloabo absank (siehe Abb. 47). In ähnlicher Weise nahm auch die Produktion von GM-CSF bei Kostimulation mit BCG ab (siehe Abb. 48).

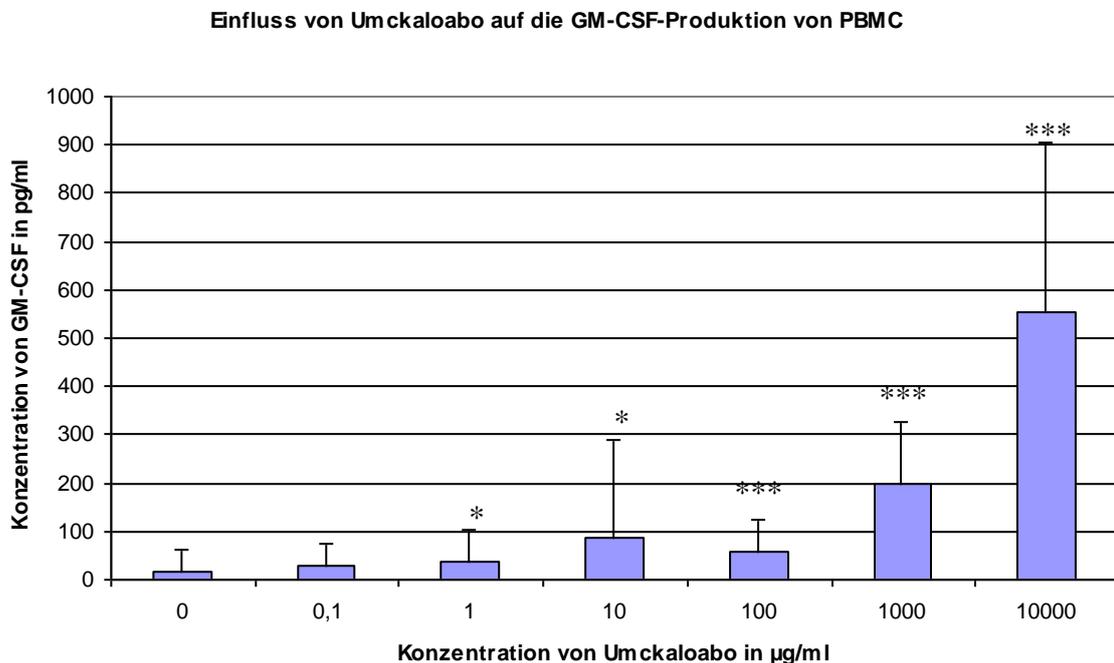


Abb. 45: GM-CSF-Produktion bei unterschiedlichen Konzentrationen von Umckaloabo ohne Kostimulation. Gemittelte Werte von zwanzig Probanden unter Angabe der Standardabweichung. Werte über 312 pg/ml gelten als positiv. Statistisch signifikante p-Werte sind folgendermaßen gekennzeichnet: $p < 0.05$ mit *, $p < 0.01$ mit ** und $p < 0.001$ mit ***.

Einfluss von Umckaloabo auf die PPD-induzierte GM-CSF-Produktion von PBMC

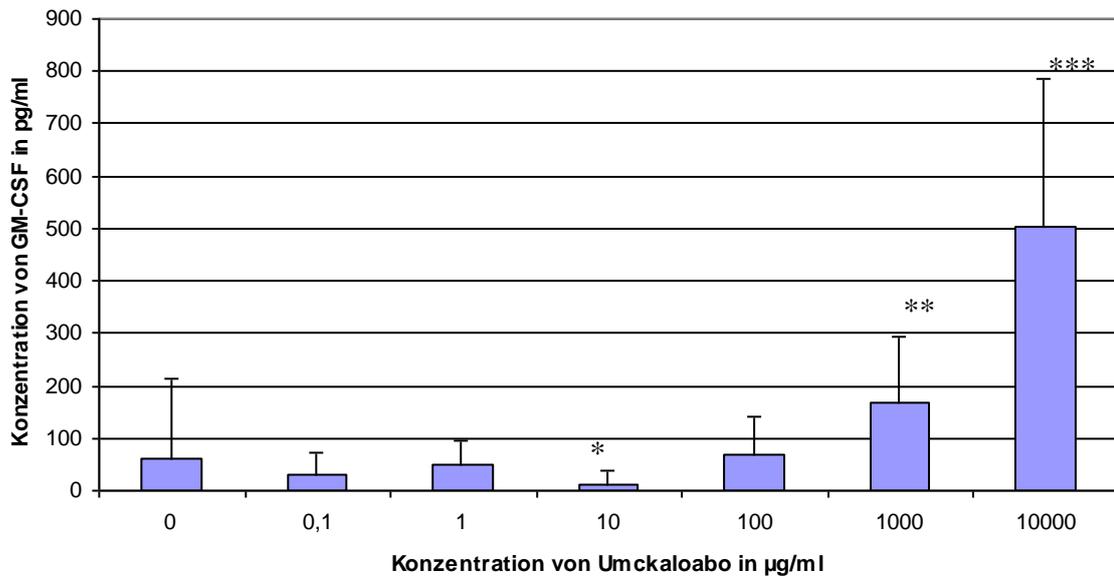


Abb. 46: GM-CSF-Produktion bei unterschiedlichen Konzentrationen von Umckaloabo bei Kostimulation mit PPD. Gemittelte Werte von vierzehn Probanden unter Angabe der Standardabweichung. Werte über 312 pg/ml gelten als positiv. Statistisch signifikante p-Werte sind folgendermaßen gekennzeichnet: $p < 0.05$ mit *, $p < 0.01$ mit ** und $p < 0.001$ mit ***.

Einfluss von Umckaloabo auf die TT-induzierte GM-CSF-Produktion von PBMC

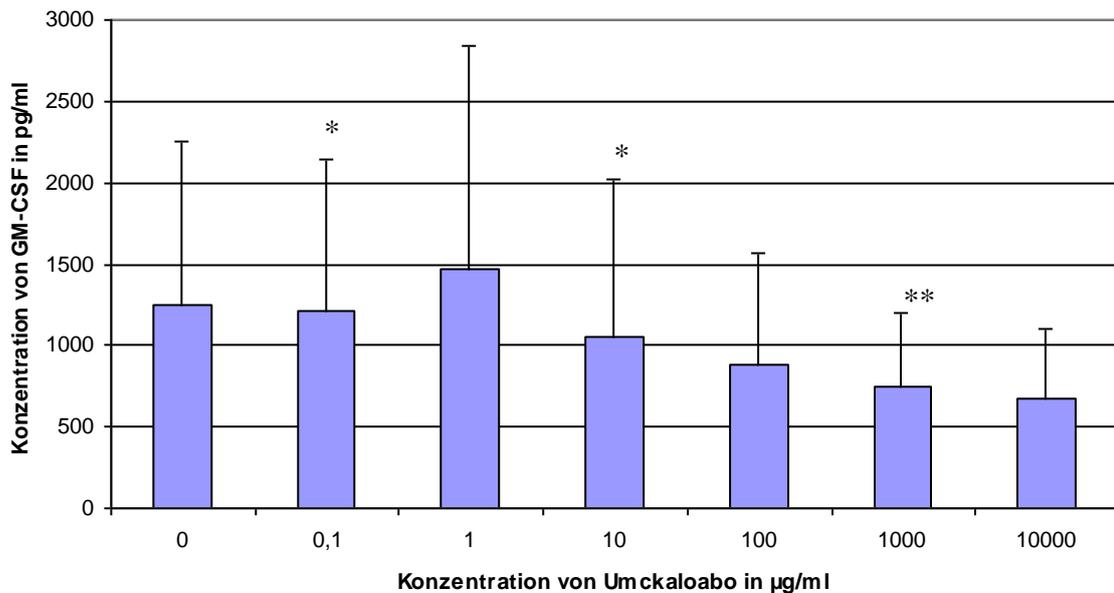


Abb. 47: GM-CSF-Produktion bei unterschiedlichen Konzentrationen von Umckaloabo bei Kostimulation mit TT. Gemittelte Werte von zwanzig Probanden unter Angabe der Standardabweichung. Werte über 312 pg/ml gelten als positiv. Statistisch signifikante p-Werte sind folgendermaßen gekennzeichnet: $p < 0.05$ mit *, $p < 0.01$ mit ** und $p < 0.001$ mit ***.

Einfluss von Umckaloabo auf die BCG-induzierte Produktion von GM-CSF von PBMC

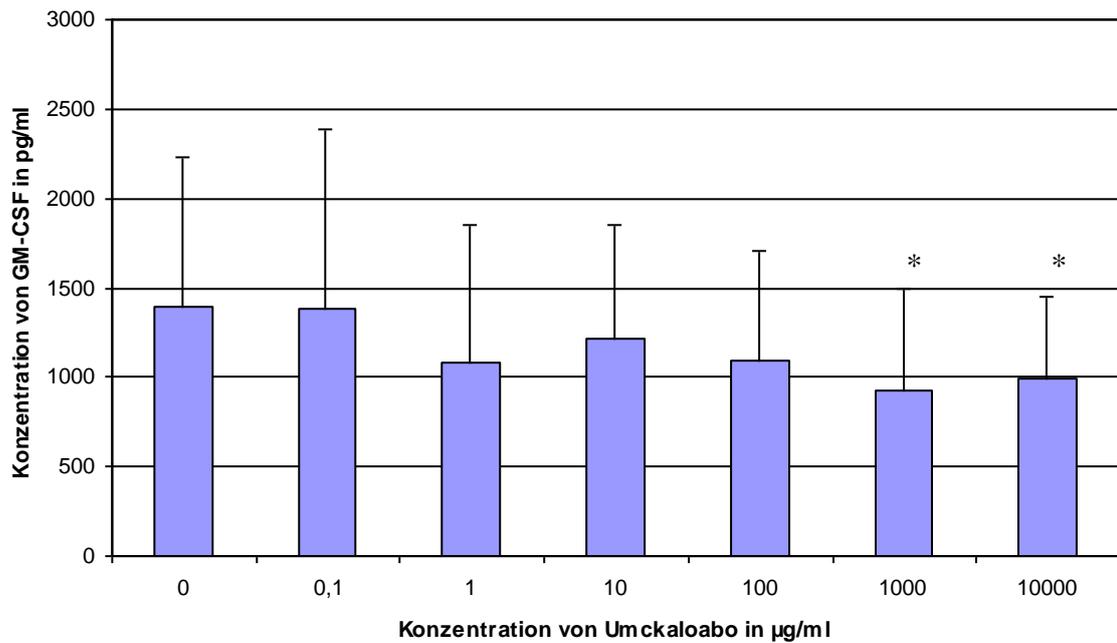


Abb. 48: GM-CSF-Produktion bei unterschiedlichen Konzentrationen von Umckaloabo bei Kostimulation mit BCG. Gemittelte Werte von zwanzig Probanden unter Angabe der Standardabweichung. Werte über 312 pg/ml gelten als positiv. Statistisch signifikante p-Werte sind folgendermaßen gekennzeichnet: $p < 0.05$ mit *, $p < 0.01$ mit ** und $p < 0.001$ mit ***.

4 DISKUSSION

4.1 Bewertung der Zellproliferation

Eindrücklich erscheint bezüglich der Zellproliferation zunächst, dass durch Umckaloabo alleine ab einer Konzentrationsstufe von 1 µl/ml eine signifikante Proliferationssteigerung zu detektieren ist und damit die immunstimulierende Potenz des Medikamentes auch *in-vitro* deutlich sichtbar wird. Besonders deutlich zeigt sich dies bei der Konzentration von 100 µl/ml (UH), bei der dreizehn von zwanzig Probanden SI-Werte von über 3 aufwiesen. Unter diesen waren 3 Pollenallergiker und zwei Probanden, die schon einmal Umckaloabo eingenommen hatten, doch war bei niemandem eine Allergie gegen Geranien oder das Medikament selbst bekannt. Somit erscheint es unwahrscheinlich, dass die durch den LTT detektierte Proliferationssteigerung durch beim Probanden individuell vorhandene spezifische Gedächtniszellen bedingt ist, die man beim routinemäßigen Einsatz des LTT in der Diagnostik medikamentöser Allergien nachzuweisen versucht. Auch in der Allergiediagnostik gilt eine positive Reaktion im LTT nicht als beweisend für eine Allergie, sondern nur als hochverdächtig, und muss im klinischen Kontext gesehen werden (Berg *et al.*, 1988).

Der Stimulus TT vermag schon ohne Kostimulation höhere SI-Werte zu erzielen als Umckaloabo alleine (bei unserer Stichprobe im Durchschnitt ein SI von 90). Diese starke Proliferation kann durch die Zugabe von Umckaloabo aber offensichtlich noch deutlich gesteigert werden: Ab einer Konzentration von 10 µl/ml (UZ) ist der Zuwachs signifikant, bei UH hat sich der SI im Durchschnitt verdoppelt. In absoluten Werten betrachtet liegt damit ein sehr starker Anstieg proliferativer Ereignisse vor. Bemerkenswert ist hierbei, dass dieser Effekt ausnahmslos bei allen zwanzig Probanden zu sehen war. TT scheint also eine geeignete Vorstimulation darzustellen, zu der sich synergistisch proliferationssteigernde Effekte durch Umckaloabo gesellen können. Umgekehrt betrachtet, benötigen die PBMC einiger Probanden eine Vorstimulation durch TT, um auf den weniger potenten Stimulus Umckaloabo zu reagieren.

Der ähnlich starke Stimulus BCG (bei unserer Stichprobe im Durchschnitt ein SI von 140) scheint dagegen durch Zugabe von Umckaloabo bei niedrigen Konzentrationen unbeeinflusst zu bleiben, bei hohen Konzentrationen scheint Umckaloabo hier aber eine toxische Wirkung auszuüben (s.u.): Die Proliferationsabnahme ist ab einer Konzentration von 100 µl/ml signifikant. Die Tatsache, dass die Zugabe von Umckaloabo in dieser Kombination keine weitere Proliferationssteigerung bewirkt, lässt vermuten, dass Umckaloabo auf die selben molekularen Netzwerke wirkt wie BCG, aber als deutlich schwächeres Agens keinen zusätzlichen Einfluss auf die schon durch BCG aktivierten Prozesse nehmen kann. Diese Hypothese wird auch dadurch bestärkt, dass BCG ebenso wie Umckaloabo ein Stoffgemisch darstellt, dessen Wirkung vermutlich über verschiedene molekulare Mechanismen vermittelt wird, während Tetanustoxoid ein gereinigtes Protein darstellt.

PPD zeigte von allen vier eingesetzten immunstimulierenden Substanzen die schwächste Wirkung. Dies liegt auch daran, dass in unserer Stichprobe keine eindeutigen T_{H1} -Responder enthalten waren, wie das Profil der Zytokinausschüttung zeigt. Um so eindrücklicher ist aber in diesem Zusammenhang, dass durch die Zugabe von Umckaloabo erst die Wirkung von PPD sichtbar gemacht werden kann. Dies ist anschaulich in Abb. 10 dargestellt, wo die genuine PPD-Wirkung erst bei Kostimulation mit UH deutlich erkannt wird. Ab einer Konzentration von 100 µl/ml ist die Proliferationssteigerung hochsignifikant.

Zusammenfassend zeigen die Ergebnisse des LTT, dass in unserer Stichprobe Umckaloabo sowohl in T_{H1} -Reaktionen als auch in T_{H2} -Reaktionen die Proliferation von PBMC steigerte, aber auch schon ohne Kostimulation bei über der Hälfte des Kollektivs zu einem deutlichen Proliferationsanstieg führte. Diese Effekte sind in einem radioaktiven Proliferationsassay erst nach 4-tägiger Inkubation zu erkennen. Wie mittels Durchflusszytometrie gezeigt werden konnte, handelt es sich bei den proliferierenden Zellen v.a. um CD4-positive, aber auch um CD8-positive und CD56-positive Zellen. CD19-positive Zellen werden ebenso zur Proliferation angeregt, jedoch weniger stark als die zuvor genannten Populationen.

Die Zellproliferation wurde durch sehr hohe Konzentrationen von Umckaloabo (1000 μ /l und 10000 μ g/l) in allen untersuchten Konstellationen wieder deutlich gehemmt. Dieser Effekt war aber erst ab dem vierten Tag zu sehen, am zweiten Tag dagegen führten diese hohen Konzentrationen noch zu proportional höheren Stimulationsindizes. Diese hemmenden Wirkungen von Umckaloabo in diesen Konzentrationsstufen treten also erst zeitverschoben zu Tage. Dies deutet darauf hin, dass es sich hierbei um einen sog. toxischen Effekt handelt, evtl. aber auch um einen erschöpfenden Nährstoffverbrauch bei starker Proliferation. Toxische Effekte bei pflanzlichen Extrakten sind nach Erfahrungen unseres Labors keine seltene Erscheinung. Dabei kann auch der Alkoholgehalt eine Rolle spielen: Dieser beträgt in der Konzentration UZT rechnerisch 1,5 ‰, entspricht also dem Alkoholblutgehalt mancher Alkoholiker und damit einer immunkompromittierten Situation. Allerdings ist von einer schnellen Verdampfung des Alkohols während der Verarbeitung und der Inkubation bei 37° Celsius auszugehen, so dass die wahre Ethanolkonzentration sicher noch deutlich niedriger ist.

4.2 Bewertung der CD69-Expression

Die Analyse der Expression des frühen Aktivierungsmarkers CD69 stützt die Ergebnisse der Proliferationsassays, doch sind vermutlich aufgrund des frühen Untersuchungszeitpunktes (Tag 2) die hohen Expressionswerte zu den hohen Umckaloabo-Konzentrationen hin verschoben. So werden die Expressionsunterschiede bei den CD8- bzw. CD56-positiven Zellen erst ab einer Konzentration von 100 μ l/ml signifikant.

Äquivalent zur durchflusszytometrischen Proliferationsanalyse am Tag 7 werden alle vier untersuchten Zellpopulationen durch Umckaloabo alleine signifikant zur Expression von CD69 angeregt: So führt beispielsweise die Konzentration UT bei CD4-, CD8- und CD56-Zellen zu einer Verdreifachung, bei CD19-Zellen zu einer Verfünffachung der CD69-Expression. Ein nahezu identisches Bild zeigt die Analyse der CD69-Expression bei Kostimulation mit

PPD. Im Gegensatz zum LTT scheint die CD69-Expression also keine geeignete Methode darzustellen, um die spezifische Zellaktivierung durch PPD darzustellen, zumindest in unserem Kollektiv von T_{H2} - und T_{H1}/T_{H2} -Respondern. Dagegen fällt die CD69-Expression bei Kostimulation mit TT wieder so aus wie es die Ergebnisse der Proliferationsassays erwarten lassen: Die Konzentrationsstufe UT führt hier bei CD4-, CD8- und CD56-Zellen zu einer Verdopplung, bei CD19-Zellen zu einer Verfünffachung der CD69-Expression. Schon bei einer Konzentration von 10 μ l/ml steigt die Expression der CD8-Zellen signifikant an, die der CD56-Zellen bei einer Zehnerpotenz höher (UH). In Anwesenheit des starken Kostimulus BCG wird auch die Expression von CD69 nicht nennenswert durch Umckaloabo beeinflusst. Auch dieser Befund stützt die unter 4.1 genannten Überlegungen hinsichtlich der Proliferation. Der deutlichste qualitative Unterschied zwischen Proliferation und CD69-Expression besteht im Verhalten der CD4-Zellen: Während diese nach einer Woche am stärksten proliferieren, zeigen sie nach zwei Tagen erst bei höheren Konzentrationen signifikante Steigerungen der CD69-Expression als die CD8- und CD56-Zellen, verhalten sich aber quantitativ nahezu identisch wie diese. Dieser Unterschied kann zum einen an den unterschiedlichen Zeitpunkten liegen, ist aber auch Ausdruck davon, dass CD69-Expression nicht mit Proliferation gleichzusetzen ist.

4.3 Bewertung des Verhaltens der regulatorischen T-Zellen

Interessanterweise führt Umckaloabo nicht nur zu einer Aktivierung und zur Proliferation von CD4-Zellen, sondern auch innerhalb der CD4-Population zu einem deutlichen Anstieg des Anteils regulatorischer T-Zellen (CD4, CD25, Foxp3 positiv). Wie schon bei den oben genannten Versuchen zeigt die Zugabe von Umckaloabo ohne Kostimulus die größte Wirkung, nämlich die Verdopplung dieses Anteils. In Anwesenheit der Kostimuli PPD und TT fällt dieser Effekt zwar kleiner aus, ist aber mit einem Anstieg um jeweils ein Viertel noch deutlich erkennbar.

Mit dem Zuwachs dieser gegenregulierenden Zellpopulation verhält sich Umckaloabo ebenso wie die T_{H1} - bzw. T_{H2} -Stimuli PPD bzw. TT anders als das reine Mutagen PWM, wo sich in unserem Versuch der Anteil an regulatorischen T-Zellen im Vergleich zum Ausgangswert halbierte.

Zunächst verwundert es, dass ein immunstimulierendes Medikament die inhibitorischen T_{reg} -Zellen proliferieren lässt. Andererseits könnte dieser Umstand einer „selbstlimitierten“ Immunstimulation auch im Zusammenhang mit der klinischen Erfahrung stehen, dass Umckaloabo keine Autoimmunphänomene bedingt und insgesamt nur zu einem leichten Anstieg der Nebenwirkungen gegenüber Placebo führt (Timmer *et al.*, 2008).

4.4 Bewertung der Zytokin-Produktion

Die Ausschüttung der Makrophagen-typischen Zytokine IL-1, IL-6 und TNF- α wurde in unserer Stichprobe durch Umckaloabo ab einer Konzentration von 100 $\mu\text{g/ml}$ deutlich gesteigert. Die IL-6-Produktion war dabei ab 10 $\mu\text{l/ml}$ signifikant erhöht, bezüglich IL-6 und TNF- α führten erst höhere Konzentrationen zu signifikanten Unterschieden. Ähnlich war die Situation bei Kostimulation mit TT bzw. PPD.

Diese Ergebnisse bestätigen die Untersuchungen einer anderen Arbeitsgruppe (Trun *et al.*, 2006), die an murinen Makrophagen ebenfalls einen Anstieg dieser Zytokine in Anwesenheit von Umckaloabo dokumentierte (siehe 1.4.2.2).

Ebenso konnten wir die Ausschüttung des T_{H1} -typischen IFN- γ reproduzieren, wenn auch nur bei einem Viertel der Probanden durch Umckaloabo alleine. Bei Kostimulation mit TT bzw. PPD konnte dafür bei allen Probanden ein deutlicher Anstieg der IFN- γ -Sekretion durch Zugabe von Umckaloabo induziert werden, welcher schon bei einer Konzentration von 10 $\mu\text{l/ml}$ signifikant war.

Konträr dazu wurde die TNF- β -Synthese in dieser Konstellation aber durch Umckaloabo in derselben Konzentration signifikant gehemmt.

Eine Erklärungsmöglichkeit für das scheinbar gegenläufige Verhalten dieser beiden T_{H1} -typischen Zytokine wäre, dass das gebildete IFN- γ nicht von T_{H1} -

Zellen, sondern von Makrophagen stammen könnte. Diese sind zwar untypische Syntheseorte von IFN- γ , doch konnte die oben genannte Arbeitsgruppe zeigen, dass Umckaloabo Leishmanien-infizierte Makrophagen dennoch zur Ausschüttung von IFN- γ stimuliert. Dagegen spricht aber die Tatsache, dass die Makrophagen-typischen Zytokine IL-1, IL-6 und TNF- α schon am Tag 2 den maximalen Spiegel erreichen, während dieser bei IFN- γ erst am Tag 4 sein maximales Niveau erreicht. Dies deutet daraufhin, dass zwei unterschiedliche Zellpopulationen für die Synthese der beiden Zytokine verantwortlich sind.

Daher liegt eher die Hypothese nahe, dass Umckaloabo selektiv zur Synthese von IFN- γ in T_{H1}-Zellen führt und auf anderem Signalweg die Synthese von TNF- β gehemmt wird. Der Effekt ist bei beiden Hypothesen derselbe, nämlich eine durch IFN- γ vermittelte Aktivierung von Makrophagen, Verstärkung von MHC-Expression und Antigenprozessierung und Hemmung von T_{H2}-Reaktionen. Letzteres wird auch beim Blick auf die T_{H2}-typischen Zytokine IL-5 bzw. IL-13 deutlich: Diese fielen beide deutlich durch Zugabe von Umckaloabo ab. Zudem war dies schon bei sehr niedrigen Konzentrationen signifikant (10 μ l/ml bzw. 1 μ l/ml).

Besonders interessant ist die Wirkung von Umckaloabo auf die Sekretion der beiden Zytokine GM-CSF und IL-10: Die Ausschüttung von GM-CSF, das die allgemeine Aktivierung von T-Zellen und Makrophagen repräsentiert, stieg nur bei fehlender Kostimulation oder bei der schwachen Kostimulation durch PPD signifikant an, wo geringe immunologische Grundaktivität vorhanden ist. Dagegen nahm sie in Gegenwart der starken Kostimuli BCG und TT bei steigenden Konzentrationen von Umckaloabo signifikant ab.

Gleichsinnig dazu verhielten sich die Spiegel von IL-10, das eine gegenregulierende immunologische Wirkung hat und insbesondere von regulatorischen T-Zellen und Makrophagen ausgeschüttet wird: Sie stiegen ebenfalls nur in den geschilderten Situationen signifikant an, wo geringere immunologische Aktivität zu verzeichnen ist.

Die Kinetik der beiden genannten Zytokine verhält sich aber grundsätzlich anders: IL-10 weist schon sehr früh (Tag 2) sehr hohe Spiegel auf, die zum Tag

7 nur noch ein Fünftel des Ausgangswerts betragen und am Tag 8 weiter abfallen. Dagegen bleibt GM-CSF auf gleichmäßigem Niveau. Damit ergibt sich trotz des zunächst scheinbar deutlich höheren Spiegels von IL-10 nach einer Woche ein umgekehrtes Bild und somit überwiegt für den längeren Zeitraum offenbar die immunstimulierende Wirkung.

Die Herkunft des ausgeschütteten IL-10 ist dabei aber nicht eindeutig einer Zellpopulation zuzuordnen: Einerseits spricht die Kinetik dafür, dass es von Makrophagen im Sinne einer negativen Rückkopplung gleichzeitig mit proinflammatorischen Zytokinen ausgeschüttet wird (Chang *et al.*, 2007). Andererseits passt auch das unter 4.3 diskutierte Verhalten der regulatorischen T-Zellen zum IL-10- Spiegel, so dass nahe liegt, dass Umckaloabo nicht nur zu einer Vergrößerung dieser Zellpopulation führt, sondern diese Zellpopulation auch zur Synthese von IL-10 stimuliert.

4.5 Zusammenfassende Betrachtung unter klinischen Aspekten

Die akute Bronchitis gehört zu den häufigsten Erkrankungen und nimmt eine Spitzenstellung unter den Krankmeldungen ein. Nur selten findet man eine isolierte Erkrankung der Bronchien, meistens handelt es sich um eine Tracheobronchitis unter Beteiligung weiterer Bereiche der Atemwege. Die Erkrankung wird in der Regel mit einem Virusinfekt eingeleitet, der das Immunsystem destabilisiert und den Weg für eine bakterielle Superinfektion ebnet.

Unsere Untersuchungen konnten zeigen, dass Umckaloabo schon in einer Konzentration von 1 µg/ml zu einer signifikanten Steigerung der Proliferation von Lymphozyten führt, die in einer Konzentration von 100 µg/ml auch quantitativ sehr deutlich wird. Dies gilt gleichermaßen unter Kostimulation eines typischen T_{H2}-Stimulus wie eines T_{H1}-Stimulus, auf den die untersuchte Population ohne Kostimulation nur schwach reagierte. In Gegenwart des v.a. auf Makrophagen wirkenden BCG scheint Umckaloabo dagegen nahezu keine Wirkung zu haben. Dies deutet daraufhin, dass Umckaloabo v.a. auf

Makrophagen (aber deutlich schwächer als BCG) und auf T_{H1}-Zellen wirkt (gleich oder sogar stärker als PPD, wie die additive Wirkung zeigt). Die Proliferation der genannten Zelltypen findet auch in der typischen Zytokinausschüttung des jeweiligen Zelltyps Niederschlag und führt damit zu deren Bestätigung: Makrophagen-typische Zytokine sowie das T_{H1}-typische IFN- γ werden in Anwesenheit von Umckaloabo in einer Konzentration von 100 μ g/ml signifikant vermehrt produziert. Ebenso zeigt die durchflusszytometrische Analyse als am stärksten proliferierende Zellpopulation die CD4-Zellen, zu denen u.a. T_{H1}-Zellen und regulatorische T-Zellen zählen. Der Anteil letzterer steigt durch den Einfluss von Umckaloabo überproportional an, was mit einem signifikanten Anstieg der IL-10 Ausschüttung korreliert, die nach einer Woche wieder deutlich abnimmt.

Die in klinischen Studien gezeigte Wirksamkeit von Umckaloabo würde demnach auf einer Aktivierung von Makrophagen und T_{H1}-Zellen beruhen, die im Rahmen einer durch regulatorische T-Zellen balancierten Gesamtaktivierung des Immunsystems stattfindet und insbesondere durch die Synthese von IFN- γ und IL-10 charakterisiert ist. Dies steht nicht nur im Einklang mit einer antiviralen Wirkung im eingangs geschilderten Zusammenhang der Bronchitis, sondern auch mit dem historisch belegten Einsatz für die Behandlung der Tuberkulose, zu deren Bekämpfung ebenfalls wie bei Viren eine T_{H1}-dominante Immunabwehr erforderlich ist.

Die Kinetik von Proliferation und IFN- γ -Sekretion deutet dabei darauf hin, dass die Wirkung von Umckaloabo auf T_{H1}-Zellen erst nach Ablauf einiger Tage zum Tragen kommt, während die Aktivierung von Makrophagen sich schon nach zwei Tagen über Makrophagen-typische Zytokine nachweisen lässt.

Zu hinterfragen bleibt die Erreichbarkeit einer Konzentration von 100 μ g Umckaloabo/ml im Blut: Die in der Einleitung zitierten Studien zu den immunmodulierenden Eigenschaften von Umckaloabo setzten Konzentrationen von 25 μ g/ml, 30 μ g/ml und 50 μ g/ml ein, bewegen sich also in einem ähnlichen Bereich. Die für die klinischen Studien vorgeschriebene Dosierung waren 3 mal täglich 30 Tropfen, entsprechend 4,5 ml Umckaloabo bzw. 3,6 mg Pflanzenauszug pro Tag und Person.

Wenn man davon ausgeht, dass es sich bei den in Umckaloabo enthaltenen wirksamen Molekülen um verschiedene hydrophile Polyphenole handelt, deren Verteilungskoeffizient ähnlich dem des therapeutisch eingesetzten Cumarin Warfarin (mit einem Verteilungskoeffizienten von 0,2 l/kg Körpergewicht) ist, so erhielte man bei einer 70 kg schweren Person ein Verteilungsvolumen von 14 Litern. Bei einer (unrealistisch hohen) Bioverfügbarkeit von 100% ergibt sich also rechnerisch eine Plasmakonzentration von 0,26 µg/ml. Zwar ist diese Rechnung grob vereinfacht, doch kann schwerlich der Plasmaspiegel von Umckaloabo bestimmt werden, solange die therapeutische Wirkung nicht klar einzelnen Molekülen zuzuordnen ist.

Somit scheinen die Konzentrationen, bei denen in unserer Studie die beschriebenen *in-vitro*-Effekte durch Umckaloabo auftraten, *in vivo* zumindest nicht im Blut erreichbar zu sein, zumal Zweifel an der Resorption vieler der hochmolekularen Gerbstoffe berechtigt sind. Allerdings konnte der extrem sensitive radioaktive Proliferationsassay schon bei einer Konzentration von 1 µg/ml eine signifikante Proliferationssteigerung detektieren, der sich schon fast im errechneten Bereich befindet.

Zudem ist eine direkte Wechselwirkung der Bestandteile von Umckaloabo mit den Schleimhäuten und damit dem Mukosa-assoziierten lymphatischen Gewebe (MALT) des Magen-Darm-Traktes (GALT) denkbar, insbesondere da das Mukosa-assoziierte lymphatische Gewebe der Bronchien (BALT) über zirkulierende Leukozyten mit diesem in Wechselwirkung steht (Kunisawa *et al.*, 2005). So führt beispielsweise bei Schweinen eine Immunisierung gegen Enteritis-Erreger über die Darmschleimhaut auch zu einer Immunität des Respirationstrakts gegen Coronaviren mit ähnlichen Epitopen (VanCott *et al.*, 1994). Über vergleichbare Mechanismen ist durchaus die Aktivierung von T-Zellen im GALT durch Umckaloabo denkbar, die im Laufe ihrer Aktivierung im Blutkreislauf zirkulieren, sich im Gewebe des BALT anreichern und so dort zu einer Immunmodulation führen. Allerdings überwiegen in den Mukosa-assoziierten lymphatischen Geweben die T_{H2}-Zellen und eine orale Zufuhr von Antigenen verschiebt tendenziell die Immunreaktionen in Richtung T_{H2} und wirkt so auch Autoimmunreaktionen entgegen (Targoni *et al.*, 1999). Andererseits

zeigt z.B. die zuvor zitierte Studie (VanCott *et al.*, 1994), dass antivirale Immunmechanismen auch MALT-vermittelt ablaufen, und insgesamt ist das schleimhautassoziierte Immunsystem noch wenig verstanden.

Was die Dosierung betrifft, sind zumindest in der Darmschleimhaut topisch durchaus Umckaloabo-Konzentrationen möglich, die die oben genannten Werte erreichen. Dies wäre auch eine schlüssige Erklärung dafür, dass für Umckaloabo bisher nur bei Bronchitiden eine klinische Wirkung bewiesen ist, aber nicht für systemische Infektionen.

Andererseits muss auch beachtet werden, dass *in-vitro*-Modelle insbesondere bei immunologischen Fragestellungen nie die Komplexität der *in-vivo*-Vorgänge direkt abbilden können. Insbesondere das dichte und hochspezialisierte Netzwerk antigenpräsentierender Zellen in den lymphatischen Organen wird in unserem *in-vitro*-Modell nicht vergleichbar repräsentiert. So ist davon auszugehen, dass *in vivo* durchaus auch bei niedrigeren Konzentrationen von Umckaloabo die beschriebenen Effekte auftreten, weil dort eine bessere Antigenpräsentation gewährleistet ist.

Zusammenfassend ist also durchaus anzunehmen, dass die dargestellte Stimulierung von Zellproliferation und Zytokinausschüttung das zellbiologische Korrelat der empirisch nachgewiesenen klinischen Effekte von Umckaloabo darstellt. Weitere Klarheit würden diesbezüglich *in-vitro*-Untersuchungen geben, bei denen dem Proband selbst Umckaloabo oral verabreicht wird und z.B. die entsprechenden Zytokinmuster vor und nach Exposition untersucht würden.

4.6 Mögliche Nebenwirkungen

Der erwähnte hohe Anteil an Cumarinen im Stoffgemisch Umckaloabo lässt zunächst eine Beeinflussung der Blutgerinnung durch Vitamin-K-Antagonismus vermuten, wie er z.B. durch das Cumarin Warfarin therapeutisch eingesetzt wird. Im Tierexperiment konnte aber gezeigt werden, dass Umckaloabo weder direkt die Blutgerinnungsparameter beeinflusst noch über Wechselwirkungen mit Warfarin dessen Pharmakokinetik verändert (Koch, Biber, 2007). Ebenso

zeigen die im Abschnitt 1.3 genannten klinischen Studien, dass die Befürchtungen unbegründet sind, durch Umckaloabo eine zu starke Stimulierung des Immunsystems im Sinne einer Anaphylaxie, Allergisierung oder SIRS zu erreichen. Bei den gemeldeten unerwünschten Nebenwirkungen von Umckaloabo standen leichte gastrointestinale Beschwerden im Vordergrund (Durchfall, Oberbauchschmerzen, Brechreiz, Singultus, Dysphagie, Blähungen). Diese könnten einerseits direkt durch die in Umckaloabo enthaltenen Gerbstoffe ausgelöst worden sein, könnten aber Ausdruck einer zwar übermäßigen, doch selbstlimitierenden gastroenterischen Immunreaktion sein.

4.7 Ausblick

In der vorliegenden Arbeit konnten zum erstmaligen Wirkungen des Phytotherapeutikums Umckaloabo (Eps®7630) auf Zellen des spezifischen Immunsystems gezeigt werden, dabei insbesondere T_{H1} -Zellen und regulatorische T-Zellen. Von den *in vitro* gewonnenen Ergebnissen kann aber bei einem oral verabreichten Medikament nicht unbedingt auf die Situation *in vivo* rückgeschlossen werden, auch wenn sie sich schlüssig mit klinischen Befunden decken. Um den klaren Beweis einer Einflussnahme von Umckaloabo auf T-Zellen *in vivo* nachzuweisen, bedürfte es aufwändigerer Versuche an Tier oder Mensch wie unter 4.5 angesprochen.

Auch was die Wirkung *in vitro* betrifft, so muss auf die untersuchte Population von nur 20 Probanden hingewiesen werden, die nicht zwingend repräsentativ für die Gesamtpopulation ist. Insbesondere weil alle geschilderten Ergebnisse an einer T_{H2}/T_{H0} -Population gewonnen wurden, müssen diese nicht selbstverständlich für T_{H1} -Responder gelten. Somit wären weitere Versuchsreihen an einem größeren Kollektiv von Interesse, insbesondere auch an einer Population von Probanden mit bekannter T_{H1} -Reaktion.

5 Zusammenfassung

Extrakte der südafrikanischen Geranienart *Pelargonium sidoides* werden schon seit Jahrhunderten in der dortigen traditionellen Medizin zur Behandlung von Infektionskrankheiten eingesetzt, so beispielsweise der Lungentuberkulose.

In den letzten Jahren wird das kommerzielle Präparat Umckaloabo (Eps®7630), ein ethanolischer Auszug aus den Wurzeln von *Pelargonium sidoides* und *P. reniforme*, sehr erfolgreich insbesondere in Deutschland vertrieben und zur Behandlung von Infektionen der Atemwege und des HNO-Bereichs eingesetzt. Für diese Indikation existieren auch einige klinische Studien, so zwei randomisierte, doppelblinde und placebokontrollierte Studien aus dem Jahre 2003, in denen jeweils eine Symptommilderung und eine Verkürzung der Krankheitsdauer um durchschnittlich 2 Tage festgestellt wurde.

Chemische Analysen des Pflanzenausuges Umckaloabo ergaben, dass eine große Palette an Polyphenolen (Gallussäurederivate, Tannine, Flavanole, Proanthocyanidine) die für diese Effekte potentiell verantwortlichen Wirkstoffe sind. Die wenigen bisherigen experimentellen Studien zeigten eine erhöhte Interferon- β -Synthese in virusinfizierten Zellen bei Zugabe von Umckaloabo. Außerdem konnte gezeigt werden, dass intrazelluläre Erreger (Leishmanien) in Makrophagen unter Zusatz von Umckaloabo deutlich besser eliminiert werden, einhergehend mit einer erhöhten Expression der NO-Synthase und einer erhöhten Freisetzung von TNF- α , IL-1, IL-12, IL-18 und IFN- α/γ . Alle bisherigen Untersuchungen betrachteten dabei nur das angeborene Immunsystem.

Ziel dieser Arbeit war deshalb die Untersuchung der Wirkung von Umckaloabo auf Zellen des erworbenen Immunsystems. Dabei wurden PBMC von insgesamt 20 gesunden Probanden *in-vitro* kultiviert. Durch entsprechende kostimulierende Antigene (BCG, PPD und Tetanus-Toxoid) wurden T_{H1}- bzw. T_{H2}-Immunreaktionen provoziert und der Einfluss von Umckaloabo in unterschiedlichen Konzentrationen innerhalb dieses *in-vitro*-Testsystems untersucht. Zum Einsatz kamen dabei Methoden zur quantitativen Zytokinbestimmung mittels Sandwich-ELISA und Proliferationsassays mit radioaktiven und durchflusszytometrischen Detektionsmethoden. Mit dem

Durchflusszytometer wurde außerdem die Expression des frühen Aktivierungsmarkers CD69 und verschiedener Zelloberflächenmoleküle (CD4, CD8, CD19, CD56) bestimmt. Nach Permeabilisierung der Zellmembran wurde die Expression des intrazellulären Proteins Foxp3 gemessen und so auf den Anteil regulatorischer T-Zellen (T_{reg}) innerhalb der CD4-positiven Population geschlossen.

Dabei zeigte sich, dass Umckaloabo in Konzentrationen von 1 bis 1000 $\mu\text{g/ml}$ bei über der Hälfte der Probanden zu einer signifikanten Steigerung der Proliferation führte: im Mittel stieg der Stimulationsindex ($SI = \text{Zählrate mit Antigen}/\text{Zählrate ohne Antigen}$) nach einwöchiger Inkubation um den Faktor 10. Diese Reaktion konnte auch bei Kostimulation mit PPD beobachtet werden, während die Kostimulation mit TT nur zu einer Verdopplung des SI führte. Durch BCG kostimierte Zellen wurden durch Umckaloabo in ihrer Proliferation leicht gehemmt.

Durchflusszytometrisch konnte dargestellt werden, dass es sich hierbei v.a. um einen überproportionalen Zuwachs von CD4-positiven Zellen handelt, etwas weniger auch von CD8- bzw. CD56-positiven Zellen. CD19-positiv Zellen wurden dagegen weniger beeinflusst. Die nach eintägiger Inkubation gemessene Expression des frühen Aktivierungsmarker CD69 stieg ebenfalls ab einer Konzentration von 10 $\mu\text{g/ml}$ signifikant bei diesen Zellreihen.

Die Analyse der Zytokinproduktion zeigte, dass die für Makrophagen typischen Zytokine wie IL-1, IL-6 und $\text{TNF-}\alpha$ ab Konzentrationen von 10 $\mu\text{g/ml}$ von Umckaloabo signifikant anstiegen, ebenso bei Kostimulation durch PPD oder TT. Diese Ergebnisse korrelieren mit den eingangs zitierten Untersuchungen. Die Ausschüttung des T_{H1} -typischen Zytokins $\text{TNF-}\beta$ bei Kostimulation mit TT wurde ab Konzentrationen von 10 $\mu\text{g/ml}$ signifikant gehemmt, die Ausschüttung von $\text{INF-}\gamma$ in dieser Konstellation signifikant gesteigert. Die durch TT induzierte Produktion der T_{H2} -typischen Zytokine IL-5 und IL-13 wurde durch Umckaloabo ab Konzentrationen von 1 $\mu\text{g/ml}$ signifikant gehemmt. Die Ausschüttung des u.a. für regulatorische T-Zellen typischen IL-10 durch Umckaloabo wurde ab Konzentrationen von 1 $\mu\text{g/ml}$ signifikant gesteigert. Bei Kostimulation mit PPD war eine ähnliche Reaktion zu sehen, während die IL-10-Pegel bei den starken

Kostimuli TT bzw. BCG durch Zugabe von Umckaloabo nicht verändert wurden. Die durchflusszytometrische Analyse der regulatorischen T-Zellen zeigte eine deutliche Zunahme des Anteils an T_{reg} innerhalb der Population der CD4-positiven Zellen bei Zugabe von Umckaloabo, die in schwächerer Ausprägung auch bei Kostimulation mit TT bzw. PPD zu sehen war.

Zusammenfassend konnten die angeführten experimentellen Untersuchungen zeigen, dass Umckaloabo in einem *in-vitro*-System komplexe Wirkungen gegenüber Lymphozyten zeigt. Diese werden sowohl in T_{H1} - als auch in T_{H2} -Reaktionen durch gesteigerte Proliferation von T-Helferzellen, T-Killerzellen und NK-Zellen deutlich, aber auch schon ohne die Anwesenheit weiterer Stimuli. Gleichzeitig verschiebt sich das Zytokinprofil in allen untersuchten Konstellationen in Richtung T_{H1} -typischer Botenstoffe. Ferner scheint die Substanz T_{reg} zu aktivieren, was möglicherweise erklärt, dass das Medikament nur in seltenen Fällen zu Überreaktionen führt. Aus der Kinetik der Immunreaktion könnte gleichermaßen die Notwendigkeit erklärt werden, dass das Medikament zur optimalen Wirkung schon einige Tage vor eventuellen Infektionen eingenommen werden sollte. Die verwendeten Konzentrationen von Umckaloabo waren relativ hoch gewählt. *In-vivo* werden Konzentrationen in dieser Höhe nicht systemisch, sondern nur allenfalls lokal im Bereich des Mucosa-assoziierten lymphatischen Systems (MALT) von Mund, Rachen und Verdauungstrakt erreicht. Dies könnte den bisherigen begrenzten Einsatzbereich des Medikamentes erklären. Wünschenswert wäre deswegen eine klarere Zuordnung der immunologischen Effekte zu bestimmten Komponenten des Extraktes, wodurch breitere Einsatzmöglichkeiten denkbar würden. Diese Arbeit liefert somit einen weiteren Baustein in den Bemühungen, den bisher nur empirisch belegten immunstimulierenden Einsatz von Umckaloabo wissenschaftlich zu belegen, macht aber auch weiteren Forschungsbedarf deutlich, insbesondere prospektive Studien unter Einnahme von Umckaloabo.

LITERATURVERZEICHNIS

- Agbabiaka, T.B., Guo, R., Ernst, E. (2008)
Pelargonium sidoides for acute bronchitis: a systematic review and meta-analysis.
Phytomedicine, 15(5), 378-85
- Barth, H., Klein, K., Börtlein, A., Guseo, A., Berg, P.A., Wiethölter, H., Klein, R. (2002)
Analysis of immunoregulatory T-helper cell subsets in patients with multiple sclerosis: relapsing-progressive course correlates with enhanced T_{H1}, relapsing-remitting course with enhanced T_{H0} reactivity.
Journal of Neuroimmunology, 133, 175-183
- Barth, H., Berg, P.A., Klein, R. (2003)
Methods for the in vitro determination of an individual disposition towards T_{H1}- or T_{H2}-reactivity by the application of appropriate stimulatory antigens.
Clin. Exp. Immunol., 134, 78-85
- Beil, W., Kilian, P. (2007)
Eps®7630, an extract from *Pelargonium sidoides* roots inhibits adherence of *Helicobacter pylori* to gastric cells
Phytomedicine, 14, supplement VI, 5-8
- Berg, P.A., Becker, W., Holzschuh, J., Brattig, N., Daniel, P.T. (1988)
Lymphozyten-Transformations-Test für die Diagnose der medikamentösen Allergie.
Deutsches Ärzteblatt – Ärztliche Mitteilungen, 42, 2917-2922
- Borges, O., Borchard, G., de Sousa, A., Junginger, H.E., Cordeiro-da-silva, A. (2007)
Induction of lymphocytes activated marker CD69 following exposure to chitosan and alginate biopolymers.
Int. J. Pharm., 337, 254-264
- Chang, E.Y., Guo, B., Doyle, S.E., Cheng, G. (2007)
Cutting edge: involvement of the type I IFN production and signaling pathway in lipopolysaccharide-induced IL-10 production.
J. Immunol. 178(11), 6705-9.
- Conrad, A., Hansmann, C., Engels, I., Daschner, F.D., Frank, U (2007)
Extract of *Pelargonium sidoides* (Eps®7630) improves phagocytosis, oxidative burst, and intracellular killing of human peripheral blood phagocyte in vitro
Phytomedicine, 14, supplement VI, 46-51

Conrad, A., Jung, I., Tioua, D., Lallemand, C., Carrapatoso, F., Engels, I., Daschner, F.D., Frank, U. (2007)

Extract of *Pelargonium sidoides* (Eps®7630) inhibits the interactions of group A-streptococci and host epithelia in vitro

Phytomedicine, 14, supplement VI, 52-59

Gödecke, T. (2005)

Phytochemische und pharmakologische Untersuchungen an *Pelargonium sidoides* DC

Dissertation, Freie Universität Berlin

Helmstädter, A. (1996)

Umckaloabo – Late vindication of a secret remedy

Pharmaceutical Historian, 26, 2-4

Hori, S., Nomure, T., Sakaguchi, S. (2003)

Control of regulatory T cell development by the transcription factor Foxp3.

Science, 299, 1057-1061

Kayser, O. (1997)

Phenolische Inhaltsstoffe von *Pelargonium sidoides* DC. und Untersuchungen zur Wirksamkeit der Umcka-Droge (*Pelargonium sidoides* DC. und *Pelargonium reniforme* CURT.)

Dissertation, Institut für Pharmazie, Freie Universität Berlin

Kayser, O., Kolodziej, H. (1997)

Antibacterial activity of extracts and constituents of *Pelargonium sidoides* und *Pelargonium reniforme*

Planta medica, 63, 508-510

Koch, E., Biber, A. (2007)

Treatment of rats with the *Pelargonium sidoides* extract Eps®7630 has no effect on blood coagulation parameters or on the pharmacokinetics of warfarin

Phytomedicine, 10, supplement IV, 40-45

Kolodziej, H. (2002)

Pelargonium reniforme and *Pelargonium sidoides*: their botany, chemistry and medicinal use

Geranium and Pelargonium, Taylor and Francis, London, New York, 262-290

Kolodziej, H. (2007)

Fascinating metabolic pools of *Pelargonium sidoides* and *Pelargonium reniforme*, traditional and phytomedicinal sources of the herbal medicine Umckaloabo®

Phytomedicine, 14, supplement VI, 9-17

- Kolodziej, H., Kayser, O. (1998)
 Neueste Erkenntnisse zum Verständnis des Phytotherapeutikums Umckaloabo®, Zeitschrift für Phytotherapie, 19, 141-151
- Kolodziej, H., Kayser, O., Kiderlen, A.F., Ito, H., Hatano, T., Yoshida, T., Foo, L.Y. (2001)
 Proanthocyanidins and related compounds: antileishmanial activity and modulatory effects on nitric oxide and tumor necrosis factor- α -release in murine macrophage-like cell line RAW 264.7
 Biol. Pharm. Bull., 24, 1016-1021
- Kolodziej, H., Kayser, O., Radtke, O.A., Kiderlen, A.F., Koch, E. (2003)
 Pharmacological profile of extracts of *Pelargonium sidoides* and their constituents.
 Phytomedicine, 10, supplement IV, 18-34
- Kolodziej, H., Schulz, V. (2003)
 Umckaloabo - von der traditionellen Anwendung zum modernen Phytopharmakon
 Deutsche Apotheker Zeitung 2003; 12, 1301-1312 (Sonderdruck)
- Kolodziej, H., Kiderlen, A.F. (2007)
 In vitro evaluation of antibacterial and immunomodulatory activities of *Pelargonium reniforme*, *Pelargonium sidoides* and the related herbal drug preparation Eps®7630
 Phytomedicine, 14, supplement VI, 18-26
- Kunisawa, J., Fukuyama S., Kiyono, H. (2005)
 Mucosa-associated lymphoid tissues in the aerodigestive tract: their shared and divergent traits and their importance to the orchestration of the mucosal immune system.
 Curr Mol Med., 6, 557-72
- Latté, K.P., Kayser, O., Tan, N., Kaloga, M., Kolodziej, H. (2000)
 Unusual coumarin patterns of *Pelargonium* species forming the origin of the traditional herbal medicine Umckaloabo
 Zeitschrift für Naturforschung, 55c, 528-533
- Latté, K.P., Kolodziej, H. (2004)
 Antioxidant properties of phenolic compounds from *Pelargonium reniforme*.
 J. Agric. Food Chem., 52, 4899-4902
- Matsunaga, K., Klein, T.W., Friedman H., Ymymoto, Y. (2001)
Legionella pneumophila replication in macrophages inhibited by selective immunomodulatory effects on cytokine formation by epigallocatechin gallate, a major form of tea catechins
 Infect. Immun., 69(6), 3947-3953

- Matthys, H., Eisebitt, R., Seith, B., Heger, M. (2003)
Efficacy and safety of an extract of *Pelargonium sidoides* (Eps®7630) in adults with acute bronchitis. A randomised, double-blind, placebo-controlled trial.
Phytomedicine, 10, supplement IV, 7-17
- Mehta, B.A., Maino, V.C. (1997)
Simultaneous detection of DNA synthesis and cytokine production in staphylococcal enterotoxin B activated CD4+ T lymphocytes by flow cytometry.
Journal of Immunological Methods, 208, 49-59
- Mocellin, S., Panelli, M.C., Wang, E., Nagorsen, D., Marincola, F.M. (2003)
The dual role of IL-10. Trends Immunol., 24, 36-38
- Mogensen, S.C., Virlizier, J.L. (1987)
The interferon-macrophage alliance
Interferon, 8, 55-84
- Mosmann, T.R., Coffmann, R.L. (1989)
TH1 and TH2 cells: different patterns of lymphokine secretion lead to different functional properties.
Ann. Rev. Immunol., 7, 145-173
- Mosmann, T.R., Sad, S. (1996)
The expanding universe of t-cell subsets: Th1, Th2 and more.
Immunol. Today, 17, 138-146
- Saban, M.R., O'Donnell, M.A., Hurst, R.E., Wu, X.R., Simpson, C., Davis, C., Saban, R. (2008)
Molecular networks discriminating mouse bladder responses to intravesical bacillus Calmette-Guerin (BCG), LPS, and TNF-alpha
BMC Immunol., 9,4.
- Seidel, V., Taylor, P.W. (2004)
In vitro activity of extracts and constituents of *Pelargonium* against rapidly growing mycobacteria
International journal of antimicrobial agents, 23(6), 613-619
- Targoni, O.S., Tary-Lehmann, M., Lehmann, P.V. (1999)
Prevention of murine EAE by oral hydrolytic enzyme treatment.
J. Immunol., 12, 191-198
- Timmer, A., Günther, J., Rücker, G., Motschall, E., Antes, G., Kern, W.V. (2008)
Pelargonium sidoides extract for acute respiratory tract infections.
Cochrane Database Syst Review, 16(3), CD006323

- Trun, W., Kiderlen, A.F., Kolodziej, H. (2006)
Nitric oxide synthase and cytokines gene expression analyses in *Leishmania*-infected RAW 264.7 cells treated with an extract of *Pelargonium sidoides* (Eps®7630)
Phytomedicine, 13, 570- 575
- VanCott, J.L., Brim, T.A., Lunney, J.K., Saif.L.J. (1994)
Contribution of antibody-secreting cells induced in mucosal lymphoid tissues of pigs inoculated with respiratory or enteric strains of coronavirus to immunity against enteric coronavirus challenge.
J.Immunol. 152,(8), 3980-90
- Williams, C.A., Newman, M., Gibby, M. (2000)
The application of leaf phenolic evidence for systematic studies within the genus *Pelargonium* (*Geraniaceae*)
Biochemical Systematics and Ecology, 28, 119-132
- Yazawa, N., Fujimoto, N., Sato, S., Myake, K., Asano, N., Nagai, Y., Takeuchi, O., Takeda, K., Okochi, H., Akira, S., Tedder, T.F., Tamaki, K. (2003)
CD19 regulates innate immunity by the toll-like receptor RP105 signaling in B lymphocytes
Blood, 102, 1374-80
- Zhu, P., Li, X., Ding, J., Fan, C., Wang, Y., Wang, H., Chen, Z. (2004)
Simultaneous detection of DNA synthesis, activation and cytokine secretion in collagen II (250-270)-activated T lymphocytes by flow cytometry
Cell Biology International, 28, 765-772

Danksagung

Mein erster Dank gilt Frau Professor Dr. R. Klein für die Überlassung des Themas, die stets hilfreiche Beratung und die aufbauenden Besprechungen.

Zudem danke ich Sandra Buck und allen MTAs des immunpathologischen Labors für die gute Einarbeitung und Hilfe bei der Laborarbeit.

Überdies möchte ich mich bei Herrn Professor Dr. H.-G. Rammensee als Sprecher des Graduiertenkollegs „Zellbiologische Mechanismen immunassoziierter Prozesse“ für die Aufnahme als Stipendiat bedanken.

Bei Anne-Lotte, meinen Eltern und allen Freunden möchte ich mich für die Unterstützung während der Laborzeit bedanken, insbesondere auch den Bewohnern des Johann-Gottlieb-Fichte-Hauses, die sich bereitwillig als Probanden zur Verfügung gestellt haben.