

5 Zytokinbestimmung in Zellüberständen

Die durch IFN- γ + LPS oder Polyphenole hervorgerufene Immunmodulation führt über eine Signaltransduktionskaskade zur Produktion von Zytokinen, die aus der Zelle ins umgebende Medium sezerniert werden. Die Bestimmung solcher Zytokine im Überstand von stimulierten Zellen liefert also eine Information über das immunmodulatorische Potential einer Testsubstanz. Die Quantifizierung eines Zytokins kann einerseits als biologische Aktivität in der Dimension Einheiten pro Volumen (üblicherweise U/ml) angegeben werden; dabei verwendet man spezielle Zell-Linien, die bei Kontakt mit einem bestimmten Zytokin eine definierte, messbare Reaktion zeigen. Andererseits kann das Zytokin als Massenkonzentration (üblicherweise in pg/ml) bestimmt werden, was beispielsweise durch einen ELISA erfolgt. Reagiert ein Bio-Assay nur auf ein bestimmtes Zytokin in einer bestimmten Weise, gibt es für dieses Zytokin eine direkte Entsprechung von Konzentration und biologischer Aktivität (Friemel, 1991; Whiteside, 2002). In diesem Kapitel wurden RAW 264.7-Zellen nicht infiziert sowie infiziert mit sieben verschiedenen *Leishmania*-Spezies betrachtet. Die Produktion von TNF, IL-6 sowie IFN wurde in funktionellen Bioassays bestimmt. Parallel dazu wurde für IFN- α , IFN- γ sowie IL-12 eine Quantifizierung auf Proteinebene mit Hilfe von ELISA-Methoden vorgenommen.

5.1 Tumor-Nekrose-Faktor

TNF- α ist ein pleiotropes Zytokin, das bereits früh während einer Aktivierungskaskade in Erscheinung tritt und unter anderem die IL-1-Expression steuert. Die Expression dieser proinflammatorischen Zytokine ist charakteristisch für die Frühphase einer zellulären Immunreaktion (Thèze, 1999) und zur Einleitung der antileishmaniellen Abwehr von fundamentaler Bedeutung. Auf Zellen der murinen Fibroblastenlinie L929 (TNF-sensitiv) wirkt die gemeinsame Gabe von Actinomycin D und TNF jedoch als Apoptose-Signal. Da das Absterben einer so behandelten Kultur bei konstanter Actinomycin-D-Konzentration direkt von der TNF-Aktivität des Mediums abhängt, kann mit Hilfe einer Verdünnungsreihe des zu prüfenden Zellüberstands und einem konstanten Zelltiters die TNF-Aktivität eines Überstands bestimmt werden.

Ergebnisse

Tabelle 5.1: TNF-Aktivität [U/mL] von Zellüberständen nicht-infizierter und infizierter RAW 264.7-Zellen nach Behandlung mit den aufgeführten Polyphenolen

	RAW, nicht infiziert	RAW, infiziert mit <i>L. major</i>	RAW, infiziert mit <i>L. donovani</i>	RAW, infiziert mit <i>L. tropica</i>	RAW, infiziert mit <i>L. aethiopsica</i>	RAW, infiziert mit <i>L. killicki</i>	RAW, infiziert mit <i>L. amazonensis</i>	RAW, infiziert mit <i>L. guyanensis</i>
Einfache Phenole								
Gallussäure	4,6	16,2	21,7	18,4	12,3	13,5	28,9	32,5
3-Galloyl-shikimisäure	-	3,4	6,7	3,5	4,4	2,9	3,1	4,8
3,5-digalloyl-shikimisäure	3,5	53,9	44,0	39,7	42,6	61,4	70,3	65,7
Proanthocyanidin-hexamer	-	67,0	88,1	52,9	61,4	52,4	73,8	84,9
Catechin	-	5,5	2,6	-	-	6,3	-	5,4
Epigallocatechin-3-gallat	5,7	164,3	153,7	127,0	148,3	116,7	178,5	181,5
Galloylierte Flavonoidglykoside								
Kämpferol-3-O- β -glucopyranosid	-	204,8	235,3	215,7	226,8	209,3	270,2	287,4
Quercetin-3-O- β -glucopyranosid	-	72,4	89,1	77,5	58,3	61,7	67,6	52,7
Quercetin-3-O- β -galactopyranosid	-	29,4	31,5	17,2	24,6	22,8	36,2	45,5
Kämpferol-3-O-(2"-O-galloyl)- β -glucopyranosid	-	51,2	63,0	43,7	56,7	40,2	58,8	66,7
Quercetin-3-O-(2"-O-galloyl)- β -glucopyranosid	-	33,8	29,4	18,6	24,5	26,3	32,2	38,7
Quercetin-3-O-(2",3"-di-O-galloyl)- β -glucopyranosid	-	56,3	36,2	25,6	42,6	24,3	42,7	55,3
Kämpferol-3-O-(2",3"-di-O-galloyl)- β -glucopyranosid	-	9,1	12,8	7,6	13,9	12,7	11,1	15,7
B-Typ-Proanthocyanidine								
Epifisetinidol (4 β ,8)-catechin	-	48,7	53,6	44,9	56,7	46,8	61,2	57,6
Epifisetinidol (4 β ,8)-epicatechin	-	25,6	22,5	28,4	23,6	22,8	36,7	39,3
Epifisetinidol (4 β ,6)-catechin	-	21,7	26,2	22,8	26,1	24,9	29,4	27,6
Epifisetinidol (4 β ,6)-epicatechin	-	71,4	68,7	75,9	72,6	67,6	88,4	79,7
Epicatechin (4 α ,8)-catechin	-	66,8	76,3	65,9	63,7	71,4	79,6	77,5
Fisetinidol (4 α ,6)-catechin	-	68,5	72,7	73,9	69,4	75,6	81,7	86,3
Catechin (4 α ,8)-catechin	-	18,7	23,6	21,4	19,3	24,6	27,3	25,7
Depside								
Kaffeensäure	-	117,6	106,2	92,7	101,4	100,8	135,4	117,3
Rosmarinsäure	-	100,2	100,6	92,7	95,3	92,4	118,7	110,4
Salvianolsäure I	5,1	40,4	44,2	36,4	27,6	31,4	42,3	37,5
Salvianolsäure I – methylester	4,3	26,3	22,2	31,5	27,2	19,1	34,6	29,3
Salvianolsäure K	-	70,6	70,1	66,7	72,3	78,6	91,7	83,4
Salvianolsäure L	-	92,6	87,2	76,4	91,3	87,2	106,7	83,5
Sagerinsäure	-	36,4	35,3	29,8	34,5	31,4	38,6	31,3
Hydrolysierbare Gerbstoffe								
Tellimagrandin-I	4,4	11,4	21,3	16,8	12,7	24,3	9,7	15,1
Tellimagrandin-II	-	3,1	2,9	5,1	7,3	4,3	6,9	5,2
Phyllanthusiin-B	2,6	241,7	213,6	191,7	216,9	188,4	277,3	256,5
Phyllanthusiin-C	8,4	256,6	279,3	281,6	242,5	222,3	290,1	303,3
Geraniin	6,3	316,2	331,7	327,0	294,7	265,8	345,2	329,8
Ascorgeraniin	5,8	252,7	271,9	248,3	227,6	241,7	286,4	296,1
Corilagin	5,2	266,4	221,7	234,6	233,9	251,8	276,4	284,6
Castalagin	-	64,2	56,9	72,7	48,6	52,9	61,5	54,3
Casuarinin	-	293,1	274,7	288,1	269,7	267,3	331,6	317,0
Elaeagnatin-A	3,8	261,6	274,0	265,0	259,3	248,7	295,4	281,7
Kontrolle: IFN-γ + LPS	121,4	204,3	211,6	192,7	187,3	199,6	210,6	215,7

Nicht infizierte Zellen produzierten bei Behandlung mit Polyphenolen keine oder zu vernachlässigende Mengen an TNF. Innerhalb der Serie der einfachen Derivate zeigte sich einerseits Gallussäure als mittelmäßig potenter TNF-Induktor mit 4,6 U/ mL in nicht infizierten RAW-Zellen und ca. 15 U/mL TNF in infizierten Zellen. Zusätzliche Galloylgruppen in einem Molekül führten zu einer Steigerung der TNF-Aktivität: So induzierte 3,5-Digalloylshikimisäure die fünf- bis zehnfache Aktivität an TNF wie das Monogalloylderivat, das diesbezüglich wiederum schwächer war als Gallussäure selbst. Entsprechend dürfte die stärkere TNF-Induktion durch EGCG gegenüber dem sehr schwachen Catechin zu werten sein (Kolodziej et al., 1999), das auch nur bei vier der sieben zur Infektion verwendeten *Leishmania*-Spezies überhaupt messbare Aktivitäten zeigte. EGCG unterscheidet sich von Catechin unter anderem durch Galloylierung an Position 3 des Flavanolgerüsts.

Die getesteten O-Galloylflavonoide zeigten sich in unterschiedlicher Größenordnung als potente TNF-Induktoren. Keine dieser Substanzen führte in nicht infizierten Zellen zur Aktivierung, infizierte Zellen wurden jedoch zu moderaten bis sehr starken TNF-Produktionen angeregt. Besonders potent war Kämpferol-3- β -glucopyranosid, das in Leishmanien-infizierten RAW 264.7-Zellen zu TNF-Aktivitäten von über 200 U/mL führte und damit sogar potenter war als IFN- γ +LPS. Galloylierung der Zuckerkomponente setzte in der Reihe der Kämpferolderivate allerdings die Induktion von TNF dramatisch herab. Für die entsprechenden Quercetinanaloga ergab sich diesbezüglich keine klare Beziehung. Eine Erhöhung des Molekulargewichts schien zumindest allein kein förderlicher Faktor für die TNF-Induktion zu sein (Ercil et al., 2005).

Das gilt noch stärker für die Labiatengerbstoffe, deren potenteste Vertreter Kaffeesäure und ihr Dimer Rosmarinsäure waren (100-120 U/mL). Über die immunmodulierende Wirkung von Kaffeesäure ist über die Sekretion von TNF- α hinaus noch die von NO und H₂O₂ gesichert (Oršolić et al., 2004). Die trimeren Savianolsäuren waren noch moderat TNF-induzierend, wogegen die tetramere Sagerinsäure mit etwa 30 U/mL am schwächsten ausfiel (Radtke et al., 2003). Möglicherweise ist dabei nicht die Molekülgröße an sich entscheidend, sondern die Art und Weise der Kondensation, die Einfluss auf die Zugänglichkeit funktioneller Gruppen nimmt. Auffällig ist, dass die Veresterung einer einzigen freien Carboxylgruppe die TNF-Induktion der Salvianolsäure I in etwa halbierte.

Innerhalb der Proanthocyanidine vom B-Typ lag die Potenz zur TNF-Induktion in RAW 264.7-Zellen nach Infektion mit den genannten Leishmanien-Spezies tendentiell wie in *Leishmania donovani*-infizierten Knochenmark-Makrophagen (Kiderlen et al., 2001). Die (4 β -8)-Derivate mit gemischter Stereochemie (Epicatechin-4 β ,8-catechin und Epifisetinidol-4 β ,8-catechin) fielen durch stärkere TNF-Induktion auf als z. B. das reine 2,3-*cis*-Derivat Epifisetinidol-4 β ,8-epicatechin (23-40 U/ mL). Das 2,3-*trans*-Derivat Catechin-4 α ,8-catechin (19-28 U/mL) lag im selben Bereich, wobei über den Einfluss der α - gegenüber der β -Konfiguration keine Aussage möglich ist. Bei den Derivaten mit 4,6-Bindung erscheint der genannte Einfluss umgekehrt zu sein: Wiederum unabhängig von α - oder β -Stellung waren Epifisetinidol-4 β ,6-Epicatechin und Fisetinidol-4 α ,6-catechin 2-3 fach mehr potent gegenüber Epifisetinidol-4 β ,6-catechin. Obwohl im allgemeinen eine Erhöhung des Kondensationsgrads nicht förderlich für die TNF-Induktion angesehen wird, sei darauf hingewiesen, dass, verlässt man die Procyanidin-Reihe, das Monomer Catechin nahezu wirkungslos war, das Proanthocyanidin-Hexamer in infizierten Zellen aber zu den sehr starken TNF-Induktoren zählte.

Besonders potente TNF-Induktoren fanden sich unter den hydrolysierbaren Gerbstoffen (Kolodziej et al., 2001). Auch für diese Gruppe an Polyphenolen trifft zu, dass die Wirkung auf nicht infizierte Zellen sehr gering ist. Der Überstand von infizierten RAW-Zellen wies nach Stimulation mit den getesteten Dehydroellagitanninen Geraniin, Ascorgeraniin, Phyllanthusiine B und C und Corilagin TNF-Aktivitäten von über 200 U/mL auf. Sie erreichten oder überboten damit das Potential von IFN- γ +LPS. Da Corilagin und Geraniin in zahlreichen Testmodellen nahezu gleich wirken und unter physiologischen Bedingungen Corilagin aus Geraniin hydrolytisch freigesetzt werden kann (Okabe et al. 2001), ist als wirksames Prinzip bei den genannten Verbindungen Corilagin anzusehen. Berücksichtigt man ferner, dass beide Verbindungen ebenso wie Ascorgeraniin, die Phyllanthusiine B und C, Casuarinin und Elaeagnatin A über eine an einen $^1\text{C}_4$ -Glucose-Kern gebundene 3,6-verbrückende Hexahydroxy-Diphenylgruppe (HHDP) verfügen und diese Substanzen ebenfalls besonders starke TNF-Induktoren sind, muss gerade diesem Strukturmerkmal eine große Bedeutung beigemessen werden (Kolodziej et al., 2001).

Infektionen mit verschiedenen *Leishmania*-Spezies lieferten im großen und ganzen ähnliche TNF-Werte. Unterschiede zwischen den Effekten auf *Leishmania donovani* als Erreger einer viszeralen Leishmaniose und auf die Erreger kutaner Leishmaniosen wie *L. tropica*, *L. aethiopica* oder *L. killicki* waren in den vorliegenden Zellkulturversuchen nicht auszumachen. Auffällig ist aber, dass am ehesten bei Infektion mit den südamerikanischen Vertretern *L. amazonensis* und *L. guyanensis* in RAW-Zellen die Neigung zu einer höheren TNF-Induktion bestand. Das ist insofern bemerkenswert, als dass bei diesen zum *L. braziliensis*-Komplex zählenden Spezies eine kutane Verlaufsform zur mukokutanen Leishmaniose entarten kann, an deren Pathogenese eine TNF-Überproduktion beteiligt ist (Lessa et al., 2001; Amato et al., 2003).

5.2 Interleukin-6

IL-6 ist ein pleiotropes Zytokin, dessen Produktion stark von IL-1 abhängt und somit letztendlich durch TNF- α induziert wird. Die B-Zell-Hybridomlinie B9 ist strikt IL-6-abhängig und proliferiert desto besser, je mehr an diesem Zytokin zur Verfügung steht und kann daher zu dessen Bestimmung herangezogen werden (Aarden et al., 1987; Helle et al., 1988; Whiteside, 2002).

Zunächst fielen Substanzen als starke Induzenten von IL-6 auf, die auch starke TNF-Induktoren sind. Auch tendenziell sind anderweitig Übereinstimmungen festzustellen. Zum Beispiel produzierten infizierte RAW 264.7-Zellen nach Behandlung mit 3,5-Digalloylshikimisäure mehr IL-6 als mit Gallussäure oder mit 3-Galloylshikimisäure. Auch führte Catechin zu keiner nennenswerten IL-6-Produktion, wogegen EGCG und das Proanthocyanidin-Hexamer mit 30-40 U/mL bereits stärker aktivierten als IFN- γ +LPS. Aus der Serie der galloylierten Flavonoidglykoside führte nur der besonders potente TNF-Induktor Kämpferol-3-O- β -glucopyranosid zu einer relativ hohen IL-6-Produktion von über 30 U/mL. Die Betrachtung anderer Substanzen liefert hingegen konträre Ergebnisse. So induzierten Epifisetinidol-4 β ,6-catechin, Salvianolsäure I oder Tellimagrandin I wenig TNF, im Vergleich zu strukturverwandten Verbindungen mit ähnlichem TNF-Induktionspotential aber viel IL-6. Umgekehrt wären gemessen an der TNF-Induktion von EGCG, Quercetin-3-O- β -glucopyranosid und Kaffeesäure höhere IL-6-Aktivitäten zu erwarten gewesen.

Ergebnisse

Tabelle 5.2: IL-6-Aktivität [U/mL] von Zellüberständen nicht-infizierter und infizierter RAW 264.7-Zellen nach Behandlung mit den aufgeführten Polyphenolen

	RAW, nicht infiziert	RAW, infiziert mit <i>L. major</i>	RAW, infiziert mit <i>L. donovani</i>	RAW, infiziert mit <i>L. tropica</i>	RAW, infiziert mit <i>L. aethiopica</i>	RAW, infiziert mit <i>L. killicki</i>	RAW, infiziert mit <i>L. amazonensis</i>	RAW, infiziert mit <i>L. guyanensis</i>
Einfache Phenole								
Gallussäure	-	5,4	3,9	6,3	3,1	5,9	7,2	8,5
3-Galloyl-shikimisäure	-	5,1	4,3	4,4	6,2	3,8	5,1	4,7
3,5-digalloyl-shikimisäure	-	27,5	42,4	31,6	39,5	26,3	47,7	42,8
Proanthocyanidin-hexamer	-	31,6	28,9	34,8	34,7	27,9	52,3	58,6
Catechin	-	-	-	-	-	-	-	-
Epigallocatechin-3-gallat	-	42,7	32,6	29,7	33,8	25,9	68,7	55,3
Galloylierte Flavonoidglykoside								
Kämpferol-3-O- β -glucopyranosid		32,7	25,6	17,9	23,7	24,6	35,4	30,7
Quercetin-3-O- β -glucopyranosid		6,9	6,4	5,8	7,3	6,8	6,5	6,1
Quercetin-3-O- β -galactopyranosid		6,1	6,8	7,3	5,8	5,9	7,5	6,6
Kämpferol-3-O-(2"-O-galloyl)- β -glucopyranosid		3,7	3,2	4,6	3,1	3,7	4,2	2,9
Quercetin-3-O-(2"-O-galloyl)- β -glucopyranosid		6,4	5,9	4,6	5,4	6,9	7,3	6,8
Quercetin-3-O-(2",3"-di-O-galloyl)- β -glucopyranosid		2,7	3,4	5,9	3,8	6,2	4,7	3,5
Kämpferol-3-O-(2",3"-di-O-galloyl)- β -glucopyranosid		2,6	3,9	5,2	2,7	3,6	5,9	3,1
B-Typ-Proanthocyanidine								
Epifisetinidol-4 β ,8-catechin	-	38,7	31,6	41,2	37,5	40,1	53,3	46,4
Epifisetinidol-4 β ,8-epicatechin	-	22,3	15,6	24,8	17,1	14,3	25,4	20,7
Epifisetinido 1-4 β ,6-catechin	6,7	44,3	53,7	50,4	46,7	42,3	57,6	59,3
Epifisetinidol-4 β ,6-epicatechin	3,8	63,7	59,4	64,6	56,5	62,9	66,4	69,1
Epicatechin-4 α ,8-catechin	-	10,3	13,4	7,2	11,6	9,4	16,3	14,6
Fisetinido 1-4 α ,6-catechin	4,2	54,9	48,7	52,2	55,6	46,7	63,7	56,4
Catechin-4 α ,8-catechin	-	15,2	20,4	12,7	14,8	16,3	17,7	23,5
Depside								
Kaffeensäure	2,3	19,7	24,6	15,8	11,6	18,6	27,8	22,3
Rosmarinsäure	1,8	14,1	10,4	8,9	7,6	11,9	13,6	10,4
Salvianolsäure I	-	35,2	38,7	31,6	34,5	41,3	44,4	36,4
Salvianolsäure I – methylester	-	8,6	6,4	9,5	6,7	4,3	6,4	5,2
Salvianolsäure K	-	18,4	27,3	12,6	20,2	22,2	21,9	17,3
Salvianolsäure L	5,8	34,7	35,3	28,6	28,3	34,6	37,8	32,3
Sagerinsäure	4,2	4,8	4,3	5,7	5,2	4,9	4,2	3,6
Hydrolysierbare Gerbstoffe								
Tellimagrandin-I	-	14,5	26,4	22,7	11,8	14,3	35,8	31,7
Tellimagrandin-II	-	22,5	31,8	18,2	26,3	17,3	46,7	52,3
Phyllanthusiin-B	-	63,6	59,4	43,6	56,7	48,3	81,5	74,3
Phyllanthusiin-C	-	94,2	101,5	86,7	95,3	88,5	111,6	105,3
Geraniin	-	118,4	99,2	94,3	103,7	116,4	125,6	137,9
Ascorgeraniin	-	62,3	78,9	74,2	65,7	77,9	61,2	64,8
Corilagin	-	71,7	88,2	73,6	83,3	74,7	86,2	91,6
Castalagin	-	33,3	36,9	29,8	37,7	32,3	35,6	21,4
Casuarinin	-	91,5	112,3	89,7	96,2	104,6	99,5	108,2
Elaeagnatin-A	-	77,3	61,4	76,4	68,3	64,4	82,7	85,9
Kontrolle: IFN-γ + LPS	8,7	13,5	14,1	11,3	13,8	16,3	17,8	12,2

Unter den B-Typ-Proanthocyanidinen war Epifisetinidol-4 β ,8-catechin ein starker TNF-Induktor, der auch eine relativ hohe IL-6-Aktivität induzierte. Die Behandlung mit Epifisetinidol-4 β ,8-epicatechin und Catechin-4 α ,8-catechin induzierte nur eine geringe Aktivität sowohl von TNF als auch IL-6. Dagegen wies der Überstand von Zellen nach Behandlung mit dem starken TNF-Induktor Epicatechin-4 α ,8-catechin von allen Testsubstanzen in dieser Serie am wenigsten IL-6 auf. Bei Behandlung mit Epifisetinidol-4 β ,6-catechin wurde wenig TNF induziert, dennoch war die IL-6-Aktivität hoch. Auffällig war in diesem Fall die 4,6-Bindung, ein Strukturmerkmal, das offenbar die Induktion beider Zytokine förderte. Dazu passt, dass Epifisetinidol-4 β ,6-epicatechin die höchste Aktivität sowohl von TNF als auch von IL-6 lieferte. Dass eine 4,6-Verknüpfung für die IL-6-Induktion eine größere Bedeutung hat als für TNF, wird durch Epifisetinidol-4 β ,6-catechin belegt: dieses induzierte nur in geringem Maße TNF, aber relativ viel IL-6. Ob sich eine α - gegenüber einer β -Stellung grundsätzlich negativ auf die IL-6-Aktivität auswirkt, ist schwer zu beurteilen.

In der Tat besaßen die Überstände von Zellen nach Behandlung mit den beiden 4 α ,8-Derivaten auch die schwächsten IL-6-Aktivitäten (wobei je ein Derivat ein guter und ein schlechter TNF-Induktor war); beim einzigen 4 α ,6-Derivat, einem starken TNF-Induktor, übte dann jedenfalls die förderliche 4-6-Verknüpfung einen stärkeren (überkompensierenden) Einfluss aus.

Auch bei den Depsiden korrelierte die IL-6-Induktion bei einigen Vertretern mit der von TNF, bei einigen wiederum nicht. So ließen sich in den Überständen von Zellen, die mit Kaffeesäure oder Salvianolsäure L stimuliert wurden, hohe TNF- und IL-6-Aktivitäten nachweisen, wogegen Salvianolsäure I, dessen Methylester und Sagerinsäure Makrophagen offenbar in geringerem Maße zur Produktion beider proinflammatorischer Zytokine aktivierten. Nach diesen Überlegungen erscheint die IL-6-Induktion durch Behandlung mit Rosmarinsäure und Salvianolsäure K gering. Im Gegensatz zu den B-Typ-Proanthocyanidinen induzierte offenbar kein schwacher TNF-Aktivator größere Mengen an IL-6.

Die hydrolysierbaren Gerbstoffe sind offenbar diejenigen Polyphenole mit der stärksten TNF/IL-6-Korrelation. So wies der Überstand von Zellen nach Behandlung mit den Dehydroellagitanninen Phyllanthusiin B und C, Geraniin, Ascorgeraniin und Corilagin sehr hohe IL-6-Aktivitäten auf.

Die bei der TNF-Induktion recht schwachen Ellagitannine Tellimagrandin I und II induzierten entsprechend wenig IL-6. Uneinheitlich stellten sich die C-glucosidischen Ellagitannine insofern dar, als dass mit Casuarinin und Elaeagnatin A starke Induktoren und mit Castalagin ein schwacher Induktor vertreten waren. Auch hier korrelierte aber IL-6 mit TNF.

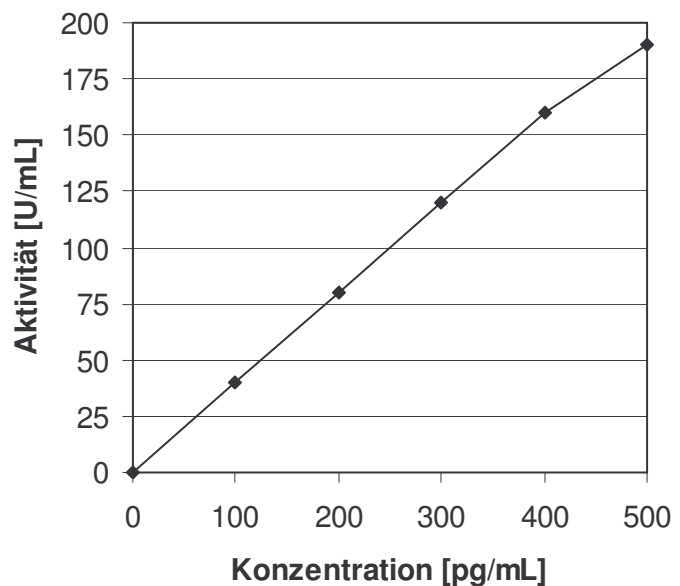
Angesichts des bekannten Induktionsmechanismus von IL-6 in Makrophagen erscheint die häufige TNF/IL-6-Korrelation plausibel: TNF- α induziert sich selbst, IL-1 und IL-6; IL-1 induziert sich selbst, TNF- α und IL-6 (Titus et al., 1991). Bei einer direkten Korrelation von TNF- und IL-6-Aktivität kann die IL-6-Produktion von den beiden anderen proinflammatorischen Zytokinen ausgelöst worden sein, auch unabhängig von der Natur des Stoffes. Allerdings weist das IL-6-Gen zahlreiche Regulatorsequenzen verschiedener Transduktionswege auf (Thèze, 1999), so dass ein Teil des nachweisbaren IL-6 möglicherweise nicht durch TNF induziert worden ist, sondern bestimmte Substanzen eventuell auch direkt IL-6 induzieren können. Diese unabhängige Induktion ist bei denjenigen Substanzen zu fordern, bei denen die IL-6-Induktion keine Entsprechung in der von TNF fand. Andererseits kann beispielsweise nicht entschieden werden, ob die HHDP-Gruppe der hydrolysierbaren Gerbstoffe ein direkt IL-6-induzierendes Strukturmerkmal ist, oder ob die damit zusammenhängende TNF-Aktivität allein für die Induktion von IL-6 verantwortlich ist.

In regulatorischer Hinsicht ist IL-6 ein interessanter Angelpunkt. Einerseits steht es in direkter Folge der übrigen proinflammatorischen Zytokine und wirkt mit diesen in vieler Hinsicht synerg. Auf die Induktionsfolge von TNF, IL-1 und IL-6 wurde schon hingewiesen. Andererseits wirkt IL-6 auf TNF- α überhaupt nicht und auf IL-1 inhibierend, so dass alles in allem dieses Zytokin als erste Beschränkung einer unkontrollierten inflammatorischen Aktion wirkt (Titus et al., 1991; Thèze, 1999). Bedenkt man weiterhin, dass IL-6 zwar das Produkt einer zellulären Immunantwort ist und die Wirkung anderer Zytokine dieser Kategorie unterstützt, andererseits aber auch ein B-Zell-Wachstumsfaktor ist, lässt sich dieses Zytokin als einziges in dieser Arbeit betrachtetes derart interpretieren, dass es den Weg nach Komponenten einer T_{H2}-Antwort öffnet, ohne die T_{H1}-Antwort abubrechen. IL-6 ist also in funktioneller Hinsicht aktivierend und in regulatorischer Hinsicht teilweise desaktivierend.

5.3 Interferon

Als Interferone wurden ursprünglich Signalstoffe definiert, die nach Infektion mit einem Virus gegenüber Zellen desselben Wirtsorganismus einen Virusschutz vermitteln. Dabei stellte sich die grundsätzliche Unterscheidung von Typ-I-Interferonen (IFN- α und IFN- β) und IFN- γ heraus. Als Sekretionsprodukt von Makrophagen hat IFN- α die größte Bedeutung. Um zu untersuchen, inwiefern bei Anwesenheit von Polyphenolen eine Zellpopulation IFN produziert und sezerniert hat, ist das EMC-Virus/L929(IFN)-System ein geeignetes Modell. Es beruht auf der interferoninduzierten Virusprotektion, diskriminiert aber nicht zwischen den verschiedenen Interferonen. Dazu wird jeder Überstand erst mit dem Virusschutzversuch auf IFN-Aktivität untersucht und dann mit einem jeweils spezifischen ELISA auf IFN- α oder IFN- γ genau charakterisiert. Prinzipiell können sich beide Methoden auch gegenseitig kontrollieren, da es eine direkte Entsprechung von IFN- α -Konzentration in [pg/ml] und IFN-Aktivität in [U/ml] gibt (Staehein et al., 1981), was sich in einem einleitenden Versuch bestätigt hat (Abb 5.1).

Abb. 5.1: Biologische Aktivität [U/ml] von IFN- α als Funktion seiner Konzentration [pg/ml]; L-929(IFN)-Zellen wurden mit r-mu IFN- α behandelt und der cytoprotektive Effekt im L929-EMCV-Test bestimmt; als Umrechnung für Konzentration in Aktivität und umgekehrt ergibt sich:
1 U/ml \approx 2,5 pg/ml
1 pg/ml \approx 0,4 U/ml



5.3.1 Bestimmung von Interferonaktivitäten im EMCV/L929(IFN)-System

Eine IFN-Aktivität wurde in infizierten Zellen in relativ geringem oder moderatem Maße durch Gallussäure (ca. 10 U/mL), EGCG (ca. 4 U/mL), Kaffeesäure (5-10 U/mL), Salvianolsäure K (ca. 3 U/mL) und galloylierte Flavonoidglykoside (4-50 U/mL) induziert (Kolodziej et al., 2001; Radtke et al., 2003; Ercil et al., 2005).

Besonders potente Interferon-Induktoren fanden sich unter den hydrolysierbaren Gerbstoffen. Nur unter diesen wurden selbst in nicht infizierten RAW-Zellen messbare Aktivitäten von ca. 10-20 U/mL induziert, wesentlich mehr jedoch auch bei ihnen im infizierten Zustand. Die höchsten Werte wurden von den Dehydroellagitanninen Geraniin, Phyllanthusiin B und Corilagin erreicht (je nach zur Infektion verwendete *Leishmania*-Spezies 55-70 U/mL). Ascorgeraniin und Phyllanthusiin C induzierten wie die Tellimagrandine I und II und die C-glucosidischen Ellagitannine Casuarinin, Castalagin und Elaeagnatin A immerhin noch moderat (10-30 U/mL). Damit erscheinen für die Aktivierung von IFN die gleichen Strukturmerkmale vorteilhaft zu sein wie für TNF und IL-6. Da diese Übereinstimmung auch für IFN-Induktoren aus anderen Stoffgruppen gilt, nicht aber umgekehrt jede starke TNF-Induktion mit der von Interferon korreliert, erscheint als Erklärung die Aktivierung von TNF durch Interferon am plausibelsten. Dass dies prinzipiell möglich ist, belegt allein schon die Eignung von Interferon zur Aktivierung von Makrophagen, die in einer Expression von TNF, anderen Zytokinen, NO-Produktion und Parasitenabwehr resultiert. Desweiteren sind die Signaltransduktionswege von Typ-I-Interferonen und IFN- γ miteinander vernetzt und können beide in die TNF-/IL-1/IL-6-Aktivierung eingreifen (Thèze, 1999). Die starke IFN-Induktion als Besonderheit der hydrolysierbaren Gerbstoffe im Vergleich zu anderen Polyphenolen könnte der Grund dafür sein, dass gerade diesen eine besondere Bedeutung als antivirale und tumorprotektive Wirkstoffe zugeschrieben wird.

Ergebnisse

Tabelle 5.3: IFN-Aktivität [U/mL] von Zellüberständen nicht-infizierter und infizierter RAW 264.7-Zellen nach Behandlung mit den aufgeführten Polyphenolen

	RAW, nicht infiziert	RAW, infiziert mit <i>L. major</i>	RAW, infiziert mit <i>L. donovani</i>	RAW, infiziert mit <i>L. tropica</i>	RAW, infiziert mit <i>L. aethiops</i>	RAW, infiziert mit <i>L. killicki</i>	RAW, infiziert mit <i>L. amazonensis</i>	RAW, infiziert mit <i>L. guyanensis</i>
Einfache Phenole								
Gallussäure	3,1	11,0	12,3	8,7	10,6	11,9	6,3	9,5
3-Galloyl-shikimisäure	-	-	-	-	-	-	-	-
3,5-digalloyl-shikimisäure	-	-	-	-	-	-	-	-
Proanthocyanidin-hexamer	2,6	6,5	5,8	3,9	5,2	4,1	7,2	5,5
Catechin	-	-	-	-	-	-	-	-
Epigallocatechin-3-gallat	-	4,5	2,7	5,3	3,8	3,6	4,2	2,8
Galloylierte Flavonoidglykoside								
Kämpferol-3-O- β -glucopyranosid	-	41,9	39,1	34,5	42,7	31,3	36,5	32,9
Quercetin-3-O- β -glucopyranosid	-	17,0	14,8	9,6	12,1	15,6	12,9	12,9
Quercetin-3-O- β -galactopyranosid	-	15,9	13,8	16,3	13,8	14,7	12,0	15,4
Kämpferol-3-O-(2"-O-galloyl)- β -glucopyranosid	-	12,0	12,9	9,5	7,3	10,6	11,2	8,3
Quercetin-3-O-(2"-O-galloyl)- β -glucopyranosid	-	34,0	25,7	37,3	26,3	25,9	29,6	33,8
Quercetin-3-O-(2",3"-di-O-galloyl)- β -glucopyranosid	-	26,1	11,4	15,2	13,7	27,1	21,2	25,6
Kämpferol-3-O-(2",3"-di-O-galloyl)- β -glucopyranosid	-	4,0	3,9	3,6	4,4	3,5	6,1	5,5
B-Typ-Proanthocyanidine								
Epifisetinidol-4 β ,8-catechin	-	-	-	-	-	-	-	-
Epifisetinidol-4 β ,8-epicatechin	-	-	-	-	-	-	-	-
Epifisetinidol-4 β ,6-catechin	-	-	-	-	-	-	-	-
Epifisetinidol-4 β ,6-epicatechin	-	-	-	-	-	-	-	-
Epicatechin-4 α ,8-catechin	-	-	-	-	-	-	-	-
Fisetinidol-4 α ,6-catechin	-	-	-	-	-	-	-	-
Catechin-4 α ,8-catechin	-	-	-	-	-	-	-	-
Depside								
Kaffeesäure	-	6,3	4,7	8,3	6,4	8,7	9,4	8,2
Rosmarinsäure	-	-	-	-	-	-	-	-
Salvianolsäure I	-	-	-	-	-	-	-	-
Salvianolsäure I – methylester	-	-	-	-	-	-	-	-
Salvianolsäure K	-	2,5	3,2	3,8	2,7	2,9	3,1	3,3
Salvianolsäure L	-	-	-	-	-	-	-	-
Sagerinsäure	-	-	-	-	-	-	-	-
Hydrolysierbare Gerbstoffe								
Tellimagrandin-I	5,5	54,3	43,9	44,4	56,8	41,2	49,6	56,3
Tellimagrandin-II	6,7	43,6	35,3	42,0	37,6	51,2	32,8	39,6
Phyllanthusiin-B	6,6	52,3	59,7	47,3	41,6	54,0	41,7	59,3
Phyllanthusiin-C	-	12,6	14,9	16,2	13,5	11,8	17,7	19,1
Geraniin	9,6	71,7	62,5	64,6	59,7	66,1	52,3	54,6
Ascorgeraniin	-	23,6	27,8	31,4	33,7	24,6	20,5	28,9
Corilagin	12,6	67,5	81,9	70,6	72,1	63,3	86,9	78,0
Castalagin	-	14,3	19,6	8,8	12,0	6,9	15,4	10,2
Casuarinin	8,1	22,7	31,4	22,7	28,2	34,7	29,5	32,4
Elaeagnatin-A	-	10,3	16,6	9,1	11,3	7,5	15,9	18,3
Kontrolle: LPS	22,4	49,7	52,3	39,6	44,2	43,1	38,6	41,7

5.3.2 Bestimmung der IFN- α -Konzentration durch ELISA

IFN- α ist dasjenige aller bekannten Interferone, das als Sekretionsprodukt von Zellen der Monozyten-Makrophagenreihe am ehesten zu erwarten ist (Thèze, 1999). Diese Erwartung bestätigt sich beim Vergleich der gemessenen Aktivitäts- bzw. Konzentrationswerte: Aliquots der selben Überstände, wie für den Virusschutzversuch verwendet, wurden in einem spezifischen ELISA auf IFN- α -Konzentration untersucht. Erwartungsgemäß fiel die Bestimmung für Überstände ohne Aktivität im Virusschutzversuch negativ aus. L929 (IFN-sensitiv)-Zellen reagieren zwar auf alle Interferone in gleicher Weise, werden jedoch nur durch sie vor der EMCV-bedingten Lyse geschützt (Whiteside, 2002). In allen Überständen mit messbarer IFN-Aktivität im EMCV/L929(IFN)-System ließ sich dagegen mittels ELISA IFN- α nachweisen. Zusätzlich korrelierten diese Werte sehr gut mit der in Staehelin et al. (1981) angegebenen Konzentrations-Aktivitäts-Beziehung (vgl. auch Abb. 5.1). Daraus ist zu folgern, dass die gesamte Interferon-Aktivität auf IFN- α zurückging. Aufgrund dieser Entsprechungen gelten für die induzierenden Substanzen auch die gleichen Struktur-Aktivitäts-Überlegungen. Als moderate IFN- α -Induktoren können somit neben Gallussäure (8,6 pg/mL in nicht infizierten RAW-Zellen, 16-28 pg/mL in infizierten Zellen) und EGCG (6-14 pg/mL in infizierten Zellen) die meisten galloylierten Flavonoidglykoside (10-80 pg/mL) gelten; Kämpferol-3-O- β -glucopyranosid (80-110 pg/mL) fiel wie bei den bisherigen Zytokinbestimmungen durch hohe immunmodulatorische Potenz auf. Corilagin, Geraniin und Phyllanthusiin B (14-22 pg/mL in nicht infizierten Zellen beziehungsweise 100-200 pg/mL in infizierten Zellen) belegten erneut ihre besondere immunstimulierende Aktivität. Dass die auch aus vorausgegangenen Arbeiten bekannte IFN-Induktion einiger Polyphenole im RAW-Leishmanien-System präzise dem IFN- α zugeordnet werden konnte, ist von Interesse, zumal nach mehreren Autoren Makrophagen durchaus als Produzenten von IFN- γ in Frage kommen (Gessani und Belardelli, 1998; Fantuzzi et al., 2000; Gigliotti-Rothfuchs et al., 2001).

Ergebnisse

Tabelle 5.4: IFN- α -Konzentration [pg/mL] von Zellüberständen nicht-infizierter und infizierter RAW264.7-Zellen nach Behandlung mit den aufgeführten Polyphenolen

	RAW, nicht infiziert	RAW, infiziert mit <i>L. major</i>	RAW, infiziert mit <i>L. donovani</i>	RAW, infiziert mit <i>L. tropica</i>	RAW, infiziert mit <i>L. aethiopica</i>	RAW, infiziert mit <i>L. killicki</i>	RAW, infiziert mit <i>L. amazonensis</i>	RAW, infiziert mit <i>L. guyanensis</i>
Einfache Phenole								
Gallussäure	8,6	24,9	27,8	21,6	27,5	28,2	16,6	24,9
3-Galloyl-shikimisäure	-	-	-	-	-	-	-	-
3,5-digalloyl-shikimisäure	-	-	-	-	-	-	-	-
Proanthocyanidin-hexamer	6,1	15,3	14,8	10,4	13,3	10,8	17,4	13,8
Catechin	-	-	-	-	-	-	-	-
Epigallocatechin-3-gallat	-	11,5	6,9	13,8	9,7	9,2	10,8	7,6
Galloylierte Flavonoidglykoside								
Kämpferol-3-O- β -glucopyranosid	-	104,9	96,6	86,7	108,9	82,7	91,2	96,6
Quercetin-3-O- β -glucopyranosid	-	44,5	42,6	27,6	30,7	36,9	33,1	33,8
Quercetin-3-O- β -galactopyranosid	-	37,9	32,8	38,7	32,2	35,0	30,1	36,7
Kämpferol-3-O-(2"-O-galloyl)- β -glucopyranosid	-	28,5	30,7	24,9	17,7	25,2	26,6	10,6
Quercetin-3-O-(2"-O-galloyl)- β -glucopyranosid	-	88,7	69,3	82,5	68,6	71,3	75,7	80,1
Quercetin-3-O-(2",3"-di-O-galloyl)- β -glucopyranosid	-	62,7	33,4	36,7	35,8	56,3	47,6	61,2
Kämpferol-3-O-(2",3"-di-O-galloyl)- β -glucopyranosid	-	10,6	10,3	9,7	11,7	9,1	15,8	12,4
B-Typ-Proanthocyanidine								
Epifisetinidol-4 β ,8-catechin	-	-	-	-	-	-	-	-
Epifisetinidol-4 β ,8-epicatechin	-	-	-	-	-	-	-	-
Epifisetinidol-4 β ,6-catechin	-	-	-	-	-	-	-	-
Epifisetinidol-4 β ,6-epicatechin	-	-	-	-	-	-	-	-
Epicatechin-4 α ,8-catechin	-	-	-	-	-	-	-	-
Fisetinidol-4 α ,6-catechin	-	-	-	-	-	-	-	-
Catechin-4 α ,8-catechin	-	-	-	-	-	-	-	-
Depside								
Kaffeensäure	-	12,6	11,0	15,3	15,7	19,3	22,3	19,6
Rosmarinsäure	-	-	-	-	-	-	-	-
Salvianolsäure i	-	-	-	-	-	-	-	-
Salvianolsäure k	-	6,8	8,7	10,1	7,3	7,7	8,0	8,6
Salvianolsäure l	-	-	-	-	-	-	-	-
Salvianolsäure k – methylester	-	-	-	-	-	-	-	-
Sagerinsäure	-	-	-	-	-	-	-	-
Hydrolysierbare Gerbstoffe								
Tellimagrandin-I	13,2	112,7	96,3	106,3	119,2	98,6	114,0	121,7
Tellimagrandin-II	15,8	82,4	77,6	100,5	90,1	112,7	85,6	93,4
Phyllanthusiin-B	14,5	107,2	114,8	113,3	99,6	115,2	99,8	126,3
Phyllanthusiin-C	-	22,1	24,5	37,6	32,3	29,1	38,5	37,8
Geraniin	20,1	166,3	154,8	161,5	155,4	174,8	136,2	142,3
Ascorgeraniin	-	51,4	60,0	77,3	65,8	53,7	55,6	68,9
Corilagin	21,7	151,9	174,7	169,2	172,6	151,6	198,7	193,7
Castalagin	-	20,9	24,6	23,1	28,6	18,2	39,2	26,7
Casuarinin	16,4	37,2	46,5	56,7	47,4	51,6	59,9	56,3
Elaeagnatin-A	-	25,8	32,9	23,9	26,8	19,8	39,7	47,8
Kontrolle: LPS	18,5	43,6	34,2	36,7	45,9	41,5	37,9	44,4

Zwar ist für die exogene Makrophagenaktivierung zur Kontrolle intrazellulärer Infektionserreger das IFN- γ von besonderer Bedeutung, speziell im Hinblick auf die Immunantwort im System, das NK-Zellen und später T-Lymphozyten einschließt; gerade zur Erklärung autoregulatorischer Vorgänge wird aber den Typ-I-Interferonen in den letzten Jahren eine wachsende Bedeutung beigemessen: So ist ein Teil der durch LPS oder TNF- α initiierten Reaktionen Typ-I-IFN-abhängig, das im Ablauf einer Aktivierung durch die genannten Stimulantien autogen induziert wird (Hertzog et al., 2003). LPS sowie einige andere exogene Signalstoffe sind beispielsweise nur deshalb in der Lage, trotz Abwesenheit von IFN- γ iNOS zu aktivieren, weil sie IFN- α induzieren können, das dann den zweiten Stimulus liefert (Vadiveloo et al., 2000). Für die Erklärung der Immunmodulation durch Pflanzeninhaltsstoffe könnte dies insofern interessant sein, als dass diese quasi als LPS-Mimetika wirken, was Jeon et al. (2000) für das Polysaccharid Angolan nachgewiesen haben.

Der bisherigen Fokussierung auf IFN- γ entsprechend, ist über Typ-I-Interferone im Zusammenhang mit der Immunabwehr gegen Leishmanien oder Mykobakterien wenig bekannt. Die Arbeiten von Gigliotti-Rothfuchs et al. (2001) über die Reaktionen in *Chlamydia trachomatis* – infizierten Makrophagen belegen aber die Sekretion von IFN- α , durch das die Wirtszelle autokrin stimuliert wird und eine für die Situation charakteristische zelluläre Abwehrreaktion einleitet. Die Aktivierung von NK-Zell-Funktionen, Regulation der Lymphozytenproliferation und Einleiten der Differenzierung von CD4-positiven T-Zellen in T_{H1}-Zellen soll durch Typ-I-Interferone ebenso effektiv erfolgen können wie durch IFN- γ .

5.3.3 Bestimmung der IFN- γ -Konzentration durch ELISA

Aliquots der selben Überstände, wie für den Virusschutzversuch verwendet, wurden in einem spezifischen ELISA auf IFN- γ -Konzentration untersucht. Allerdings war in keinem einzigen Überstand IFN- γ nachweisbar. Dieses Ergebnis war nach der Bestimmung des IFN- α und dem Vergleich mit den Aktivitäten im L929(IFN)/EMCV-Test zu erwarten, da schon rein mathematisch kein weiterer Signalstoff mit zytoprotektiver Wirkung mehr vorhanden sein konnte.

Die in vielen Fällen hohe IFN- α -Konzentration, wie beispielsweise durch die meisten hydrolysierbaren Gerbstoffe oder bestimmte galloylierte Flavonoidglykoside induziert, könnte sogar der Grund für das Ausbleiben einer IFN- γ -Produktion durch die aktivierten Zellen gewesen sein, da sich Typ-I-Interferone und IFN- γ offenbar gegenseitig regulieren können: Selbst in Situationen, in denen IFN- γ -Produktion durch Makrophagen nachweisbar ist, wie bei Co-Stimulation durch IL-12 und IL-18, fällt die IFN- γ -Produktion erheblich geringer aus, wenn IFN- α zugegen ist (Fantuzzi et al., 2000). Die Dominanz des Typ-I-Interferons bei der Aktivierung durch Polyphenole bildet eine entsprechende Situation.

5.3.4 Bestimmung von IL-12 durch ELISA

Im Gegensatz zu den sehr pleiotropen und im Zusammenhang mit nahezu allen Infektionsabläufen stehenden Zytokinen TNF- α , IL-1 oder IL-6 wird die Rolle des IL-12 diffiziler angesehen. Im Verlauf einer Infektion mit einem intrazellulären Erreger entscheidet die Sekretion dieses Zytokins über die Aktivierung von NK-Zellen in der Frühphase sowie im weiteren Verlauf über die Einleitung einer T_{H1}-gesteuerten Antwort, was die Bereitstellung von IFN- γ sicherstellt. Erst recht kommt dem eine Schlüsselfunktion zu, wenn es sich um einen infizierten Makrophagen handelt, der auf diese Weise seine eigene Aktivierung steuern kann.

Die Messung der Sekretion des biologisch aktiven Heterodimers IL-12p70 erfolgte durch einen spezifischen ELISA. Analog den bisherigen Zytokinbestimmungen wurden je 5×10^6 nicht infizierte und *Leishmania major* – bzw. *L. donovani* infizierte RAW-Zellen ausplattiert und nach 18stündiger Ruhephase mit den Testsubstanzen Gallussäure, 3-Galloylshikimisäure, 3,5-Digalloylshikimisäure, Proanthocyanidin-Hexamer, Catechin, EGCG und Corilagin an ihren IC₅₀ – Werten behandelt. Kontrollen mit IFN- γ +LPS sowie ohne Behandlung wurden ebenfalls angefertigt. Nach 24 h wurden die Überstände abgenommen und mittels eines ELISA die IL-12-Konzentration bestimmt. Für die Standardkurve wurde rekombinantes IL-12 in den Konzentrationen 1000 pg/mL geometrisch absteigend bis 15,6 pg/mL

eingesetzt. Die Konzentration an IL-12 in den Überständen konnten dementsprechend abgelesen werden (Abb. 5.2).

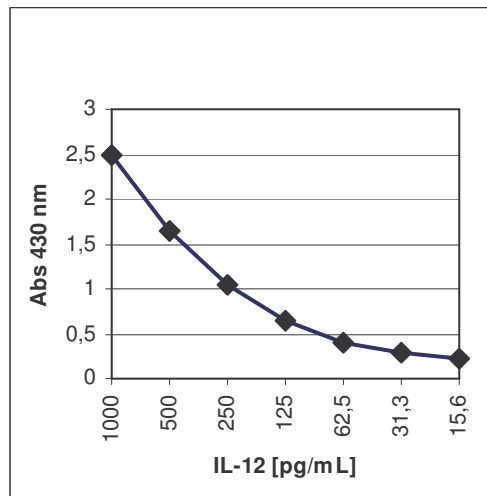


Abb. 5.2: IL-12-Standardkurve

Ohne Behandlung enthielt der Überstand nicht infizierter und *Leishmania major* oder *L. donovani* -infizierter Zellen kein IL-12. Dagegen führte die Behandlung mit IFN- γ +LPS zu einer sehr starken IL-12-Produktion, wobei der Infektionsstatus nur eine sehr geringe Rolle spielte (258,3 pg/mL für nicht infizierte Zellen, 336,2 bzw. 321,7 pg/mL für *L. major* beziehungsweise *L. donovani* infizierte Zellen) (Abb.5.3).

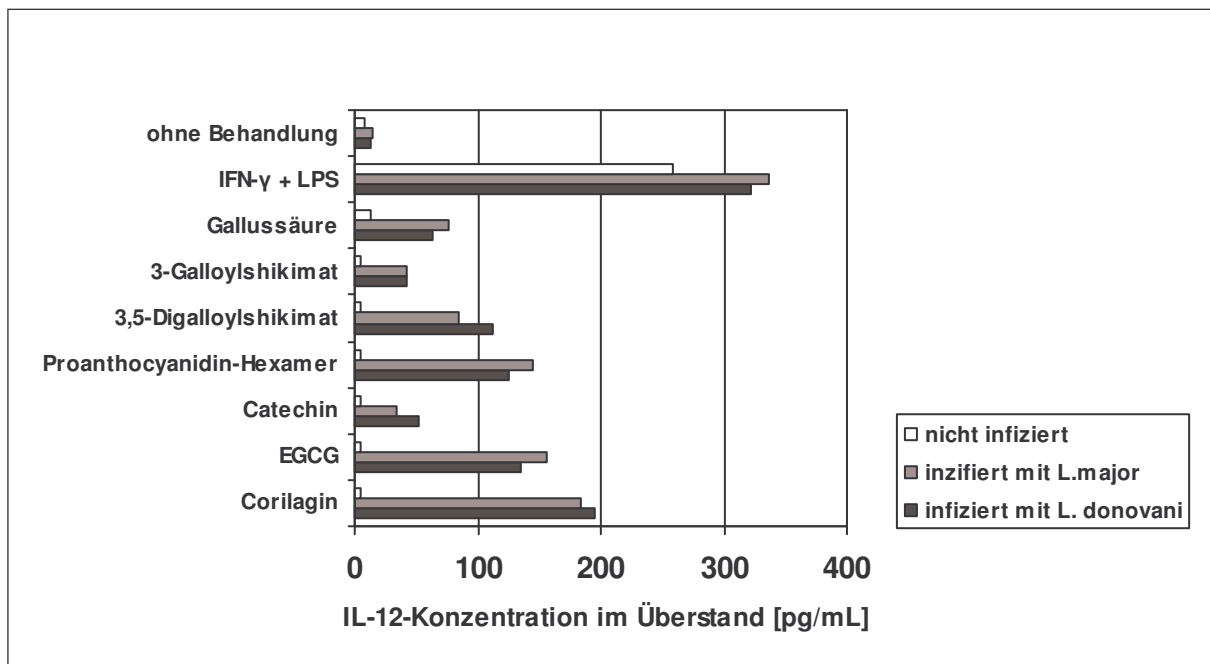


Abb. 5.3: Produktion von IL-12 in RAW 264.7-Zellen

Diese Ergebnisse entsprechen den Erwartungen: Einerseits reicht der Kontakt mit oder die Infektion durch Leishmanien im metazyklischen Stadium nicht zur IL-12-Induktion aus; vielmehr gehört es zur Strategie dieser Parasiten, die Produktion gerade dieses Zytokins zu unterbinden. Andererseits führt ein positives immunmodulatorisches Signal von außen zur Aktivierung der parasitierten Zelle, was zur Produktion von IL-12 führt. In der systemischen Immunantwort hätte dies die Aktivierung von NK-Zellen bzw. T_{H1} -Lymphozyten zur Folge gehabt (Piedrafita et al., 1999). Dies unterstreicht noch einmal dessen Schlüsselrolle in der Regulation der antileishmaniellen Abwehr (Bacellar et al., 2000; Noormohammadi et al., 2001).

Vergleicht man damit die Überstände der Polyphenol-behandelten RAW-Zellen, so bestätigt sich ein weiteres Mal die ausbleibende Wirkung auf nicht infizierte Zellen. Infizierte Zellen sind dagegen aktivierbar und können durch die Testsubstanzen zur Produktion von IL-12 angeregt werden, in keinem Fall wurden aber die Werte der Positivkontrolle erreicht. Und obwohl nicht das gesamte Spektrum an Testsubstanzen wie in den bisherigen Überstandsuntersuchungen geprüft wurde, bestätigen sich durchaus die Struktur-Wirkungs-Beziehungen aus 5.1 - 5.3 zur Induktion von TNF, IL-6 und Interferon. Als unter den Polyphenolen besonders potent zu nennen sind hier Corilagin, EGCG und das Proanthocyanidin-Hexamer, durch die infizierte Zellen immerhin halb- bis dreiviertel so stark zur Produktion von IL-12 angeregt werden wie durch IFN- γ + LPS. Den bisherigen Erwartungen entspricht auch die stärkere Aktivierung durch 3,5-Digalloyl-Shikimisäure gegenüber seinem Monogalloyl-Derivat sowie die sehr schwache Induktion durch Catechin. Die IL-12-Produktion nach Behandlung mit Gallussäure entspricht der von 3,5-Digalloylshikimisäure.