

## 7. Einfluss von Polyphenolen auf die NO-Sekretion in RAW-Zellen und antileishmanielle Aktivität

Bei der antileishmaniellen Infektabwehr kommt der NO-Produktion die entscheidende Rolle zu. Dementsprechend wird die antileishmanielle Potenz eines Immunmodulators nach der Fähigkeit beurteilt, in infizierten Zellen die Produktion von NO zu induzieren. Beispielhaft wurden 3-Galloylshikimisäure, 3,5-Digalloylshikimisäure, ein Proanthocyanidin-Hexamer, Catechin, EGCG und Corilagin auf die NO-Produktion von RAW 264.7-Zellen untersucht und diese der antileishmaniellen Aktivität gegenübergestellt. Dabei wurde sowohl eine Aktivierung mit IFN- $\gamma$ , LPS als auch IFN- $\gamma$  + LPS in die Betrachtung einbezogen. Eine entsprechende Abhandlung bezüglich Gallussäure findet sich separat in Kapitel 6.

Es wurden je einem Ansatz nicht infizierter und *L. major* bzw. *L. donovani* infizierter RAW-Zellen 100 U/ml r-mu-IFN- $\gamma$  oder 10 ng/ml LPS oder 100 U/mL IFN- $\gamma$  + 10 ng/ml LPS verabreicht sowie jede der Testsubstanzen in einer Konzentration von 10  $\mu$ M, 50  $\mu$ M und 100  $\mu$ M. Jeweils eine Kontrolle allein mit den Testsubstanzen in denselben Konzentrationen zeigte, dass diese allein nicht zur Produktion von durch den Griess-Test erfassbaren NO-Mengen führten.

Für nahezu alle Fälle gilt, dass die durch IFN- $\gamma$  hervorgerufene NO-Sekretion kaum oder gar nicht durch die getesteten Polyphenole beeinträchtigt wurden. Dagegen wurde die LPS-vermittelte NO-Sekretion durch 50-100  $\mu$ M der Testsubstanzen in den meisten Fällen deutlich inhibiert. 10  $\mu$ M zeigten sich in aller Regel nicht als wirksam (Abb. 7.1). Die Inhibition der NO-Sekretion fiel in nicht infizierten LPS-aktivierten RAW-Zellen stärker aus als in infizierten Zellen (Abb. 7.1 und 14.1). Infektionen mit *Leishmania major* und *L. donovani* lieferten vergleichbare Befunde (Abb. 14. 2 und 14.3). Die Aktivierung mit IFN- $\gamma$  + LPS führte zu einer höheren NO-Produktion als mit einer der Einzelkomponenten; auch führte eine Behandlung mit den phenolischen Testsubstanzen zu keiner oder nur zu einer vernachlässigbaren Inhibition der NO-Sekretion.

Die Interaktion von Gallussäure mit IFN- $\gamma$  und LPS wurde im vorigen Kapitel ausführlich diskutiert; Im Konzentrationsbereich von 10-100  $\mu\text{M}$  ließ sich in dieser Versuchsreihe keine Auswirkung auf die NO-Produktion bzw. auf RAW-Zell-Vitalität und antileishmanielle Wirkung feststellen.

Interessant erscheint der Vergleich der galloylierten Shikimisäuren. 3-Galloylshikimisäure inhibierte die NO-Produktion LPS-aktivierter und infizierter Zellen bei 50  $\mu\text{M}$  zu 50 % und bei 100  $\mu\text{M}$  vollständig (Abb.7.1); in nicht infizierten Zellen führten 10  $\mu\text{M}$  immerhin schon zu einer Verringerung um 25% (Abb. 14.1). Das 3,5-Digalloyl-Derivat übte dagegen offensichtlich im getesteten Konzentrationsbereich keinen Effekt auf die NO-Konzentration aus. Es sei daran erinnert, dass in infizierten Zellen ohne IFN- $\gamma$ - bzw. LPS-Vorbehandlung 3,5-Digalloylshikimisäure ein potenterer Aktivator in Bezug auf antileishmanielle Wirkung und TNF-Induktion war als 3-Galloylshikimisäure (vgl. Kapitel 5).

Corilagin inhibierte die NO-Sekretion in LPS-aktivierten Zellen bei 50  $\mu\text{M}$  auf die Hälfte und bei 100  $\mu\text{M}$  nahezu vollständig. Das korreliert mit anderen Arbeiten (Okabe, 2001) insofern, als dass in dessen Untersuchungen der  $\text{IC}_{50}$  für TNF- $\alpha$ -Inhibition bei 76  $\mu\text{M}$  liegt. Auch wurde, wenn auch in weitaus geringerer Ausprägung, die durch IFN- $\gamma$  bzw. die durch IFN- $\gamma$ +LPS eingeleitete NO-Produktion (Abb. 7.2) in infizierten sowie in nicht infizierten Zellen herabgesetzt.

Catechin und EGCG zeigten sich als recht starke Inhibitoren der von LPS hervorgerufenen NO-Produktion. Bei 10  $\mu\text{M}$  noch inaktiv, vermochte Catechin in nicht infizierten und infizierten Zellen bei 50  $\mu\text{M}$  die NO-Sekretion um 25 % und bei 100  $\mu\text{M}$  um 60 % zu inhibieren. EGCG war ein potenterer Inhibitor der LPS-vermittelten Makrophagenaktivierung: 50  $\mu\text{M}$  inhibierten die NO-Sekretion auf ein Drittel, 100  $\mu\text{M}$  nahezu vollständig. Verglichen mit anderen Substanzen fiel sogar der Einfluss auf die durch IFN- $\gamma$  hervorgerufene Induktion der NO-Produktion etwas stärker aus: 100  $\mu\text{M}$  EGCG inhibierten die NO-Sekretion zu 40 % (nicht infizierte Zellen, Abb. 14.1) und zu 30 % in infizierten Zellen (Abb. 7.1). Die durch IFN- $\gamma$  + LPS induzierte NO-Bildung wurde allerdings auch hier kaum gehemmt (Abb. 7.2). Innerhalb der immunpharmakologischen Arbeiten über Polyphenole ist die durch Catechingerbstoffe erfolgte Inhibition der LPS-vermittelten Makrophagenaktivierung besonders gut untersucht, allerdings nur für nicht infizierte Zellen. Je nach Versuchsbedingungen hemmen 5 - 200  $\mu\text{M}$

Catechin, EGCG oder analoge Verbindungen die NO-Synthese auf Ebene der iNOS mRNA und des iNOS-Proteins (Chan et al., 1997) und die TNF-Expression auf Transkriptionsebene (Yang et al., 1998) und Ebene der TNF- $\alpha$ -Sekretion (Okabe et al., 2001) sowie den gesamten zur NO- und TNF- $\alpha$  – Produktion führenden Aktivierungsprozess durch Hemmung der NF- $\kappa$ B-Kaskade (Lin und Lin, 1997). Dies erfolgt dadurch, dass die Freisetzung von NF- $\kappa$ B aus dem Komplex mit dem Inhibitorprotein I- $\kappa$ B durch die I- $\kappa$ B-Kinase (IKK- $\alpha/\beta$ ) infolge einer Enzymhemmung durch das Polyphenol gehemmt wird, was exemplarisch für Quercetin gezeigt wurde (Peet und Li, 1999). Eine solche pharmakologische Wirkung durch ein Polyphenol erfolgt in Konkurrenz zur Aktivierung und kann natürlich nur in solchen Zellen erfolgen, in denen der betreffende Signaltransduktionsweg unmittelbar angeschaltet ist. Es wird dadurch auch klar, dass die Aktivierung durch IL-1, TNF- $\alpha$  oder LPS sehr viel stärker inhibierbar ist als die durch IFN- $\gamma$ , welche primär über den Jak/STAT-Weg erfolgt und nur sekundär mit der NF- $\kappa$ B-Kaskade vernetzt ist (Carpenter et al., 1999; Takeda und Akira, 2001; Janeway et al., 2002; Hertzog et al., 2003). Manche Autoren schreiben jedoch einer „Scavenger“-Wirkung eine größere Bedeutung für die Verringerung der messbaren NO-Konzentration in Körperflüssigkeiten und Zellüberständen durch Polyphenole zu, so Wippel et al. (2004) anhand von analogen Untersuchungen mit Epicatechin. Zudem werden die häufig publizierten extrem niedrigen Konzentrationen für die iNOS-Inhibition ( $< 10 \mu\text{M}$ ) mittlerweile kritisch gesehen.

Besonders auffällig war aber in einem Fall auch die für ein Polyphenol kaum ausgeprägte Fähigkeit, die NO-Produktion einer LPS-aktivierten Zelle zu inhibieren: Selbst  $100 \mu\text{M}$  des Proanthocyanidin-Hexamers setzten offenbar die iNOS-Aktivität der nicht infizierten oder infizierten RAW-Zellen nicht herab. Vergleichbare Daten aus der Literatur sind hierzu nicht bekannt oder schwer zu interpretieren: Erwiesen desaktivierende Potenz im Makrophagenmodell üben z. B. 3-Desoxy-Anthocyanidine aus (Zorn et al., 2001), die ja durchweg von erheblich geringerer Molekularität sind. Von oligomeren Proanthocyanidinen sind bis dato nur immunstimulierende Wirkungen bekannt (Park et al., 2000; Zhang et al., 2005). Vergegenwärtigt man sich den für Catechin und EGCG diskutierten Mechanismus der Inhibition, der das Eindringen in die Zelle

voraussetzt, erscheint dieses Resultat plausibel, denn die erhebliche Größe des hexameren Proanthocyanidins erschwert die Membrangängigkeit; hinzu kommt, dass aufgrund der Hydroxylgruppen und Galloyl-Substituenten das Molekül noch recht hydrophil ist. Analog lassen sich die grundsätzlich für Flavonoide bekannten inhibitorischen Potenzen interpretieren (Abad et al., 2004; Cheon et al., 1999; Calixto et al., 2004), denenzufolge unpolare Vertreter die LPS-bedingte NO-Produktion stärker hemmen als polare; ebenso werden dadurch die auffälligen Unterschiede zwischen 3-Galloyl-Shikimisäure und der wesentlich größeren und hydrophileren 3,5-Digalloyl-Shikimisäure plausibel.

Den Befunden aus dem vorigen Kapitel entsprechend, war die Vitalität der Zellen durch einen hohen Aktivierungsgrad, gemessen an der NO-Produktion, teilweise beeinträchtigt (Abb. 14.1). Die Behandlung mit IFN- $\gamma$  oder LPS allein setzte den MTT- Umsatz auf 90 % herab, IFN- $\gamma$  + LPS behandelte Zellen waren auf etwa 70 % Vitalität herabgesetzt. Die Behandlung mit den Polyphenolen erhöhte die Vitalität substanz- und konzentrationsabhängig. Dieser Effekt korrelierte mit der Hemmung der NO-Sekretion. Verglichen mit den Ergebnissen aus dem Kombinationsversuch, in dem Gallussäure je nach Behandlungsart aktivierte oder inhibierte, lässt sich festhalten, dass allein die Hemmung der NO-Sekretion für diesen Effekt verantwortlich ist und dem Polyphenol keine Schutzfunktion an sich zukommt.

Der Einfluss auf die Leishmanienviabilität verhielt sich entsprechend: Die Abwehr der Infektion ist NO-abhängig. Die Leishmanien proliferieren nach Lyse der Wirtszelle desto stärker, je weniger NO produziert worden ist. Die getesteten Polyphenole haben auf die intrazellulären Parasiten, soweit aus diesem Versuch ersichtlich, weder eine direkt schädigende noch direkt schützende Wirkung.

## Ergebnisse

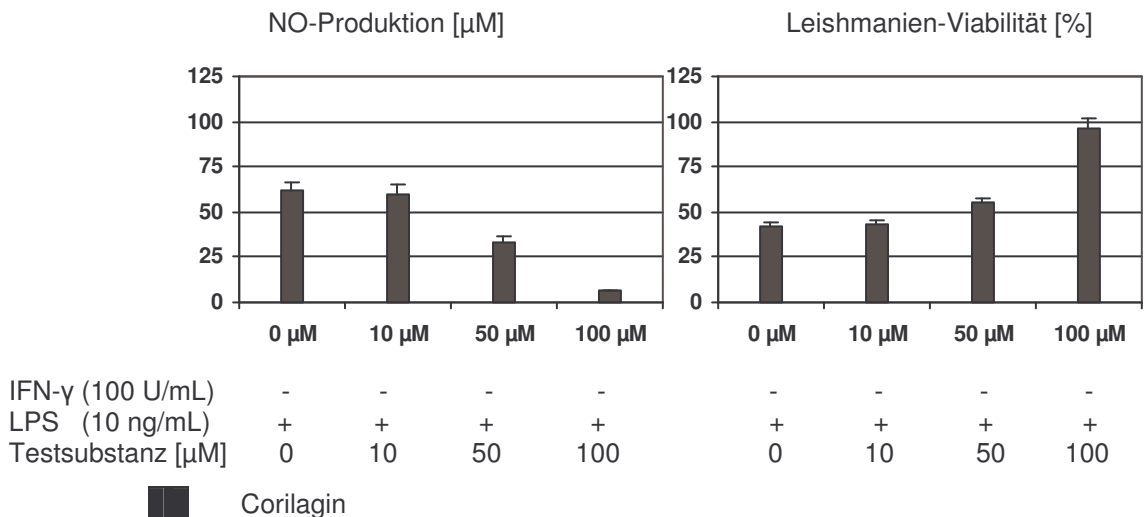
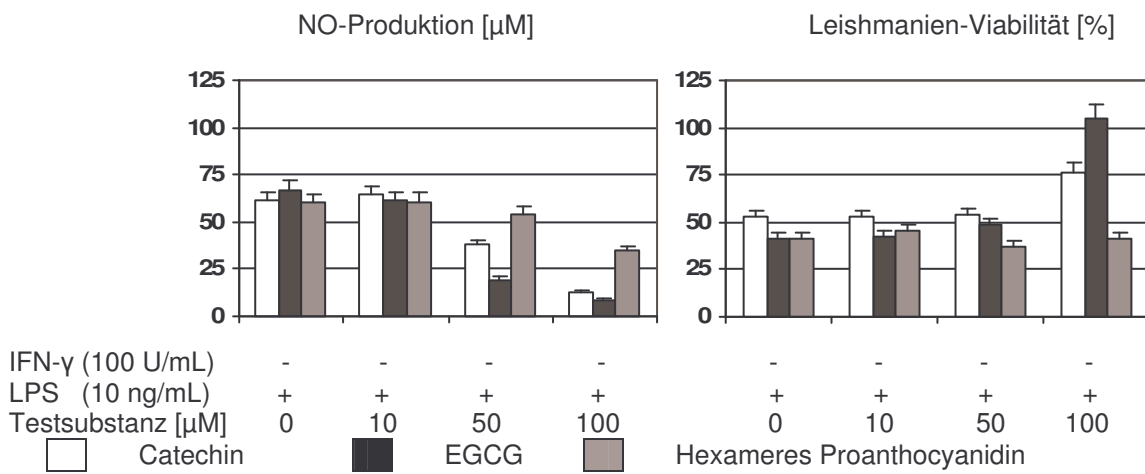
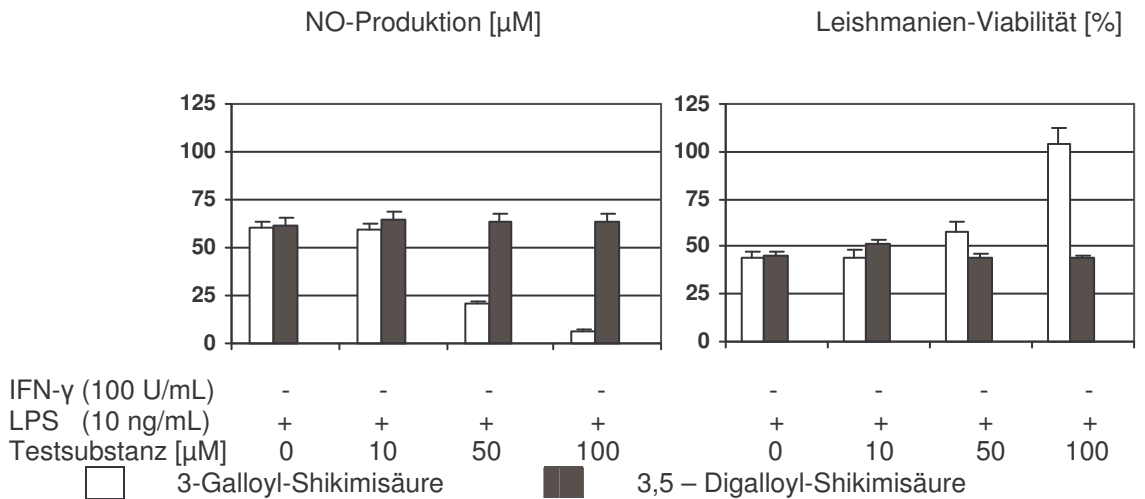


Abb. 7.1.: NO-Produktion [ $\mu\text{M}$ ] (linke Seite) und Leishmanien-Viabilität [%] (rechte Seite) von *L. donovani*-infizierten RAW 264.7-Zellen nach Stimulation mit 10 ng/mL LPS ohne (0  $\mu\text{M}$ ) bzw. nach Behandlung mit 10, 50 oder 100  $\mu\text{M}$  an Testsubstanzen. Dargestellt ist jeweils der Mittelwert aus 3 unabhängigen Versuchen mit Standardabweichung.

## Ergebnisse

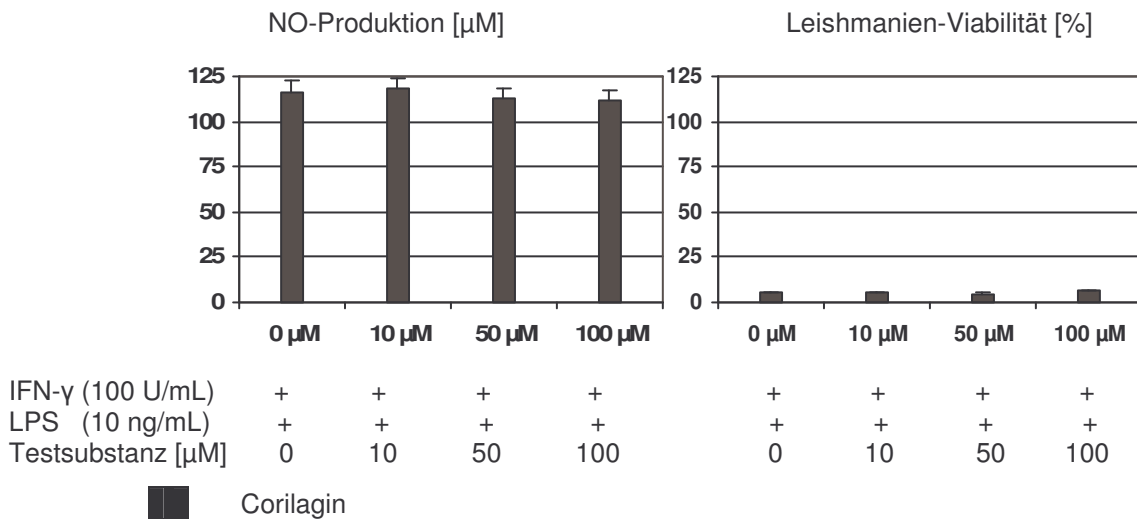
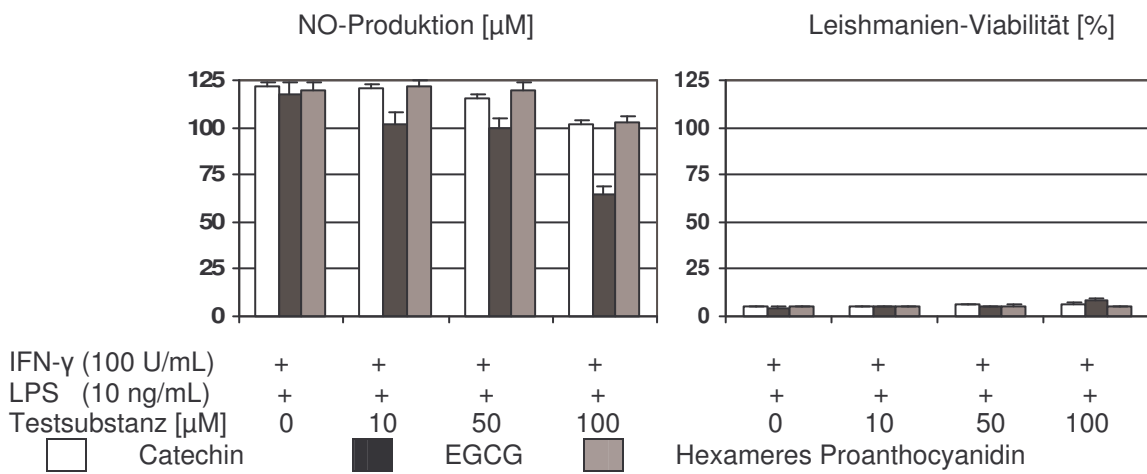
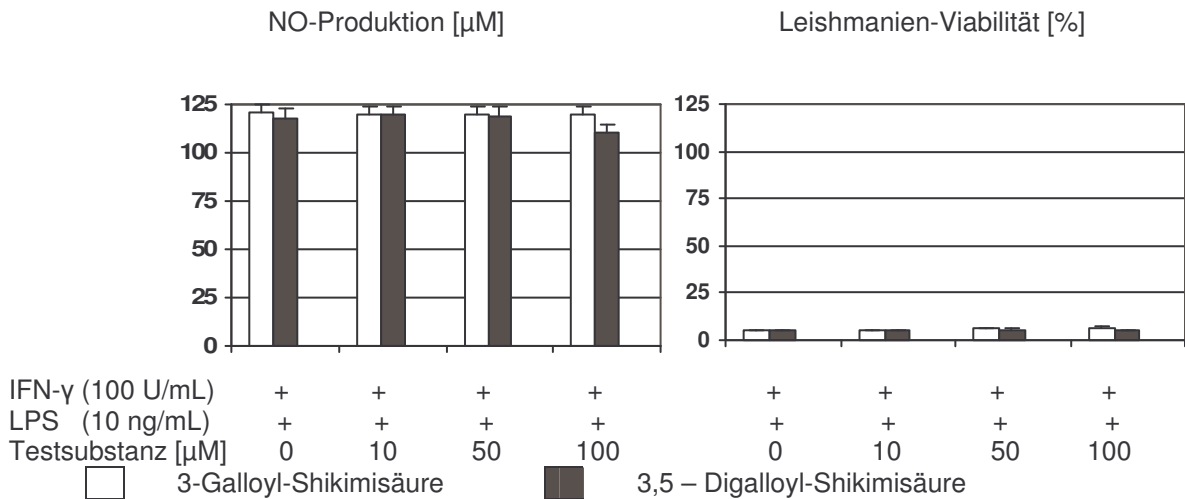


Abb. 7.2.: NO-Produktion [ $\mu\text{M}$ ] (linke Seite) und Leishmanien-Viabilität [%] (rechte Seite) von *L. donovani*-infizierten RAW 264.7-Zellen nach Stimulation mit 100 U/mL IFN- $\gamma$  + 10 ng/mL LPS ohne (0  $\mu\text{M}$ ) bzw. nach Behandlung mit 10, 50 oder 100  $\mu\text{M}$  an Testsubstanzen. Dargestellt ist jeweils der Mittelwert aus 3 unabhängigen Versuchen mit Standardabweichung.