

**Charakterisierung der radikalfangenden
Eigenschaften pflanzlicher Entzündungshemmer**

DISSERTATION

**der Fakultät für Chemie und Pharmazie
der Eberhard-Karls-Universität Tübingen**

**zur Erlangung des Grades eines Doktors
der Naturwissenschaften**

2005

**vorgelegt von
Ines Daniela Germann**

Tag der mündlichen Prüfung:

21. Juni 2005

Dekan:

Professor Dr. S. Laufer

1. Berichterstatter:

Professor Dr. H. Heinle

2. Berichterstatter:

Professor Dr. S. Laufer

**Meinen Eltern
in Liebe und Dankbarkeit gewidmet**

**Damit das Mögliche entsteht, muss immer wieder
das Unmögliche versucht werden.**

Hermann Hesse

Folgendes wurde veröffentlicht bzw. vorgestellt:

Stevanovic, D., Blumenstein, A., Scheule, A., Amraei, F., Germann, I., Friedemann, G., Djuric, D., Heinle, H. (2003). Angiotensin II induced oxidative stress in arterial vessels: measurements by different methods and effects of AT₁-receptor antagonists. *Perfusion*, 16 (2), 91 (Abstract).

Poster auf der 17. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Arterioskleroseforschung, Blaubeuren, März 2003.

Germann, I., Kelber, O., Berger-Büter, K., Weiser, D., Heinle, H. (2003). Radical scavenging properties in the willow bark extract STW 33 I and other plant extracts used in the therapy of osteoarthritis.

Poster auf dem 51. Jahreskongress der Gesellschaft für Arzneipflanzenforschung, Kiel, August 2003.

Germann, I., Kelber, O., Berger-Büter, K., Heinle, H., Weiser, D. (2003). Radical scavenging properties of anti-inflammatory phytotherapeutics. *Osteoarthritis and Cartilage*, 11, Suppl. A 2003, S120 (Abstract).

Poster auf dem "8th World Congress of the Osteoarthritis Research Society International", Berlin, Oktober 2003.

Germann, I., Kelber, O., Vinson, B., Weiser, D., Heinle, H. (2004). Radikal-abfangende Effekte von Iberogast[®] und seinen Komponenten.

Poster auf *Phytopharmaka und Phytotherapie – Forschung und Praxis*, Gemeinsamer Kongress der Gesellschaft für Arzneipflanzenforschung, der Gesellschaft für Phytotherapie und der Deutschen Gesellschaft für Klinische Pharmakologie und Therapie, Berlin, Februar 2004.

Germann, I., Kelber, O., Jäggi, R., Weiser, D., Heinle, H. (2004). Radical scavenging properties in the willow bark extract STW 33 I and other anti-inflammatory phytotherapeutics. *Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology*, 369, Suppl. 1, R 10 (Abstract).

Vortrag auf der 45. Frühjahrstagung der DGPT, Mainz, März 2004.

Heinle, H., Amraei-Davijani, F., Reimann, W., Germann, I., Weiser, D. (2004). Is the total antioxidative capacity of plasma a significant parameter characterizing oxidative stress? *Perfusion*, 17 (2), 95 (Abstract).

Poster auf der 18. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Arterioskleroseforschung, Blaubeuren, März 2004.

Germann, I., Kelber, O., Vinson, B., Weiser, D., Heinle, H. (2004). Radikalfangende Eigenschaften pflanzlicher Extrakte. *Perfusion*, 17 (2), 96 (Abstract).

Poster auf der 18. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Arterioskleroseforschung, Blaubeuren, März 2004.

Germann, I., Kelber, O., Vinson, B., Weiser, D., Heinle, H. (2004). Radikalfangende Eigenschaften pflanzlicher Entzündungshemmer.

In: *Vaskuläre Inflammation und endotheliale Dysfunktion*, Herausgeber: Heinle, H., Schulte, H., Von Eckardstein, A., Deutsche Gesellschaft für Arterioskleroseforschung, Tübingen, 247-251.

Blumenstein, A., Ferenci, K., Stevanovic, D., Amraei-Davijani, F., Germann, I., Weiser, D., Scheule, A., Heinle, H. (2004). Oxidative stress induced effects on endothelial dependent arterial vasorelaxation. *Atherosclerosis*, 5 (1), 108 (Abstract).

Poster auf dem "74th Congress of the European Atherosclerosis Society", Sevilla, April 2004.

Germann, I., Kelber, O., Weiser, D., Heinle, H. (2004). Radical scavenging activity of anti-inflammatory herbal extracts. *Atherosclerosis*, 5 (1), 6 (Abstract).

Poster auf dem "74th Congress of the European Atherosclerosis Society", Sevilla, April 2004.

Germann, I., Kelber, O., Vinson, B., Weiser, D., Laufer, S., Heinle, H. (2004). Iberogast® und seine Komponenten haben effiziente Radikal-abfangende Wirkungen.

Poster auf dem 13. Kongress der Mitteldeutschen Gesellschaft für Gastroenterologie, Suhl, Mai 2004.

Germann, I., Kelber, O., Vinson, B., Weiser, D., Heinle, H. (2004). The effect of STW 5 in in vitro-models is based on additive and supraadditive effects of its components.

Poster auf der Gemeinsamen Jahrestagung – Joint Meeting der DPhG, der ÖPhG und der CzPS, Regensburg, Oktober 2004.

Wuthold, K., Germann, I., Roos, G., Kelber, O., Weiser, D., Heinle, H., Kovar, KA. (2004). Thin-layer chromatography and multivariate data analysis of willow bark extracts. *Journal of Chromatographic Science*, 42, 306-309.

Hartwich, A., Germann, I., Kelber, O., Weiser, D., Heinle, H. (2005). Radikal-abfangende Eigenschaften von antiinflammatorischen Phytotherapeutika. *Perfusion*, 18 (2), 91 (Abstract).

Poster auf der 19. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Arterioskleroseforschung, Blaubeuren, März 2005.

Germann, I., Kelber, O., Müller, J., Weiser, D., Heinle, H. (2005). Radical-scavenging properties of the antirheumatic phytomedicine STW 1 and its components. *Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology*, 371, Suppl. 1, R 7 (Abstract).

Vortrag auf der 46. Frühjahrstagung der DGPT, Mainz, März 2005.

Germann, I., Kelber, O., Müller, J., Weiser, D., Heinle, H. (2005). Radikal-abfangende Wirkungen des pflanzlichen Rheumapräparates STW 1 und seiner Komponenten. *Medizinische Klinik* 2005, 100: Abstract-Band, 95 (Abstract).

Poster auf dem 111. Internistenkongress, Wiesbaden, April 2005.

Germann, I., Kelber, O., Vinson, B., Weiser, D., Heinle, H. (2005). Zur Wirkung des Magenpräparates STW 5 tragen additive und supraadditive Wirkungen seiner Komponenten bei. *Medizinische Klinik* 2005, 100: Abstract-Band, 108 (Abstract).

Poster auf dem 111. Internistenkongress, Wiesbaden, April 2005.

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung und Fragestellung	1
1.1	Oxidativer Stress in vivo	1
1.1.1	Bildung reaktiver Sauerstoffspezies	1
1.1.2	Entgiftungsmechanismen für ROS	1
1.1.3	Pathophysiologie des oxidativen Stresses	2
1.2	Oxidativer Stress und Entzündung	4
1.2.1	Magen-Darm-Erkrankungen	5
1.2.1.1	Gastritis	5
1.2.1.2	Ulcus ventriculi und Ulcus duodeni	5
1.2.1.3	Reizmagen und Reizdarm	6
1.2.2	Erkrankungen des rheumatischen Formenkreises	7
1.2.2.1	Rheumatoide Arthritis	7
1.2.2.2	Arthrose	8
1.3	Pflanzliche Extrakte als entzündungshemmende Arzneimittel	10
1.3.1	Iberogast®	10
1.3.2	Weidenrinde, Teufelskrallenwurzel, Brennnesselblätter	11
1.3.3	Phytodolor®	12
1.4	Fragestellung	13
2	Material	14
2.1	Chemikalien	14
2.2	Extrakte	16
2.2.1	Iberogast®	16
2.2.1.1	Iberogast® und seine Einzelextrakte	16
2.2.1.2	Isolierte Inhaltsstoffe und ihr Vorkommen in den Extrakten	17
2.2.1.3	Mangelvarianten und äquivalente Einzelextrakte von Iberogast®	18
2.2.1.4	Alkaloidhaltiger und alkaloidabgereicherter Schöllkrautextrakt	20
2.2.1.5	Iberisextrakte mit unterschiedlichen Inhaltsstoffen	20

2.2.2	Weidenrindenextrakte	22
2.2.2.1	Extrakte aus Weidenrinde, Teufelskrallenwurzel und Brennnesselblättern	22
2.2.2.2	Durch sequentielle Extraktion erhaltene Fraktionen aus Weidenrindenextrakt	23
2.2.2.3	Charakterisierung unterschiedlicher Weidenrindenextrakte	23
2.2.3	Phytodolor [®]	25
2.2.3.1	Phytodolor [®] und seine Einzelextrakte	25
2.2.3.2	Charakterisierung verschiedener Mischungen aus Pappel, Goldrutenkraut und Eschenrinde	25
2.3	Lösungen	27
2.4	Biologisches Material	29
2.4.1	Lungenpräparate	29
2.4.2	Vollblut	29
2.4.3	Leukozyten	29
2.5	Geräte	30
3	Methoden	31
3.1	Radikalbildung durch die AAPH-Reaktion	31
3.2	Radikalbildung durch die Xanthin/ Xanthinoxidase-Reaktion	33
3.3	Radikalbildung durch Lungenmakrophagen	35
3.4	Radikalbildung von Leukozyten in Vollblut und von isolierten Leukozyten	37
3.5	Korrelation von chromatographischer Analyse und radikal- fangenden Eigenschaften bei verschiedenen Weidenrinden- extrakten	39
3.6	Statistik	41

4	Ergebnisse	42
4.1	Untersuchungen zur Wirkung von Iberogast[®] (STW 5) und seiner Komponenten	42
4.1.1	Radikalfangende Effekte von Iberogast [®] und seiner Einzelextrakte in verschiedenen Testsystemen	42
4.1.1.1	Radikalproduktion durch AAPH	42
4.1.1.2	Radikalproduktion durch das Xanthin/ Xanthinoxidase-System	44
4.1.1.3	Radikalproduktion in exzidierten Präparaten aus Schweinelunge	45
4.1.1.4	Radikalproduktion von isolierten Leukozyten	46
4.1.2	Radikalfangende Eigenschaften isolierter, in den Extrakten enthaltener Inhaltsstoffe mittels der AAPH-Reaktion	49
4.1.2.1	Vergleich der radikalfangenden Eigenschaften von isolierten Inhaltsstoffen und den der dazugehörigen Extrakte	49
4.1.2.2	Radikalfangende Eigenschaften verschiedener, isolierter Inhaltsstoffe	52
4.1.2.3	Einflüsse der Alkaloide im Schöllkrautextrakt auf dessen radikalfangende Eigenschaften	54
4.1.2.4	Einfluss des Gehaltes an Kämpferol und Cucurbitacin E und Cucurbitacin I in Iberisextrakten auf die radikalfangenden Eigenschaften von Iberisextrakten	55
4.1.3	Untersuchungen zu pharmakologischen Wechselwirkungen zwischen den Einzelextrakten in Iberogast [®]	57
4.1.3.1	Untersuchung mittels der AAPH-Reaktion	57
4.1.3.2	Untersuchung mittels des Lungenmodells	58
4.1.3.3	Untersuchung mittels des Leukozytenmodells	59
4.2	Untersuchungen zur Wirkung von Extrakten aus Weidenrinde, Teufelskrallenwurzel und Brennesselblättern	61
4.2.1	Radikalfangende Effekte der Extrakte aus Weidenrinde, Teufelskrallenwurzel und Brennesselblättern in verschiedenen Testsystemen	61
4.2.1.1	Radikalproduktion durch AAPH	61
4.2.1.2	Radikalproduktion durch das Xanthin/ Xanthinoxidase-System	62
4.2.1.3	Radikalproduktion in exzidierten Präparaten aus Schweinelunge	63
4.2.1.4	Radikalproduktion von Leukozyten in Vollblut	65
4.2.1.5	Radikalproduktion von isolierten Leukozyten	67

4.2.2	Radikalfangende Effekte des wässrigen Weidenrindenextraktes und seiner unterschiedlich polarer Fraktionen in verschiedenen Testsystemen	70
4.2.2.1	Radikalproduktion durch AAPH	70
4.2.2.2	Radikalproduktion durch das Xanthin/ Xanthinoxidase-System	71
4.2.2.3	Radikalproduktion in exzidierten Präparaten aus Schweinelunge	72
4.2.3	Korrelation von chromatographischer Analyse und radikalfangenden Eigenschaften bei verschiedenen Weidenrindenextrakten	75
4.3	Untersuchungen zur Wirkung von Phytodolor[®] (STW 1) und seiner Komponenten	82
4.3.1	Effekte von Phytodolor [®] und seiner Einzelextrakte auf die Radikalproduktion durch AAPH	82
4.3.2	Wechselwirkungen zwischen den Einzelextrakten in Phytodolor [®] , ermittelt durch die AAPH-Reaktion	83
5	Diskussion	85
5.1	Iberogast[®] und Komponenten	85
5.1.1	Antioxidative Wirkungen von Iberogast [®] und seiner Einzelextrakte in isolierten und zellulären radikalbildenden Systemen	85
5.1.2	Wechselwirkungen zwischen den Einzelextrakten von Iberogast [®]	88
5.1.3	Vergleich der antioxidativen Wirkungen von isolierten Inhaltsstoffen und von Extrakten	90
5.1.4	Zur antioxidativen Wirksamkeit und Struktur der Flavonoide	93
5.2	Weidenrindenextrakte im Vergleich zu Extrakten aus Teufelskralle und Brennnesselblättern	95
5.2.1	Antioxidative Wirkungen von Extrakten aus Weidenrinde, Teufelskrallenwurzel und Brennnesselblättern in isolierten und zellulären radikalbildenden Systemen	95
5.2.2	Vergleich der antioxidativen Effekte eines Weidenrindenextraktes mit denen seiner durch sequentielle Extraktion entstandenen verschieden polaren Fraktionen	98
5.2.3	Multivariate Datenanalyse	99

5.3	Phytodolor[®]	101
5.3.1	Antioxidative Wirksamkeit von Phytodolor [®] und seiner Einzelextrakte	101
5.3.2	Wechselwirkungen zwischen den Einzelextrakten von Phytodolor [®]	103
6	Zusammenfassung	104
7	Literaturverzeichnis	107
8	Anhang	116
9	Danksagung	117

Abkürzungsverzeichnis

ACC	1-Aminocyclopropan-1-carbonsäure
ATP	Adenosintriphosphat
COX 1	Cyclooxygenase 1
COX 2	Cyclooxygenase 2
DEV	Droge-Extrakt-Verhältnis
DHFR	Dihydrofolat-Reduktase
DNA	desoxyribonucleic acid
GIT	Gastrointestinaltrakt
HLE	humane Leukozytenelastase
H-NMR-Spektroskopie	Kernresonanz-Spektroskopie von ¹ H-Wasserstoff-Kernen
HPLC	High Performance Liquid Chromatography
HPTLC	High Performance Thin Layer Chromatography
IC	inhibitory concentration
IgG	Immunglobulin G
IL	Interleukin
INF	Interferon
iNOS	induzierbare NO-Synthetase
LOX	Lipoxygenase
LPS	Lipopolysaccharid
mRNA	messenger ribonucleic acid
MVD	multivariate Datenanalyse
MW	Mittelwert
PGE ₂	Prostaglandin E ₂
PLS	Partial Least Squares
R ²	Bestimmtheitsmaß
RG	Regressionsgerade
ROS	Reaktive Sauerstoffspezies
SD	Standardabweichung
SOD	Superoxid-Dismutase
TEAC	Trolox equivalent antioxidant capacity
TNF alpha	Tumornekrosefaktor alpha

1 Einleitung und Fragestellung

1.1 Oxidativer Stress in vivo

1.1.1 Bildung reaktiver Sauerstoffspezies

Zellen aerober Organismen sind einer Vielzahl von reaktiven Sauerstoffspezies (ROS) ausgesetzt. Dazu zählen sowohl radikalische Komponenten, wie zum Beispiel Superoxidradikale ($O_2^{\cdot -}$), Hydroxylradikale (OH^{\cdot}) oder Peroxylradikale (ROO^{\cdot}), als auch nicht radikalische Substanzen wie zum Beispiel Wasserstoffperoxid oder Peroxynitrit. ROS entstehen im Körper bei den verschiedensten Vorgängen. Eine wichtige Bildungsstätte für ROS ist die mitochondriale Atmungskette, bei der unter ATP-Bildung Sauerstoff zu Wasser umgesetzt wird. Dabei bilden ein bis drei Prozent des eingeatmeten Sauerstoffs freie Radikale. Bestimmte Enzyme, wie zum Beispiel die NO-Synthetase und die Xanthinoxidase, können ebenfalls ROS bilden. Bei der Phagozytose werden durch die NADPH-Oxidase der Leukozyten große Mengen an Radikalen gebildet, um so die eingedrungenen Bakterien oder Viren unschädlich zu machen. Auch bei verschiedenen Erkrankungen, zum Beispiel entzündlichen oder ischämischen Vorgängen, werden vermehrt Radikale frei. Daneben wird die Bildung von ROS auch durch äußere Einflüsse wie UV-Strahlung, Luftverschmutzung, Nahrungsmittel, Toxine, Chemikalien und Arzneimittel angeregt (Kohen and Nyska, 2002; Kuhn, 2003; Siems *et al.*, 1998).

1.1.2 Entgiftungsmechanismen für ROS

Zum Schutz gegen ROS steht dem Körper eine Vielzahl von Verteidigungsmöglichkeiten zur Verfügung. Diese lassen sich anhand ihrer Wirkmechanismen unterscheiden (Chapple, 1997; Halliwell, 1994):

Enzymatische Antioxidantien, wie die Superoxid-Dismutase (SOD), die Catalase und die Glutathion-Peroxidase, katalysieren den Abbau von ROS. Dabei entfernt die SOD Superoxidradikale unter Bildung von Wasserstoffperoxid. Wasserstoffperoxid selbst wird durch die Catalase unter Bildung von Wasser und Sauerstoff und durch die Glutathion-Peroxidase beseitigt. Diese

reduziert Wasserstoffperoxid unter Bildung von Wasser, während andererseits reduziertes Glutathion oxidiert wird.

Präventive Antioxidantien, wie Transferrin, Lactoferrin, Caeruloplasmin und Albumin, binden Übergangsmetallionen wie Cu^{2+} und Fe^{2+} . Diese stehen dann nicht mehr als Katalysatoren bei der wichtigen Haber-Weiss-Redox-Reaktion zur Verfügung.

Radikalabfangende Antioxidantien reagieren direkt mit den ROS und werden dabei selbst oxidiert. Dazu zählen die wasserlöslichen Antioxidantien Vitamin C, Glutathion, Harnsäure und die fettlöslichen Antioxidantien Vitamin E, Carotinoide, Coenzym Q10 (Siems *et al.*, 1996).

Weitere pflanzliche Inhaltsstoffe, wie zum Beispiel Flavonoide, Benzoe- und Zimtsäurederivate wirken ebenfalls antioxidativ in verschiedenen Testsystemen (Natella *et al.*, 1999). Als Mechanismen für die Effekte der Flavonoide werden das Abfangen von freien Radikalen, Chelatbildung mit Übergangsmetallionen, Beeinflussung von Enzymen und die Aktivierung bzw. Regenerierung zellulärer Antioxidantien diskutiert (Fuhrman and Aviram, 2001; Rice-Evans, 1995). Es wird angenommen, dass diese Komponenten über die Nahrung wichtige protektive Wirkungen im Organismus entfalten und zum Beispiel zu den positiven Effekten einer typischen mediterranen Diät beitragen (Morton *et al.*, 2000; Renaud and de Lorgeril, 1992; Rice-Evans, 1995).

Da die antioxidativ wirksamen Substanzen keinen kompletten Schutz bieten, gibt es zusätzlich Reparaturenzyme, die zum Beispiel ROS-verursachte Schäden in Proteinen oder der DNA wieder reparieren können (Halliwell, 1994).

1.1.3 Pathophysiologie des oxidativen Stresses

Da ROS „normale“ Stoffwechselintermediate sind, sollen zunächst wichtige physiologische Funktionen dargestellt werden. Reaktive Sauerstoffspezies sind entscheidend mitbeteiligt an der Genaktivierung, am Zellwachstum, an der Abwehr von Bakterien und Viren durch Leukozyten und an der Biosynthese vieler Moleküle. Ferner agieren sie als Signalmoleküle innerhalb der Zellen und zwischen den Zellen (Kohen and Nyska, 2002). So konnte gezeigt werden, dass ROS, die in glatten Muskelzellen oder Endothelzellen von Gefäßen

gebildet werden, das Zellwachstum induzieren oder inhibieren bzw. den Zelltod oder das Überleben der Zelle fördern können. Welche Reaktion zustande kommt, hängt von vielen Faktoren ab: der Art und Menge der ROS, dem Eisengehalt und den antioxidativen Enzymen (Irani, 2000).

Wird das Gleichgewicht zwischen Bildung und Eliminierung der ROS zu Gunsten der Bildung gestört, spricht man von oxidativem Stress (Kohen and Nyska, 2002). Zahlreiche Erkrankungen wie Morbus Parkinson (Tieu *et al.*, 2003), Alzheimer-Demenz, Diabetes mellitus (Piconi *et al.*, 2003), Asthma bronchiale (Dworski, 2000), Atherosklerose (Maxwell and Lip, 1997; Nedeljkovic *et al.*, 2003), Krebs (Cerutti, 1994) und entzündliche Erkrankungen, wie rheumatoide Arthritis (Halliwell *et al.*, 1992) und entzündliche Darmerkrankungen (Grisham, 1994), werden mit oxidativem Stress in Verbindung gebracht (Pierce *et al.*, 2004). Die bei oxidativem Stress vermehrt vorhandenen ROS verursachen Gewebeschäden auf ganz unterschiedliche Weise: Proteine und DNA werden geschädigt, es kommt zur Lipidperoxidation, wichtige Enzyme werden oxidiert und proinflammatorische Zytokine werden vermehrt freigesetzt (Chapple, 1997). Beachtet werden sollte, dass ROS zum einen kausal in der Pathogenese verschiedener Krankheiten eine Rolle spielen können, zum anderen bei vielen Erkrankungen sekundär auf Grund von Gewebeschädigung vermehrt gebildet werden (Halliwell *et al.*, 1992).

1.2 Oxidativer Stress und Entzündung

Als Entzündung bezeichnet man die Reaktion des Organismus auf eine durch endogene oder exogene Noxen hervorgerufene Gewebeschädigung. Die typischen Symptome sind Rötung, Schwellung, Überwärmung, Schmerz und eine eingeschränkte Funktion. Man unterscheidet die akute und die chronische Form der Entzündung: Die akute Entzündung, die zeitlich begrenzt ist und vollständig ausheilt, stellt eine sinnvolle Reaktion des Körpers dar. Im Gegensatz dazu hat die chronische Entzündung vor allem destruktiven Charakter. Eine Vielzahl von Mediatoren, wie zum Beispiel Prostaglandine, Thromboxan, Prostacyclin, Leukotriene und Zytokine (IL-1, TNF alpha), spielen eine entscheidende Rolle bei Entzündungsvorgängen (Laufer, 2002).

Während einer Entzündung werden ebenfalls große Mengen an reaktiven Sauerstoff- und Stickstoffspezies gebildet. So wird beim Eindringen von Krankheitserregern das Immunsystem aktiviert und die Leukozyten beginnen mit der Phagozytose. Dabei werden Enzyme und ROS freigesetzt und damit die eingedrungenen Bakterien und Viren getötet. Für das umgebende Gewebe stellt diese Abwehrreaktion aber oxidativen Stress mit seinen negativen Wirkungen dar (Arrigoni-Martelli, 1985).

Zusätzlich haben reaktive Sauerstoff- und Stickstoffspezies Signalmolekülfunktion bei der Entzündung. Sie aktivieren Transkriptionsfaktoren unter anderem der NF-kappa-B-Familie und Proteinkinasen und inaktivieren Protein-Tyrosin-Phosphatasen. Die Aktivierung von NF-kappa-B führt zur Stimulation der Transkription von mRNA für proinflammatorische Zytokine, sodass der Übergang zu einer chronischen Entzündung verständlich wird (Chapple, 1997; Di Virgilio, 2004).

Daneben gibt es weitere Quellen für ROS bei der Entzündungsreaktion: Lösliche Immunglobuline können Wasserstoffperoxid bilden, bei der Prostanoid-Bildung durch Cyclooxygenase und Lipoxygenase entstehen reaktive Sauerstoffspezies, auch aktivierte Endothelzellen können Superoxidradikale

produzieren. Die induzierbare NO-Synthetase (iNOS) bildet nach Stimulation durch proinflammatorische Substanzen Stickoxid (NO^*) (Di Virgilio, 2004).

Die Bedeutung von reaktiven Sauerstoffspezies für die Inflammation zeigt sich auch darin, dass entzündungshemmende Wirkstoffe häufig auch antioxidativ wirken. Für Flufenaminsäure, ein klassisches Antirheumatikum, konnten zusätzlich zum bekannten Wirkmechanismus (Hemmung der Cyclooxygenase) eine Hemmung der Superoxid-Bildung und radikalfangende Eigenschaften nachgewiesen werden. Damit wird deutlich, dass auch antioxidative Effekte mit zur antiphlogistischen Wirkung der Flufenaminsäure beitragen (Arrigoni-Martelli, 1985).

Da in der vorliegenden Arbeit pflanzliche Extrakte untersucht werden, die bei verschiedenen entzündlichen Erkrankungen eingesetzt werden, sollen zunächst diese Erkrankungen, dann die Extrakte kurz beschrieben werden.

1.2.1 Magen-Darm-Erkrankungen

1.2.1.1 Gastritis

Eine Entzündung der Magenschleimhaut wird verursacht durch exogene Noxen (Alkohol, nichtsteroidale Antiphlogistika), Stress oder Traumen (z.B. Verbrennungen), die vermutlich zu einer Schädigung der protektiven Mechanismen führen. Zu den protektiven Mechanismen, die die Schleimhaut vor Pepsin und Salzsäure schützen, zählen eine intakte Muzinschicht, unversehrte Membranen der Epithelzellen, gute Schleimhautdurchblutung, ungestörte PGE_2 -Wirkung und die Fähigkeit zur Epithelregeneration. Neben der akuten Gastritis gibt es auch chronische Verlaufsformen.

1.2.1.2 Ulcus ventriculi und Ulcus duodeni

Unter Ulzera versteht man gutartige Wanddefekte im Magen-Darm-Trakt, wobei dabei immer auch tiefere Wandschichten betroffen sind. Bei Patienten, die unter Ulzera leiden, ist das Gleichgewicht zwischen den protektiven und den aggressiven Mechanismen der Mukosabarriere gestört. Zu den aggressiven Faktoren, die den Schutz gegen Salzsäure und Pepsin vermindern, zählen die

Gallensalze, Glucocorticoide, nichtsteroidale Antiphlogistika, Minderdurchblutung der Schleimhaut und bakterielle Infektionen mit *Helicobacter pylori*. Auch hier sind Stresssituationen, Traumen, schwere Verbrennungen oder eine Therapie mit nichtsteroidalen Antirheumatika als Auslöser von Bedeutung.

Bei der Behandlung von Gastritiden und Ulzera ist es primär wichtig, die schädigenden Einflüsse auszuschalten. Eine medikamentöse Behandlung erfolgt mit Antazida, H₂-Antihistaminika, Protonenpumpenhemmern, Sucralfat und Prostaglandin-E-Derivaten. Bei einer Beteiligung von *Helicobacter pylori* sollte dieser vollständig eliminiert werden, da er eine entscheidende Rolle bei der Pathogenese von Mukosaentzündungen, Ulzera und Magenkrebs zu spielen scheint: *Helicobacter pylori* bewirkt eine starke Infiltration von Leukozyten in die Schleimhaut, die nach Aktivierung durch Freisetzung von ROS Gewebeschäden verursachen können (Kountouras *et al.*, 2001).

1.2.1.3 Reizmagen und Reizdarm

Als Reizmagen werden Beschwerden wie Appetitlosigkeit, Unverträglichkeit bestimmter Speisen, Schmerz, Druck- und Völlegefühl im Oberbauch ohne nachweisbare organische Defekte bezeichnet. Als Ursachen werden Störungen in der Regulation der Säuresekretion bzw. der Reaktion des Gastrointestinaltraktes (GIT) auf die Säuresekretion, Störungen in der viszeralen Reiz- und Schmerzverarbeitung und Störungen der Motilität diskutiert. Ebenfalls sollten als Ursachen Infektionen mit *Helicobacter pylori* oder Folgereaktionen auf Entzündungen der Magenschleimhaut als Ursachen in Betracht gezogen werden. Die Behandlung zielt vor allem auf die Beseitigung der Symptome ab und besteht aus der Anwendung von Protonenpumpenblockern, H₂-Antihistaminika, Antazida und Prokinetika.

Als Reizdarm werden funktionelle Störungen des Dickdarms bezeichnet, die in drei Gruppen eingeteilt werden können: der Obstipationstyp, der Diarrhoetyp und der Schmerztyp. Beim Reizdarmsyndrom ist von einer multifaktoriellen Genese auszugehen, bei der als Einzelfaktoren zum Beispiel eine erniedrigte Reizschwelle auf Dehnung des Darms, Infektionen, psychosoziale Faktoren und

Nahrungsmittelintoleranzen diskutiert werden (Schindelbeck, 2001). Auch eine entzündliche Komponente wird diskutiert: Durch eine vorausgegangene Gastroenteritis (Gwee *et al.*, 2003) oder entzündliche Darmerkrankung wie Colitis ulcerosa (Collins *et al.*, 2001), genetische Faktoren, veränderte Mikroflora oder Nahrungsmittelallergien kann eine geringgradige Entzündung ausgelöst werden, die Neurone sensibilisiert und so zu einer viszeralen Hypersensibilität und veränderten Motilität des Darms führt (Barbara *et al.*, 2002). Die Behandlung ist je nach Beschwerdebild sehr unterschiedlich und kann zum Beispiel die Anwendung von Anticholinergika, Antidepressiva, Loperamid, Mebeverin und Prokinetika einschließen (Heldwein, 2001).

Bei allen diesen vorgestellten Erkrankungen des Gastrointestinaltraktes spielen Entzündungen eine Rolle. Da einerseits bei diesen chronischen Erkrankungen Phytotherapeutika einen hohen Stellenwert haben, andererseits ROS wahrscheinlich signifikant an den Krankheitsbildern beteiligt sind, sollte geklärt werden, inwieweit radikalfangende Eigenschaften, zum Beispiel bei der Präparation Iberogast[®], zur Gesamtwirkung beitragen können.

1.2.2 Erkrankungen des rheumatischen Formenkreises

Im Folgenden werden die Krankheitsbilder und Behandlungsmöglichkeiten der rheumatoiden Arthritis und der Arthrose kurz vorgestellt.

1.2.2.1 Rheumatoide Arthritis

Die rheumatoide Arthritis ist eine Autoimmunerkrankung, von der circa 1 % der Bevölkerung betroffen ist. Vermutlich entwickelt sich die Krankheit durch das Zusammentreffen einer genetischen Disposition und exogener Faktoren, die aber noch nicht definitiv bekannt sind. Dabei kommt es zu einer Veränderung der Synovialmembran, wodurch das Immunsystem aktiviert wird: T- und B-Lymphozyten werden aktiv, Makrophagen sezernieren Entzündungsmediatoren wie Interleukin-1 und TNF alpha. Das von B-Lymphozyten gebildete Immunglobulin IgG und die dagegen gebildeten Autoantikörper bilden Immunkomplexe, die das Komplementsystem aktivieren und in der Synovialis phagozytiert werden. Dabei kommt es zur Entzündung der Gelenkhaut

verbunden mit einer Wucherung (Pannusbildung) und zur Freisetzung von Enzymen, die den Knorpel und Knochen zerstören (Pierer *et al.*, 2002). Die von aktivierten Granulozyten freigesetzten ROS schädigen unmittelbar die verschiedenen Bestandteile des Bindegewebes und fördern dadurch deren Abbau. Gezeigt wurde dies für Kollagen und Fibronectin (Muller-Peddinghaus, 1987). Ebenfalls ist beschrieben, dass die bei Patienten gefundene, erhöhte Viskosität der Synovialflüssigkeit durch Depolymerisation von Hyaluronsäure durch ROS in Gegenwart von Eisen zustande kommen könnte (Halliwell *et al.*, 1992). Die ROS dafür stammen vermutlich von aktivierten Granulozyten. Das Eisen könnte von lysierten Zellen freigesetzt werden, aus dem Abbau von Hämoglobin stammen oder aus Ferritin (Halliwell, 1995). Neben den Gelenken können auch weitere Organe betroffen sein. Zur medikamentösen Behandlung werden nichtsteroidale Antirheumatika, Glucocorticoide (v.a. Prednison und Prednisolon) und Basistherapeutika (z.B. Methotrexat, Azathioprin, Leflunomid, Goldverbindungen, Chloroquin, Sulfasalazin, D-Penicillamin) herangezogen. Sind diese unwirksam, können so genannte Biologicals (z.B. Etanercept, Infliximab, Anakinra, Adalimumab) eingesetzt werden (Brune, 2002). Krankengymnastik und Ergotherapie ergänzen das Behandlungsspektrum. Wird damit kein ausreichender Erfolg erzielt, muss eventuell operiert werden.

1.2.2.2 Arthrose

Durch mechanische Überbelastung, Fehlstellungen, Traumen oder Stoffwechselerkrankungen kommt es zur Erosion des Gelenkknorpels, Mobilisation von Knorpelpartikeln bei Bewegung und dadurch hervorgerufen zu einer Synovitis. Der Knorpelabbau wird begleitet durch Veränderungen in Form von knöchernen Randwülsten (Osteophyten) und einer Sklerosierung der Synovialzotten. Auch freie Radikale spielen eine Rolle in der Pathogenese der Arthrose. So wird zum Beispiel der Metabolismus der Chondrozyten, die die extrazelluläre Matrix des Knorpels synthetisieren, durch freie Radikale, die bei der Entzündung entstehen, beeinflusst (Ghosh and Smith, 2002). Außerdem greifen die ROS in intrazelluläre Signalmechanismen ein, beeinflussen den Knorpelabbau und die Gelenkentzündung und verursachen Schäden in der Matrix (Henrotin *et al.*, 2003). Die Behandlung besteht in einer Reduzierung des Übergewichts,

Krankengymnastik, Wärmeanwendung, Kälteanwendung (nur in der entzündlichen Phase), Gabe von Analgetika / Antiphlogistika, Glucocorticoiden oder Knorpelaufbaupräparaten. Wird damit kein ausreichender Erfolg erzielt, stehen noch die Synovektomie und der Gelenkersatz als weitere Behandlungsmöglichkeiten zur Verfügung.

Auch bei diesen Erkrankungen liegt eine chronische Entzündung vor. Neben den bereits genannten Arzneimitteln werden zum Teil auch Phytopharmaka, wie zum Beispiel Phytodolor[®], Weidenrinden-, Teufelskrallenwurzel- und Brennesselblätterextrakte zur Behandlung eingesetzt. Es sollte geklärt werden, inwieweit diese Phytopharmaka auch antioxidative Effekte aufweisen.

1.3 Pflanzliche Extrakte als entzündungshemmende Arzneimittel

Im Folgenden werden Iberogast[®] und seine Einzelextrakte, Extrakte aus Weidenrinde, Teufelskrallenwurzel und Brennnesselblättern und Phytodolor[®] mit seinen Einzelextrakten, die in der vorliegenden Arbeit untersucht wurden, näher beschrieben.

1.3.1 Iberogast[®]

Iberogast[®] ist ein Kombinationspräparat mit alkoholischen Auszügen aus *Iberis amara*, Angelikawurzel, Kamillenblüten, Kümmelfrüchten, Mariendistelrüchten, Melissenblättern, Pfefferminzblättern, Schöllkraut und Süßholzwurzel. In **Tab. 1** werden die Wirkungen der Einzelextrakte auf den Magen-Darm-Trakt zusammengefasst.

Iberogast[®] wird angewendet bei Störungen der Magenfunktion, Gastritis, Magen- und Darmspasmen, ferner bei *Ulcus ventriculi* und *Ulcus duodeni* (Fachinformation Iberogast[®]). Auch beim Reizdarmsyndrom ist Iberogast[®] wirksam (Saller *et al.*, 2002). Durch einige Untersuchungen *in vitro* und an Tieren konnten die Wirkungen von Iberogast[®] näher charakterisiert werden: Es moduliert die Motilität des Magens (Hohenester *et al.*, 2004a; Hohenester *et al.*, 2004b) und Darms (Heinle *et al.*, 2004; Okpanyi *et al.*, 1993), vermindert die Sensibilität des enteralen Nervensystems (Liu *et al.*, 2004), hemmt die Säuresekretion und reduziert die schleimhautschädigenden Leukotriene, steigert die Muzin- und Prostaglandin-E₂-Sekretion im Magen (Khayyal *et al.*, 2001). Zusätzlich wirkt Iberogast[®] antioxidativ (Schempp *et al.*, 2004), antibakteriell, entzündungshemmend (Saller *et al.*, 2002) und karminativ.

Tab. 1. Wirkungen der Einzalextrakte von Iberogast® auf den GIT
 (Monographie der Kommission E Schöllkraut, 1985; Monographie der Kommission E Mariendistel Früchte, 1986; Monographie der Kommission E Angelikawurzel, 1990; Monographie der Kommission E Kamillenblüten, 1990; Monographie der Kommission E Kümmel, 1990; Monographie der Kommission E Melissenblätter, 1990; Monographie der Kommission E Pfefferminzblätter, 1990; Monographie der Kommission E Süßholzwurzel, 1991)

Extrakt aus	Wirkung im GIT
Angelikawurzel	spasmolytisch, cholagog, Förderung der Magensaftsekretion
Iberis amara	erhöht Tonus der glatten, gastrointestinalen Muskulatur (Reichling and Saller, 2002)
Kamillenblüten	antiphlogistisch, antibakteriell, spasmolytisch, wundheilungsfördernd
Kümmelfrüchten	spasmolytisch, verdauungsfördernd, antimikrobiell
Mariendistel Früchten	cytoprotektiv in Leber, regt Regenerationsfähigkeit der Leberzellen an
Melissenblättern	beruhigend, karminativ, spasmolytisch (Heinle <i>et al.</i> , 2004)
Pfefferminzblättern	karminativ, spasmolytisch, choloretisch
Schöllkraut	spasmolytisch im oberen Verdauungstrakt, im Magen motilitätsfördernd (Hohenester <i>et al.</i> , 2004a)
Süßholz	spasmolytisch, beschleunigt Heilung von Magenulzera

1.3.2 Weidenrinde, Teufelskrallenwurzel, Brennnesselblätter

Weidenrinde, Teufelskrallenwurzel und Brennnesselblätter zählen zu den pflanzlichen Antirheumatika. Die Extrakte weisen im Gegensatz zu den herkömmlichen chemischen Antirheumatika, die über eine Hemmung der Cyclooxygenase wirken, auf Grund ihrer Vielzahl von wirksamkeitsmitbestimmenden Inhaltsstoffen ein deutlich breiteres Wirkspektrum auf. So wird zum Beispiel zusätzlich zur Hemmung der Cyclooxygenase auch die Freisetzung proinflammatorischer Zytokine gehemmt (Chrubasik and Pollak, 2002). Bei nachgewiesener Wirksamkeit ist das Nebenwirkungsausmaß bei den pflanzlichen

Antirheumatika wesentlich geringer (Chrubasik, 2004). Pharmakologische Untersuchungen zeigten für Weidenrindenextrakte eine Hemmung der Prostaglandinsynthese, der Leukotriensynthese und der Zytokinfreisetzung zusätzlich zu einer antioxidativen Wirkung. Die Hemmung der Lipoxygenase und die antioxidative Wirkung wurde den Flavonoiden zugeschrieben (Chrubasik, 2004). Im Gegensatz zur Acetylsalicylsäure wurde durch den Weidenrindenextrakt die Thrombozytenaggregation nur geringfügig gegenüber Placebo beeinflusst (Chrubasik, 2000). Extrakte aus Teufelskrallenwurzel und Brennnesselblättern hemmten die Prostaglandin- und Leukotriensynthese sowie die Zytokinfreisetzung *in vitro*. Für einen Brennnesselblätter-Spezialextrakt konnte in einer klinischen Studie ein Wirksamkeitstrend bei Arthrose und rheumatoider Arthritis gefunden werden. Auch für Teufelskrallenwurzelextrakte wurde in klinischen Studien bei degenerativen Gelenkerkrankungen und Rückenschmerzen ein Wirksamkeitstrend gefunden, gleiches gilt für Extrakte aus Weidenrinde bei rheumatischen Beschwerden und Rückenschmerzen (Chrubasik *et al.*, 2001; Chrubasik and Pollak, 2002).

1.3.3 Phytodolor[®]

Phytodolor[®] ist ein Kombinationspräparat mit Frischpflanzenauszügen aus Eschenrinde, Zitterpappelrinde und -blättern und echtem Goldrutenkraut. Es wird angewendet bei akuten und subakuten rheumatischen Erkrankungen und Neuralgien (Fachinformation Phytodolor[®]). In pharmakologischen *In-vivo*-Modellen konnten analgetische, antiödematöse, antiphlogistische und antipyretische Wirkungen nachgewiesen werden (el Ghazaly *et al.*, 1992; Okpanyi *et al.*, 1989). In *In-vitro*-Modellen hemmt Phytodolor[®] sowohl die Cyclooxygenase als auch die Lipoxygenase und die Stoffwechselaktivität von Entzündungszellen. Zusätzlich besitzt Phytodolor[®] antioxidative Eigenschaften (von Kruedener *et al.*, 1995).

1.4 Fragestellung

Wie oben dargelegt, spielen ROS bei entzündlichen Erkrankungen des Magen-Darm-Traktes und des rheumatischen Formenkreises eine wichtige Rolle in der Entstehung oder dem Verlauf der Krankheit. Da bei diesen Erkrankungen Phytotherapeutika einen hohen Stellenwert haben, sollten bekannte Verabreichungen wie Iberogast[®] und seine Einzelextrakte, Extrakte aus Weidenrinde, Teufelskrallenwurzel und Brennnesselblättern, ferner Phytodolor[®] und seine Einzelextrakte auf ihre radikalfangenden Eigenschaften hin untersucht werden. Als Testsysteme dienen sowohl isolierte chemische Systeme (AAPH-Reaktion, Xanthin/ Xanthinoxidase-Reaktion) als auch zelluläre Systeme (Lungengewebe, Vollblut, Leukozyten), die eine Entzündungsreaktion imitierten.

Darüber hinaus sollte weiteren, für die Phytotherapie wichtigen Fragen nachgegangen werden:

1. Welche Beiträge liefern die Einzelextrakte zur Wirkung des Mehrkomponentensystems (Iberogast[®], Phytodolor[®])?
2. Kann die Wirkung eines Einzelextraktes durch einzelne Inhaltsstoffe oder Leitsubstanzen beschrieben werden (Iberogast[®])?
3. Treten bei Mehrkomponentensystemen hemmende oder aktivierende Wechselwirkungen zwischen den Einzelextrakten auf (Iberogast[®], Phytodolor[®])?
4. Kann bei Vielkomponentensystemen durch Korrelation analytischer und pharmakologischer Daten und multivariater Datenanalyse die Wirkung eines Extraktes auf Grund der Analytik voraus berechnet werden (Weidenrinde)?

2 Material

2.1 Chemikalien

AAPH (2,2'-Azobis(2-amidinopropan)dihydrochlorid, $C_8H_{18}N_6 \times 2 HCl$), Polyscience, Warrington, USA

Apigenin (4',5,7-Tetrahydroxyflavon, $C_{15}H_{10}O_5$), Roth, Karlsruhe

Apigenin-7-glucosid ($C_{21}H_{20}O_{10}$), Roth, Karlsruhe

Calciumchlorid-Dihydrat ($CaCl_2 \times 2 H_2O$), Roth, Karlsruhe

(+)-Carvon ($C_{10}H_{14}O$), Roth, Karlsruhe

Chelidonin ($C_{20}H_{19}NO_5$), Roth, Karlsruhe

Dimethylsulfoxid (DMSO, C_2H_6OS), Sigma, Deisenhofen

Dinatriumhydrogenphosphat-Dihydrat ($Na_2HPO_4 \times 2 H_2O$), Merck, Darmstadt

Ethanol absolut zur Analyse (C_2H_5OH), Merck, Darmstadt

Glucose-Monohydrat ($C_6H_{12}O_6 \times H_2O$), Roth, Karlsruhe

Glycyrrhizinsäure-Ammoniumsalz ($C_{42}H_{65}NO_{16}$), Steigerwald Arzneimittel GmbH, Darmstadt

HEPES (N-2-Hydroxyethylpiperazin-N'-2-ethansulfonsäure, $C_8H_{18}N_2O_4S$), Roth, Karlsruhe

Kaliumchlorid (KCl), Roth, Karlsruhe

Kämpferol (3,4',5,7-Tetrahydroxyflavon, $C_{15}H_{10}O_6$), Roth, Karlsruhe

Kämpferol-3,4'-O-diglucopyranosid-7-O-rhamnopyranosid, ($C_{33}H_{40}O_{20}$), Steigerwald Arzneimittel GmbH, Darmstadt

Luminol (5-Amino-1,2,3,4-tetrahydrophthalazin-1,4-dion, $C_8H_7N_3O_2$), Merck, Darmstadt

Luteolin (3',4',5,7-Tetrahydroxyflavon, $C_{15}H_{10}O_6$), Roth, Karlsruhe

Luteolin-7-glucosid ($C_{21}H_{20}O_{11}$), Roth, Karlsruhe

Magnesiumsulfat-Heptahydrat ($MgSO_4 \times 7 H_2O$), Roth, Karlsruhe

DL-Menthol ($C_{10}H_{20}O$), Roth, Karlsruhe

(-)-Menthon ($C_{10}H_{18}O$), Roth, Karlsruhe

Methanol (CH₃OH), Merck, Darmstadt

Natriumchlorid (NaCl), Merck, Darmstadt

Natriumdihydrogenphosphat-Monohydrat (NaH₂PO₄ x H₂O), Merck, Darmstadt

Natriumhydroxid (NaOH), Merck, Darmstadt

Nordihydroguarsäure (NDGA, 1,4-Bis(3,4-dihydroxyphenyl)-2,3-dimethylbutan, C₁₈H₂₂O₄), Sigma, Deisenhofen

Osthol (C₁₅H₁₆O₃), Steigerwald Arzneimittel GmbH, Darmstadt

Protopin-HCl (C₂₀H₁₉NO₅ x HCl), Extrasynthese, Frankreich

Quercetin-Dihydrat (C₁₅H₁₀O₇ x 2 H₂O), Roth, Karlsruhe

Rosmarinsäure (C₁₈H₁₆O₈), Roth, Karlsruhe

Rutin-Trihydrat (Quercetin-3-rutinosid, C₂₇H₃₀O₁₆ x 3 H₂O), Roth, Karlsruhe

Salicylsäure (2-Hydroxybenzoesäure, C₇H₆O₃), Sigma, Deisenhofen

Salzsäure (HCl), Merck, Darmstadt

Silibinin (C₂₅H₂₂O₁₀), Sigma, Deisenhofen

Trolox (6-Hydroxy-2,5,7,8-tetramethylchroman-2-carbonsäure, C₁₄H₁₈O₄), Sigma, Deisenhofen

Xanthin (2,6-Dihydroxypurin, C₅H₄N₄O₂), Sigma, Deisenhofen

Xanthinoxidase, Sigma, Deisenhofen

Zymosan A, Sigma, Deisenhofen

2.2 Extrakte

Die im Folgenden beschriebenen Extrakte wurden von der Firma Steigerwald Arzneimittel GmbH zur Verfügung gestellt.

2.2.1 Iberogast[®]

2.2.1.1 Iberogast[®] und seine Einzelextrakte

Tab. 2 und **Tab. 3** charakterisieren die Einzelextrakte und Iberogast[®] selbst. Außer beim Iberisextrakt, der ein Frischpflanzenauszug war, handelte es sich bei allen anderen Extrakten um Auszüge aus getrockneten Pflanzen. Die Extrakte wurden vor der Herstellung der Verdünnung gut geschüttelt, um eventuell vorhandenen Bodensatz zu suspendieren. Da der Iberisextrakt sehr starke Flockenbildung zeigte, wurde dort der Extrakt zusätzlich mit Hilfe eines Ultraschallbades homogenisiert. Die Verdünnung der Extrakte erfolgte mit demineralisiertem Wasser oder mit Tyrode. Genaue Angaben zu den eingesetzten Konzentrationen und den verwendeten Testsystemen finden sich bei den jeweiligen Ergebnissen.

Tab. 2: Charakterisierung der Einzelextrakte von Iberogast[®]

Extrakt	DEV	Extraktionsmittel	Abkürzung
Angelikawurzelextrakt	1:3	Ethanol 30 %	ANG
Iberis amara Extrakt	1:2	Ethanol 50 %	IBE
Kamillenblütenextrakt	1:3	Ethanol 30 %	KAM
Kümmelfrüchteextrakt	1:3	Ethanol 30 %	KÜM
Mariendistelfrüchteextrakt	1:3	Ethanol 30 %	MAR
Melissenblätterextrakt	1:3	Ethanol 30 %	MEL
Pfefferminzblätterextrakt	1:3	Ethanol 30 %	PFE
Schöllkrautextrakt	1:3	Ethanol 30 %	SCHÖ
Süßholzwurzelextrakt	1:3	Ethanol 30 %	SÜSS

Tab. 3: Zusammensetzung von Iberogast[®] (Volumenanteile)

Extrakt	Iberogast [®] (STW 5)
Angelikawurzelextrakt	10
Iberis amara Extrakt	15
Kamillenblütenextrakt	20
Kümmelfrüchteextrakt	10
Mariendistel Früchteextrakt	10
Melissenblätterextrakt	10
Pfefferminzblätterextrakt	5
Schöllkrautextrakt	10
Süßholzwurzelextrakt	10

2.2.1.2 Isolierte Inhaltsstoffe und ihr Vorkommen in den Extrakten

In **Tab. 4** werden die getesteten, isolierten Inhaltsstoffe den Extrakten zugeordnet und, falls bekannt, auch die Konzentration genannt, mit der sie im Extrakt vorkommen. Rosmarinsäure, Kämpferol und sein Glycosid, Menthol, Carvon, Chelidonin, Silibinin, Luteolin und sein Glucosid, Apigenin und sein Glucosid, Quercetin-Dihydrat, Rutin-Trihydrat und Menthon wurden in DMSO gelöst. Osthon war in Methanol, Protopin-HCl und Glycyrrhizinsäure-Ammoniumsalz waren in demineralisiertem Wasser löslich. Die weiteren Verdünnungen erfolgten mit Wasser bzw. mit Wasser-Lösungsmittel-Gemischen. Angaben zu den eingesetzten Konzentrationen und dem verwendeten Testsystem finden sich im Kapitel Ergebnisse.

Tab. 4: Charakterisierung der isolierten Inhaltsstoffe von Iberogast®
(Gehaltsangaben soweit bekannt)

Extrakt	Inhaltsstoff	Gehalt (mg Inhaltsstoff/ ml Extrakt)
MEL	Rosmarinsäure	4,50
PFE	Rosmarinsäure	1,39
	Menthol	1,23
	Menthon	
	Rutin-Trihydrat	
ANG	Osthol	0,14
KÜM	Carvon	2,79
SCHÖ	Protopin-HCl	0,05
	Chelidonin	0,48
SÜSS	Glycyrrhizinsäure- Ammoniumsalz	6,63
IBE	Kämpferol	
	Kämpferol-3,4'-O- diglucoopyranosid-7-O- rhamnopyranosid	0,10
MAR	Silibinin	2,07
KAM	Luteolin	
	Luteolin-7-glucosid	
	Apigenin	
	Apigenin-7-glucosid	
	Quercetin-Dihydrat	

2.2.1.3 Mangelvarianten und äquivalente Einzelextrakte von Iberogast®

Aus den in Kapitel 2.2.1.1 beschriebenen Einzelextrakten wurden Mangelvarianten (MV) hergestellt, die alle Komponenten von Iberogast® enthielten außer dem jeweiligen Einzelextrakt. Ferner wurde der jeweilige Einzelextrakt auf die in Iberogast® vorkommende Konzentration eingestellt (= äquivalenter Einzelextrakt = ÄE) (Tab. 5).

Tab. 5: Charakterisierung der Mangelvarianten und der äquivalenten Einzel-extrakte von Iberogast® (Volumenanteile). Bei allen Mangelvarianten und äquivalenten Einzelextrakten wurde mit Ethanol 30 % auf 100 ml aufgefüllt.

Extrakt	MV 1	MV 2	MV 3	MV 4	MV 5	MV 6
Angelikawurzelextrakt		10	10	10	10	10
Iberis amara Extrakt	15		15	15	15	15
Kamillenblütenextrakt	20	20		20	20	20
Kümmelfrüchteextrakt	10	10	10		10	10
Mariendistelfrüchteextrakt	10	10	10	10		10
Melissenblätterextrakt	10	10	10	10	10	
Pfefferminzblätterextrakt	5	5	5	5	5	5
Schöllkrautextrakt	10	10	10	10	10	10
Süßholzwurzelextrakt	10	10	10	10	10	10

Extrakt	MV 7	MV 8	MV 9	ÄE 1	ÄE 2	ÄE 3
Angelikawurzelextrakt	10	10	10	10		
Iberis amara Extrakt	15	15	15		15	
Kamillenblütenextrakt	20	20	20			20
Kümmelfrüchteextrakt	10	10	10			
Mariendistelfrüchteextrakt	10	10	10			
Melissenblätterextrakt	10	10	10			
Pfefferminzblätterextrakt		5	5			
Schöllkrautextrakt	10		10			
Süßholzwurzelextrakt	10	10				

Extrakt	ÄE 4	ÄE 5	ÄE 6	ÄE 7	ÄE 8	ÄE 9
Angelikawurzelextrakt						
Iberis amara Extrakt						
Kamillenblütenextrakt						
Kümmelfrüchteextrakt	10					
Mariendistelfrüchteextrakt		10				
Melissenblätterextrakt			10			
Pfefferminzblätterextrakt				5		
Schöllkrautextrakt					10	
Süßholzwurzelextrakt						10

Vor der Messung wurden sowohl die Mangelvarianten als auch die äquivalenten Einzelextrakte gut aufgeschüttelt und ein Aliquot von circa 2 ml entnommen. Dieses wurde zentrifugiert und es wurde nur mit dem Überstand weitergearbeitet. Alle Verdünnungen erfolgten mit demineralisiertem Wasser. Genaue Angaben zu den eingesetzten Verdünnungen und dem verwendeten Testsystem finden sich bei den jeweiligen Ergebnissen.

2.2.1.4 Alkaloidhaltiger und alkaloidabgereicherter Schöllkrautextrakt

Es standen ein alkaloidhaltiger Schöllkraut-Fluidextrakt (SCHÖ AH) (DEV 1:3, Extraktionsmittel 30%) sowie ein daraus hergestellter, alkaloidabgereicherter Extrakt (SCHÖ AF), der praktisch keine messbaren Mengen an Alkaloiden enthielt, zur Verfügung. Die Extrakte wurden vor ihrer Verwendung gut geschüttelt, um eventuell vorhandenen Bodensatz zu suspendieren. Die Verdünnungen erfolgten mit demineralisiertem Wasser. Genaue Angaben zu den eingesetzten Konzentrationen und dem verwendeten Testsystem finden sich im Kapitel Ergebnisse.

2.2.1.5 Iberisextrakte mit unterschiedlichen Inhaltsstoffen

Es standen 22 verschiedene Iberisextrakte zur Verfügung, die sich neben Spezies, Herkunft des Saatgutes, Ernte- und Extraktionsdatum vor allem hinsichtlich des Gehaltes an den Inhaltsstoffen Kämpferol-3,4'-O-diglucopyranosid-7-O-rhamnopyranosid, Cucurbitacin E und I unterschieden (**Tab. 6**). Die Extrakte wurden vor ihrer Verwendung gut geschüttelt, um eventuell vorhandenen Bodensatz zu suspendieren. Die Verdünnungen erfolgten mit demineralisiertem Wasser. Genaue Angaben zu den eingesetzten Konzentrationen, dem verwendeten Testsystem und den Gehaltsangaben der Inhaltsstoffe finden sich im Ergebnisteil.

Tab. 6: Charakterisierung der Iberisextrakte

Extrakt aus	DEV	Extraktionsmittel	Abkürzung
Iberis amara L.	1:2	Ethanol 50 %	IBE-IF1
Iberis amara L.	1:2	Ethanol 50 %	IBE-IF1a
Iberis amara L.	1:2	Ethanol 50 %	IBE-IF2
Iberis amara L.	1:2	Ethanol 50 %	IBE-IF4
Iberis amara L.	1:2	Ethanol 50 %	IBE-IF5
Iberis amara L.	1:2	Ethanol 50 %	IBE-IF8
Iberis umbellata	1:2	Ethanol 50 %	IBE-IF9
Iberis amara L.	1:2	Ethanol 50 %	IBE-IF10
Iberis amara L.	1:2	Ethanol 50 %	IBE-IF11
Iberis umbellata "Appleblossom"	1:2	Ethanol 50 %	IBE-IF14
Iberis umbellata "Dwarf Fairyländ mixed"	1:2	Ethanol 50 %	IBE-IF15
Iberis amara coronaria "Gigant Hyacinth flowered"	1:2	Ethanol 50 %	IBE-IF17
Iberis amara L.	1:2	Ethanol 50 %	IBE-IF18
Iberis amara L.	1:2	Ethanol 50 %	IBE-IF19
Iberis amara grandiflora weiss "Eisberg"	1:2	Ethanol 50 %	IBE-IF20
Iberis amara coronaria "Empress weiss"	1:2	Ethanol 50 %	IBE-IF21
Iberis umbellata "Gigant Hyacinth flowered florist type Iceberg"	1:2	Ethanol 50 %	IBE-IF22
Iberis umbellata "Super Mixture"	1:2	Ethanol 50 %	IBE-IF23
Iberis crenata	1:2	Ethanol 50 %	IBE-IF99
Iberis amara L.	1:2	Ethanol 50 %	IBE-IF100
Iberis amara L.	1:2	Ethanol 50 %	IBE-IFA
Iberis umbellata "Dwarf Fairyländ mixed"	1:2	Ethanol 50 %	IBE-IFX

2.2.2 Weidenrindenextrakte

2.2.2.1 Extrakte aus Weidenrinde, Teufelskrallenwurzel und Brennnesselblättern

Tab. 7 zeigt die verwendeten Trockenextrakte aus Weidenrinde (WEI (w), WEI (e)) (wässrig und ethanolisch), Teufelskrallenwurzel (TEUF) und Brennnesselblättern (BREN). Der Weidenrindenextrakt WEI (w) wurde in demineralisiertem Wasser oder Tyrode gelöst, der Brennnesselblätterextrakt wurde ebenfalls in demineralisiertem Wasser, allerdings unter Zusatz von Natronlauge, gelöst. Für den Extrakt aus Teufelskrallenwurzel und den Weidenrindenextrakt WEI (e) dienten entweder Ethanol 60 % bzw. 70 % oder DMSO als Lösungsmittel. Die Verdünnungen erfolgten mit demineralisiertem Wasser oder Tyrode. Die im wässrigen Weidenrindenextrakt zusätzlich enthaltenen Mengen an Hilfsstoffen (Siliciumdioxid und Magnesiumstearat) wurden bei der Einwaage berücksichtigt. Genaue Angaben zu den eingesetzten Konzentrationen und den verwendeten Testsystemen finden sich bei den jeweiligen Ergebnissen.

Tab. 7: Charakterisierung der Extrakte aus Weidenrinde, Teufelskrallenwurzel und Brennnesselblättern

Extrakt	DEV	Extraktionsmittel	Abkürzung
Weidenrindenextrakt wässrig	16-23:1	Wasser	WEI (w)
Weidenrindenextrakt ethanolisch	8-14:1	Ethanol 70 %	WEI (e)
Teufelskrallenwurzel-extrakt	4,4-5:1	Ethanol 60 %	TEUF
Brennnesselblätter-extrakt	19-33:1	Isopropanol 95 %	BREN

2.2.2.2 Durch sequentielle Extraktion erhaltene Fraktionen aus Weidenrindenextrakt

Der Weidenrindenextrakt WEI (w) wurde von Frau Dr. K. Berger-Büter, Pharmazeutische Biologie, Universität Basel, durch sequentielle Extraktion fraktioniert. Dazu wurde der Trockenextrakt in Wasser gelöst und mit Toluol extrahiert (Fraktion A). Die wässrige Phase wurde anschließend mit Ethylacetat (Fraktion B) und danach mit Butanol (Fraktion C) extrahiert. Dann wurde Ethanol zugesetzt, stark gerührt und die Suspension zentrifugiert. Die in Ethanol löslichen Bestandteile bildeten Fraktion D. Der abzentrifugierte Niederschlag stellte Fraktion E dar. Die Lösungsmittel wurden abrotiert und die Extrakte getrocknet. **Tab. 8** zeigt die Fraktionen A bis E. Für die Messungen wurden die Fraktionen A bis D in DMSO gelöst, die Fraktion E in demineralisiertem Wasser bzw. Tyrode. Zum Verdünnen diente entweder Tyrode oder demineralisiertes Wasser. Genaue Angaben zu den eingesetzten Konzentrationen und den verwendeten Testsystemen finden sich bei den jeweiligen Ergebnissen.

Tab. 8: Charakterisierung der Fraktionen A bis E aus Weidenrinde

Extrakt	Extraktionsmittel
Fraktion A	Toluol
Fraktion B	Ethylacetat
Fraktion C	Butanol
Fraktion D	Ethanol
Fraktion E	nicht extrahierbar mit den verwendeten Lösungsmitteln

2.2.2.3 Charakterisierung unterschiedlicher Weidenrindenextrakte

In **Tab. 9** werden 22 verschiedene Weidenrindenextrakte näher charakterisiert. Bei allen 22 Extrakten handelte es sich um Trockenextrakte. Sie unterschieden sich sowohl durch ihr DEV und Extraktionsmittel als auch hinsichtlich der verschiedenen Trägerstoffe (Magnesiumstearat, Siliciumdioxid, Povidon, Maltodextrin, Arabisches Gummi). Alle Extrakte wurden in Methanol (10 mg/ml) gelöst und nach 5 Minuten im Ultraschallbad für 5 Minuten bei 3000 Um-

drehungen pro Minute zentrifugiert. Nur der Überstand wurde verwendet. Die Verdünnungen wurden mit demineralisiertem Wasser hergestellt. Genaue Angaben zu den eingesetzten Konzentrationen und den verwendeten Testsystemen stehen im Ergebnissteil.

Tab. 9: Charakterisierung der Weidenrindenextrakte 3001 bis 3022

Extrakt	DEV	Extraktionsmittel	Abkürzung
Weidenrindenextrakt 3001	16-23:1	Wasser	WEI 01
Weidenrindenextrakt 3002	16-23:1	Wasser	WEI 02
Weidenrindenextrakt 3003	16-23:1	Wasser	WEI 03
Weidenrindenextrakt 3004	5-10:1	Wasser	WEI 04
Weidenrindenextrakt 3005	16-23:1	Wasser	WEI 05
Weidenrindenextrakt 3006	16-23:1	Wasser	WEI 06
Weidenrindenextrakt 3007	16-23:1	Wasser	WEI 07
Weidenrindenextrakt 3008	16-23:1	Wasser	WEI 08
Weidenrindenextrakt 3009	8-14:1	Ethanol 70 %	WEI 09
Weidenrindenextrakt 3010	16-23:1	Wasser	WEI 10
Weidenrindenextrakt 3011	16-23:1	Wasser	WEI 11
Weidenrindenextrakt 3012	16-23:1	Wasser	WEI 12
Weidenrindenextrakt 3013	6-14:1	Wasser	WEI 13
Weidenrindenextrakt 3014	6-14:1	Wasser	WEI 14
Weidenrindenextrakt 3015	5-10:1	Wasser	WEI 15
Weidenrindenextrakt 3016	16-23:1	Wasser	WEI 16
Weidenrindenextrakt 3017	16-23:1	Wasser	WEI 17
Weidenrindenextrakt 3018	8-14:1	Wasser	WEI 18
Weidenrindenextrakt 3019	16-23:1	Wasser	WEI 19
Weidenrindenextrakt 3020	16-23:1	Ethanol 70 %	WEI 20
Weidenrindenextrakt 3021	16-23:1	Ethanol 70 %	WEI 21
Weidenrindenextrakt 3022	16-23:1	Wasser	WEI 22

2.2.3 Phytodolor®

2.2.3.1 Phytodolor® und seine Einzelextrakte

Tab. 10 und **Tab. 11** charakterisieren die Einzelextrakte von Phytodolor® und Phytodolor® selbst. Bei den drei Einzelextrakten handelte es sich um Frischpflanzenauszüge aus Goldrutenkraut, Eschenrinde, Pappelrinde und Pappelblättern. Alle Extrakte wurden vor der Verwendung gut geschüttelt, um eventuell vorhandenen Bodensatz zu suspendieren. Die Verdünnung der Extrakte erfolgte mit demineralisiertem Wasser. Genaue Angaben zu den eingesetzten Konzentrationen und dem verwendeten Testsystem finden sich bei den jeweiligen Ergebnissen.

Tab. 10: Charakterisierung der Einzelextrakte von Phytodolor®

Extrakt	DEV	Extraktionsmittel	Abkürzung
Pappelrinden/-blätterextrakt	4,5:1	Ethanol 60 %	PAPP
Goldrutenkrautextrakt	4,8:1	Ethanol 60 %	GOLD
Eschenrindenextrakt	4,5:1	Ethanol 60 %	ESCH

Tab. 11: Zusammensetzung von Phytodolor® (Volumenanteile)

Extrakt	Phytodolor® (STW 1)
Pappelrinden/-blätterextrakt	60
Goldrutenkrautextrakt	20
Eschenrindenextrakt	20

2.2.3.2 Charakterisierung verschiedener Mischungen aus Pappel, Goldrutenkraut und Eschenrinde

Aus den in Kapitel 2.2.3.1 beschriebenen Einzelextrakten von Phytodolor® wurden die in **Tab. 12** genannten Mischungen PHY M1 bis PHY M21 hergestellt. Auch die Mischungen wurden vor der Verwendung immer gut geschüttelt, um eventuell vorhandenen Bodensatz zu suspendieren. Die Verdünnungen erfolgten mit demineralisiertem Wasser. Angaben zur eingesetzten Konzentration und zum Testsystem stehen im Kapitel Ergebnisse.

Tab. 12: Charakterisierung der Mischungen PHY M1 bis PHY M21 (Volumenanteile)

Extrakt	PHY M1	PHY M2	PHY M3	PHY M4	PHY M5	PHY M6	PHY M7
Pappelrinden/-blätterextrakt	100	80	80	60	60	60	40
Goldrutenkrautextrakt		20		40	20		60
Eschenrindenextrakt			20		20	40	

Extrakt	PHY M8	PHY M9	PHY M10	PHY M11	PHY M12	PHY M13	PHY M14
Pappelrinden/-blätterextrakt	40	40	40	20	20	20	20
Goldrutenkrautextrakt	40	20		80	60	40	20
Eschenrindenextrakt	20	40	60		20	40	60

Extrakt	PHY M15	PHY M16	PHY M17	PHY M18	PHY M19	PHY M20	PHY M21
Pappelrinden/-blätterextrakt	20						
Goldrutenkrautextrakt		100	80	60	40	20	
Eschenrindenextrakt	80		20	40	60	80	100

2.3 Lösungen

PBS-Puffer pH 7,4

$\text{Na}_2\text{HPO}_4 \times 2 \text{H}_2\text{O}$	8,10	mM
$\text{NaH}_2\text{PO}_4 \times \text{H}_2\text{O}$	0,74	mM
NaCl	140,01	mM
KCl	2,70	mM

mit HCl eingestellt

Tyrode-Lösung pH 7,4

NaCl	118,0	mM
HEPES	10,0	mM
KCl	5,0	mM
$\text{MgSO}_4 \times 7 \text{H}_2\text{O}$	1,2	mM
$\text{CaCl}_2 \times 2 \text{H}_2\text{O}$	2,5	mM
$\text{NaH}_2\text{PO}_4 \times \text{H}_2\text{O}$	1,5	mM
Glucose-Monohydrat	5,0	mM

mit NaOH eingestellt

Phosphatpuffer pH 7,8

$\text{Na}_2\text{HPO}_4 \times 2 \text{H}_2\text{O}$	100	mM
---	-----	----

mit HCl eingestellt

Zymosan-Suspension

200 mg Zymosan A wurden in 20 ml 0,9 %iger Kochsalzlösung suspendiert und 20 Stunden bei Zimmertemperatur gerührt. Die Zymosan-Suspension wurde homogenisiert, die Kochsalzlösung abzentrifugiert und das verbleibende Pellet mit 10 ml frischem, humanem Citratplasma 30 Minuten bei 37° Celsius inkubiert. Nach der Inkubation wurde das opsonierte Zymosan zweimal mit 0,9 %iger Kochsalzlösung gewaschen und in 8 ml Kochsalzlösung resuspendiert. Diese Suspension wurde in Proben zu 100 µl bei -20° Celsius eingefroren und am Messtag bei Raumtemperatur aufgetaut. (Bruchelt and Schmidt, 1984)

Luminol-Lösung

Es wurde eine Luminol-Lösung [11,3 mM] in DMSO hergestellt.

AAPH-Lösung

Es wurde eine AAPH-Lösung [500 mM] in demineralisiertem Wasser hergestellt. Diese wurde im Dunkeln auf Eis gelagert und nur am selben Tag verwendet.

Xanthin-Lösung 2,4 mM

Es wurde eine Xanthin-Stammlösung [240 mM] in 1 M NaOH hergestellt. Diese wurde anschließend mit demineralisiertem Wasser 1:100 verdünnt.

Xanthinoxidase-Lösung

Es wurde eine Xanthinoxidase-Lösung in demineralisiertem Wasser hergestellt, die 0,435 mU/μl enthält. Diese wurde den Tag über auf Eis und im Dunkeln gelagert.

Trolox-Stammlösung

Es wurde eine Trolox-Stammlösung [100 mM] in Methanol hergestellt. Die weiteren Verdünnungen erfolgten mit demineralisiertem Wasser.

NDGA-Stammlösung

Es wurde eine NDGA-Stammlösung [263 mM] in Ethanol 50 % hergestellt. Die weiteren Verdünnungen erfolgten mit demineralisiertem Wasser.

2.4 Biologisches Material

2.4.1 Lungenpräparate

Die Schweinelungen wurden von einer lokalen Metzgerei aus Schlachttieren gewonnen und gekühlt bis zur Präparation im Labor aufbewahrt. Die Lungenspitzen wurden abgetrennt und daraus $4 \times 4 \times 4 \text{ mm}^3$ große Gewebequader präpariert. Diese wurden in Tyrode gekühlt gelagert und 10 Minuten vor Versuchsbeginn in Tyrode bei Raumtemperatur vorinkubiert. Die Präparate wurden am Tag der Entnahme und am Tag danach für die Tests verwendet.

2.4.2 Vollblut

Jeweils am Morgen des Messtages wurde einem gesunden Spender mit Lithium-Heparin-Monovetten Blut aus der Armvene abgenommen. Nachdem durch einen Lagerungsversuch deutlich wurde, dass bei bei Raumtemperatur gelagertem Vollblut im Vergleich zu im Kühlschrank gelagertem Blut die Stimulierbarkeit nach Zymosan deutlich besser erhalten blieb, wurde das Blut den Messtag über bei Raumtemperatur aufbewahrt.

2.4.3 Leukozyten

Leukozytenkonzentrate, so genannte Buffy Coats, wurden von der Abteilung für Transfusionsmedizin des Universitätsklinikums Tübingen zur Verfügung gestellt. Ein Vorversuch zeigte, dass die Zellen bei einer Lagerung bei Raumtemperatur und in Gefäßen, in denen über den Zellen ein genügend großer Raum für Sauerstoff war, am längsten überlebten. Die Zellen wurden am ersten und am zweiten Tag nach der Blutabnahme für die Tests verwendet.

2.5 Geräte

Beckmann Microfuge E, Beckmann, Palo Alto, Californien

Biolumat LB 9500 (1 Kanal), Berthold, Wildbad

Digital pH-Meter Typ 643-1, Knick, Berlin

Hettich EBA 3S Zentrifuge, Hettich, Tuttlingen

Luminometer TD-20/20, Turner Designs, Promega, Mannheim

Metallblockthermostat DRI-Block[®] DB-3D, Techne, England

Multibiolumat LB 9505 C (6 Kanäle), Berthold, Wildbad

Refrigerated Centrifuge, Vitatron, Düsseldorf

Rotilabo-Block-Heater H250, Roth, Karlsruhe

Thermometer HI 8314 membrane pH-meter HANNA-instruments, Roth, Karlsruhe

Thermostat 5320, Eppendorf, Hamburg

Ultraschallbad Sonorex 1RK100, Bandelin Electronic, Berlin

Vortex-Genie, Bender & Hobein, Zürich, Schweiz

Waage AC 100, Mettler, Gießen

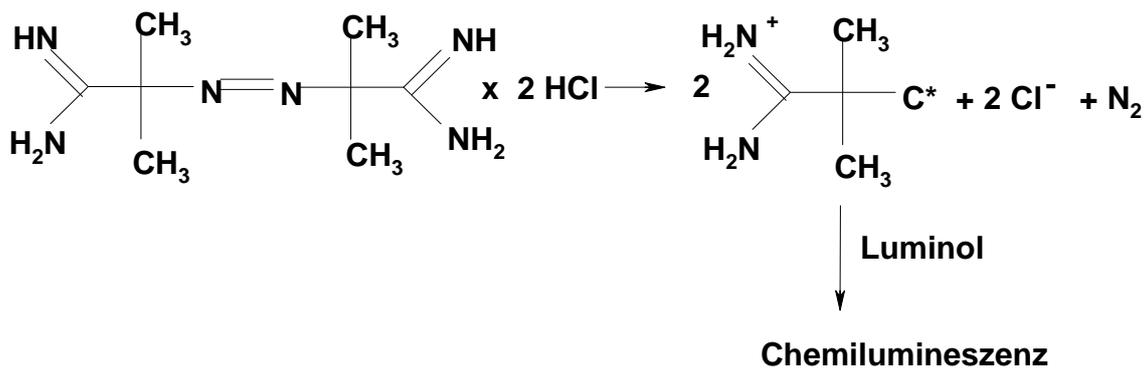
Waage BP 121 S, Sartorius, Göttingen

Wasserbad mit Thermostat, Julabo, Seelbach

3 Methoden

3.1 Radikalbildung durch die AAPH-Reaktion

Durch den spontanen Zerfall von AAPH (2,2'-Azobis(2-amidinopropan)dihydrochlorid) und Reaktion mit Sauerstoff entstehen Peroxylradikale.



Die Radikalbildung wurde durch luminolverstärkte Chemilumineszenz sichtbar gemacht und im 6-Kanal-Biolumat erfasst (Lissi *et al.*, 1992; Nader-Djalal *et al.*, 1998). Nach 10 bis 15 Minuten Reaktionszeit war eine konstante Radikalbildungsrate erreicht und die Probe wurde zugesetzt. Prooxidativ wirksame Substanzen verstärkten die Chemilumineszenz durch zusätzliche Bildung von Radikalen, antioxidativ wirksame Substanzen unterdrückten die Chemilumineszenz, indem sie Radikale abfingen (**Abb. 1**). In **Tab. 13** ist beispielhaft ein Reaktionsansatz dargestellt.

Tab. 13: AAPH-Reaktion: Reaktionsansatz

Material	Konzentration Stammlösung	Pipettier-volumen [μl]	Endkonzentration
PBS-Puffer		475	
Luminol-Lösung	11,3 mM	5	113 μM
AAPH-Lösung	500 mM	10	10 mM
Probe		10	siehe Ergebnisse

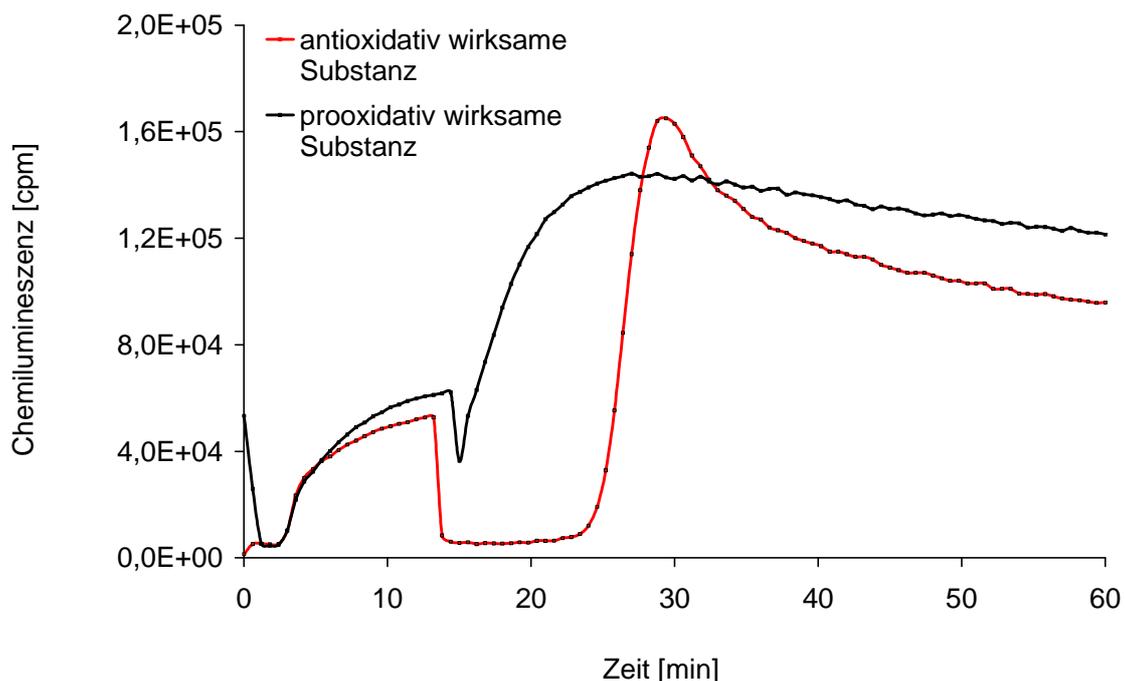


Abb. 1: **AAPH-Reaktion:** Originalaufzeichnung der Chemilumineszenzreaktion einer antioxidativ und einer prooxidativ wirksamen Substanz

Die Messzeit betrug in der Regel 60 Minuten bei 37°C, wurde aber zum Teil auch verlängert, wenn eine Substanz sehr stark wirksam war. Zur Auswertung diente die Auslöschzeit, d.h. die Zeit, die verging bis nach Zugabe der Probe die Radikalbildung wieder das ursprüngliche Niveau erreicht hatte, also das radikalfangende Potential der Probe aufgebraucht war. Die Bestimmung der Auslöschzeit ist in **Abb. 2** dargestellt. Wurden die gemessenen Auslöschzeiten gegen die Konzentration aufgetragen und die Regressionsgerade berechnet, konnte auch die Steigung der Regressionsgeraden als Maß für das radikalfangende Potential herangezogen werden.

Da die AAPH-Reaktion durch Lösungsmiteleinflüsse gestört werden kann, wurden bei allen Versuchen Leerwertreaktionen mit den vergleichbaren Lösungsmitteln durchgeführt und entsprechend berücksichtigt.

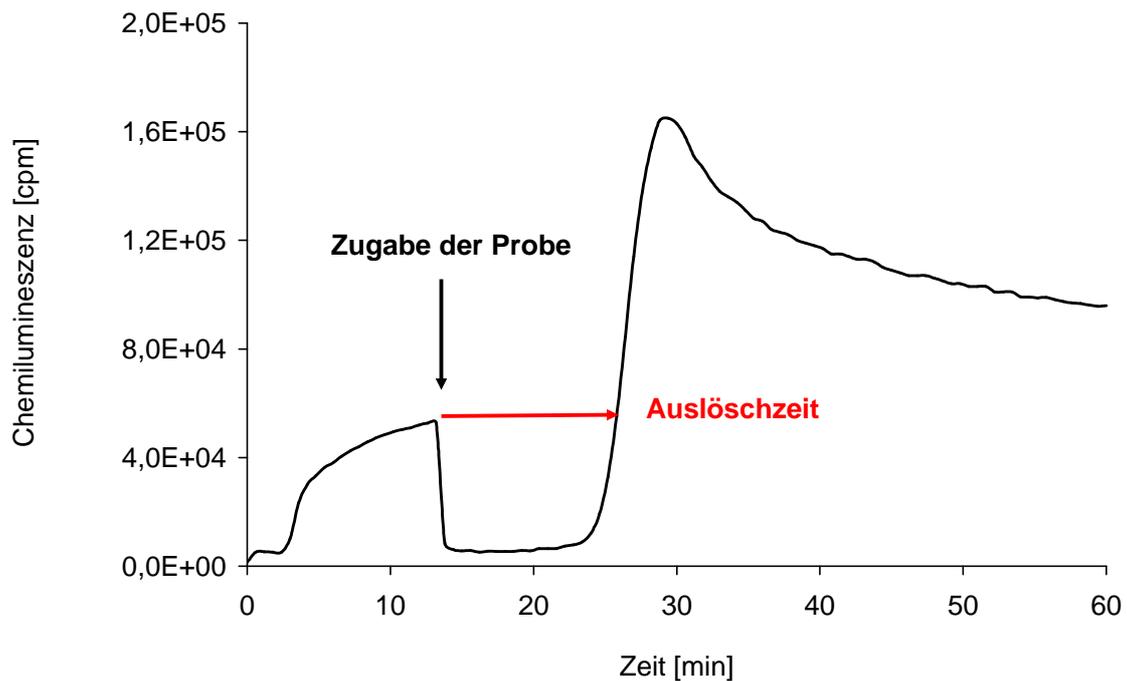
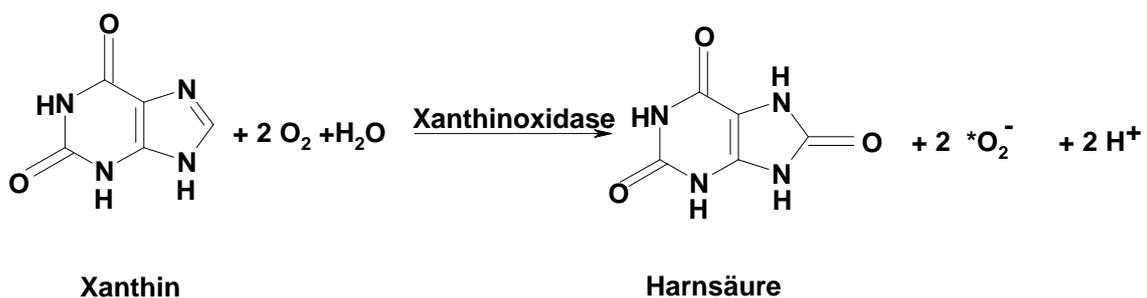


Abb. 2: AAPH-Reaktion: Bestimmung der Auslöschzeit

3.2 Radikalbildung durch die Xanthin/ Xanthinoxidase-Reaktion

Das Enzym Xanthinoxidase katalysiert die Oxidation von Hypoxanthin zu Xanthin und von Xanthin zur Harnsäure.



Dabei entstehen Superoxidradikale ($\text{O}_2^{\cdot -}$) und Hydroxylradikale (OH^{\cdot}), wobei letztere vor allem unter Bedingungen geringer Sauerstoffkonzentration gebildet werden (Kuppusamy and Zweier, 1989). Bei den hier vorliegenden Reaktionsbedingungen kann daher davon ausgegangen werden, dass hauptsächlich Superoxidradikale entstanden. Zur Sichtbarmachung der Radikalbildung diente,

wie bei der AAPH-Reaktion, die luminolverstärkte Chemilumineszenz, allerdings fand die Messung wegen der höheren Empfindlichkeit im 1-Kanal-Biolumat statt. In **Tab. 14** ist beispielhaft ein Reaktionsansatz dargestellt.

Tab. 14: Xanthin/ Xanthinoxidase-Reaktion: Reaktionsansatz

Material	Konzentration Stammlösung	Pipettier- volumen [μ l]	Endkonzentration
Phosphatpuffer		545	
Xanthin-Lösung	2,4 mM	20	80 μ M
Luminol-Lösung	11,3 mM	5	94 μ M
Probe		10	s. Ergebnisse
Xanthinoxidase-Lösung	0,435 mU/ μ l	20	14,5 mU/ml

Die Messung wurde durch Zugabe des Enzyms gestartet. Anschließend wurde die Chemilumineszenz über die Messzeit (60 sec, 37°C) integriert, wobei jeweils das entsprechende Lösungsmittel und die Probe vermessen wurden. Der Integralwert der Lösungsmittelreaktion wurde zu 100 % gesetzt und die Probe darauf bezogen (= Aktivität). Als Maß für die radikalfangende Wirkung diente die Extrakt- bzw. Substanz-Konzentration, bei der die Enzymaktivität auf 50 % gehemmt wurde (IC 50) (**Abb. 3**).

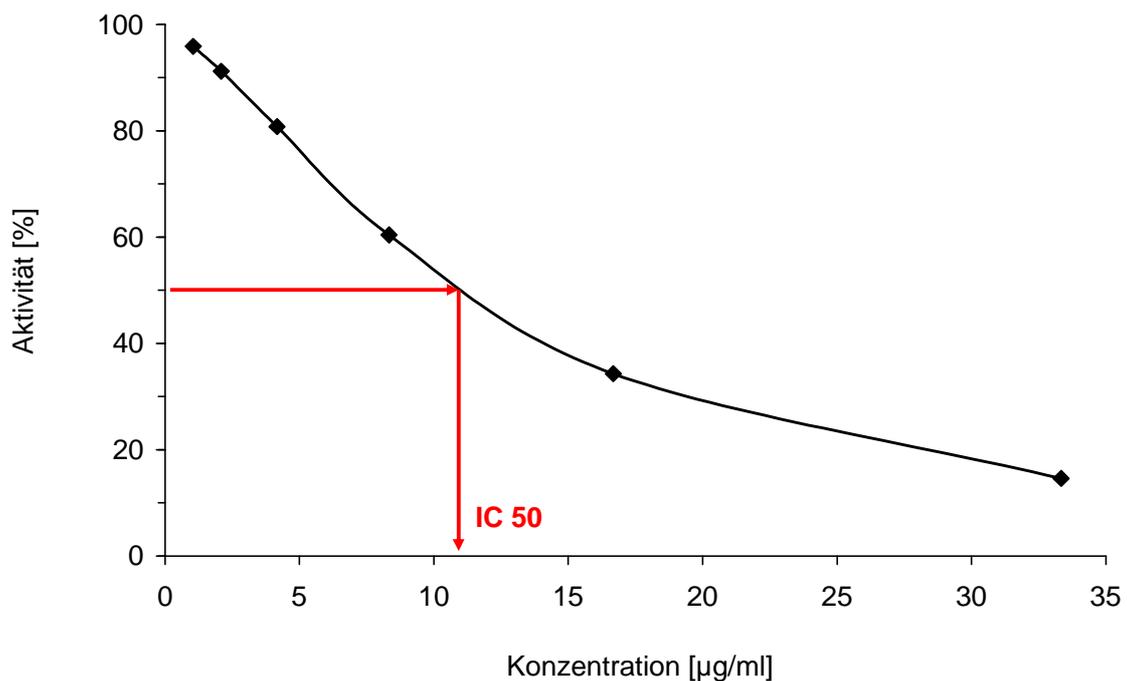


Abb. 3: Xanthin/ Xanthinoxidase-Reaktion: Bestimmung der Extraktkonzentration bei einer Enzymaktivität von 50 % (IC 50)

3.3 Radikalbildung durch Lungenmakrophagen

Die aus Schweinelunge gewonnenen Gewebepreparate wiesen auf Grund ihres Gehaltes an Alveolarmakrophagen eine deutliche Radikalproduktion auf, die der „respiratory burst“-Reaktion mit der Bildung von Superoxidradikalen, Hydroxylradikalen und Wasserstoffperoxid entspricht (Babior, 1978; Drath and Karnovsky, 1975; Fels and Cohn, 1986; Nathan *et al.*, 1980). Da die Stimulation mit Zymosan zu keiner Steigerung der Radikalbildung führte, sind die Zellen entweder durch die vorangegangene Behandlung schon maximal stimuliert worden oder im Gewebeverband vor dem Kontakt mit Zymosan geschützt. Die Radikalbildung wurde durch luminolverstärkte Chemilumineszenz sichtbar gemacht und im 6-Kanal-Biolumat (37° Celsius) für 10 Minuten integriert (= CL₀₋₁₀). Danach wurde die Probe (Extrakt bzw. Tyrode und Lösungsmittel als Kontrolle) zugesetzt und erneut die Chemilumineszenz für 10 Minuten gemessen (= CL₁₀₋₂₀) (**Abb. 4**).

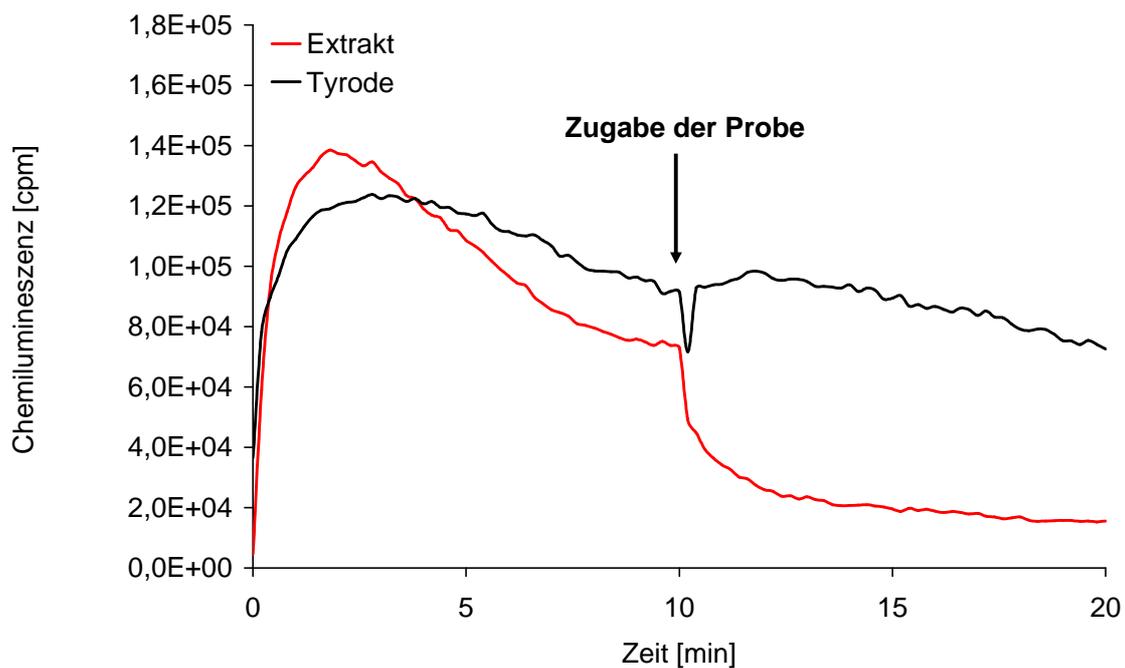


Abb. 4: Lungenmodell: Originalaufzeichnung der Chemilumineszenzreaktion

In **Tab. 15** ist beispielhaft ein Reaktionsansatz dargestellt.

Tab. 15: Lungenmodell: Reaktionsansatz

Material	Konzentration Stammlösung	Pipettier- volumen [μ l]	Endkonzentration
Tyrode (37°C)		500	
Luminol-Lösung	11,3 mM	5	111 μ M
Lungenpräparat			
Probe		5	s. Ergebnisse

Zunächst wurde der Tyrode- bzw. Lösungsmittel-Referenzwert als Quotient aus CL_{10-20} / CL_{0-10} bestimmt. Analog wurden die Effekte der Extrakte bestimmt und jeweils auf den Referenzwert (=100 %) bezogen. Als Maß für das radikal-fangende Verhalten der Extrakte diente die verbleibende Radikalproduktion in Prozent der Kontrolle.

3.4 Radikalbildung von Leukozyten in Vollblut und von isolierten Leukozyten

Zunächst wurde zur Untersuchung der radikalfangenden Eigenschaften der Extrakte heparinisiertes Vollblut verwendet, später Leukozytenpräparate (Buffy Coats). Dabei wurden die Effekte der Extrakte sowohl auf die basale als auch auf die Zymosan stimulierte „oxidative burst“-Reaktion gemessen. Die Reaktionsansätze sind in **Tab. 16** und **Tab. 17** beispielhaft dargestellt.

Tab. 16: Vollblutmodell: Reaktionsansatz

Material	Konzentration Stammlösung	Pipettier- volumen [μ l]	Endkonzentration
Tyrode (37°C)		450	
Blut		50	
Luminol-Lösung	11,3 mM	5	108 μ M
Probe		10	s. Ergebnisse
Zymosan-Suspension		10	

Tab. 17: Leukozytenmodell: Reaktionsansatz

Material	Konzentration Stammlösung	Pipettier- volumen [μ l]	Endkonzentration
Tyrode (37°C)		485	
Buffy Coat		5	
Luminol-Lösung	11,3 mM	5	111 μ M
Probe		5	s. Ergebnisse
Zymosan-Suspension		10	

Die Radikalbildung wurde durch luminolverstärkte Chemilumineszenz sichtbar gemacht und im 6-Kanal-Biolumat bei einer Messtemperatur von 37° integriert. Der Reaktionsablauf sah folgendermaßen aus: In den ersten 10 Minuten wurde die basale Radikalproduktion von Blut bzw. Leukozyten untersucht (CL₀₋₁₀). Nach 10 Minuten Messzeit wurde die Probe zugesetzt und deren Einfluss auf

die basale Radikalproduktion 10 Minuten verfolgt (CL₁₀₋₂₀). Anschließend wurde zur Stimulation der Leukozyten Zymosan zugegeben und erneut die Chemilumineszenz für 10 Minuten integriert (CL₂₀₋₃₀) (**Abb. 5, Abb. 6**).

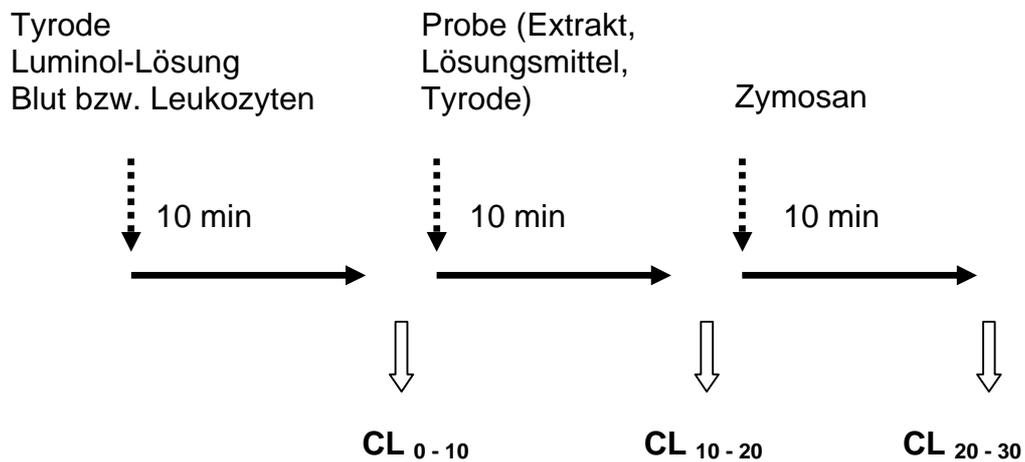


Abb. 5: Vollblutmodell bzw. Leukozytenmodell: Reaktionsablauf

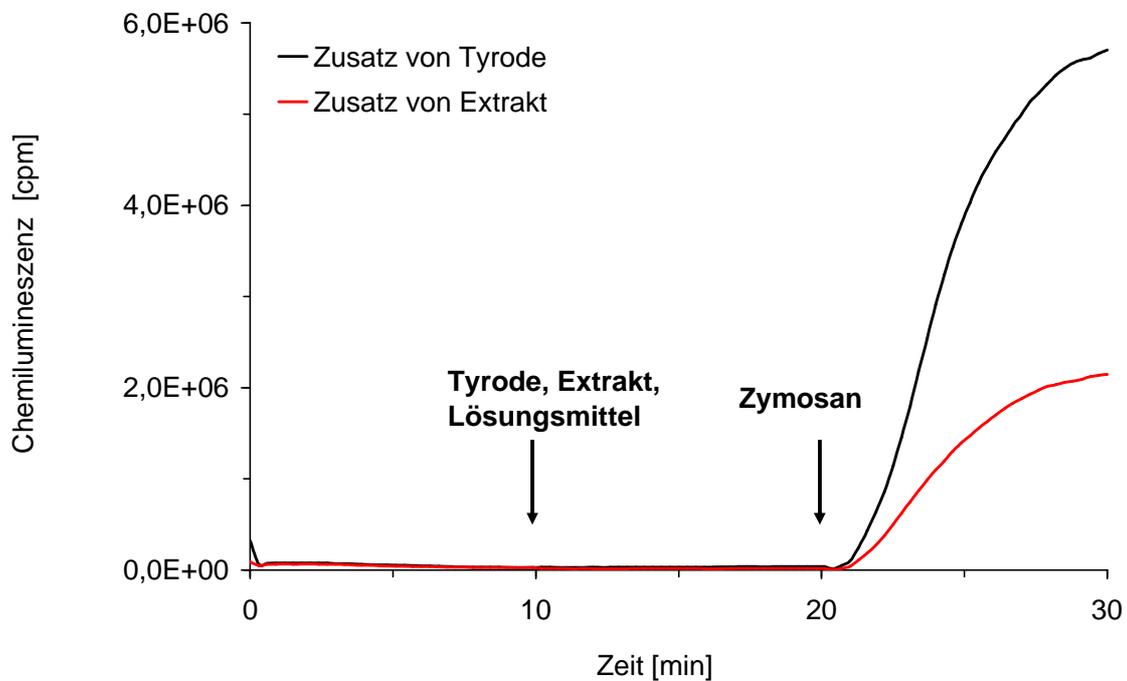


Abb. 6: Leukozytenmodell: Originalaufzeichnung der Chemilumineszenzreaktion

Zur Auswertung des Einflusses der Extrakte auf die basale Radikalproduktion wurde zunächst der Tyrode-Referenzwert als Quotient aus CL_{10-20}/CL_{0-10} bestimmt. Analog wurden die Effekte der Extrakte und der Lösungsmittel bestimmt und jeweils auf den Tyroden-Referenzwert (= 100 %) bezogen. Eventuell vorhandene Lösungsmittelinflüsse wurden berücksichtigt, sodass als Maß für die radikalfangenden Eigenschaften der Extrakte die verbleibende basale Radikalproduktion in Prozent der Kontrolle angegeben wurde. Um den Einfluss der Extrakte auf die Radikalproduktion nach Stimulation mit Zymosan zu ermitteln, wurde entsprechend wie oben beschrieben vorgegangen, d.h. dass sich der Tyroden-Referenzwert und die Effekte der Extrakte und des Lösungsmittels als Quotient aus CL_{20-30}/CL_{10-20} berechneten. Als Maß für das radikalfangende Verhalten der Extrakte wurde die Abnahme des Quotienten in Prozent der Kontrolle nach Stimulation mit Zymosan angegeben.

3.5 Korrelation von chromatographischer Analyse und radikalfangenden Eigenschaften bei verschiedenen Weidenrindenextrakten

Diese Untersuchungen entstanden in Kooperation mit Frau Dr. K. Wuthold, Pharmazeutische Chemie, Universität Tübingen (Wuthold, 2004; Wuthold *et al.*, 2004). Häufig sind bei pflanzlichen Extrakten die Wirkungen nicht auf einen einzelnen Inhaltsstoff zurückzuführen oder es sind nicht alle wirksamkeitsbestimmenden Inhaltsstoffe bekannt (Meier, 2001). Um die Weidenrindenextrakte möglichst in ihrer Gesamtheit zu charakterisieren, wurden einerseits dreidimensionale Fingerprintchromatogramme mittels HPTLC und HPLC im Wellenlängenbereich von 200 bis 400 nm aufgenommen. Andererseits wurden zwei pharmakologische Tests, die AAPH-Reaktion und die Xanthin/ Xanthinoxidase-Reaktion wie in den Kapiteln 3.1 und 3.2 beschrieben durchgeführt. Zur Charakterisierung der radikalfangenden Eigenschaften diente in der AAPH-Reaktion die Steigung der Regressionsgeraden, in der Xanthin/ Xanthinoxidase-Reaktion die relative Aktivität [%] bei einer Extraktkonzentration von 2,1 µg/ml (**Abb. 7**), wobei jeweils der gesamte Konzentrationsbereich von 0,5 µg/ml bis 167 µg/ml vermessen wurde.

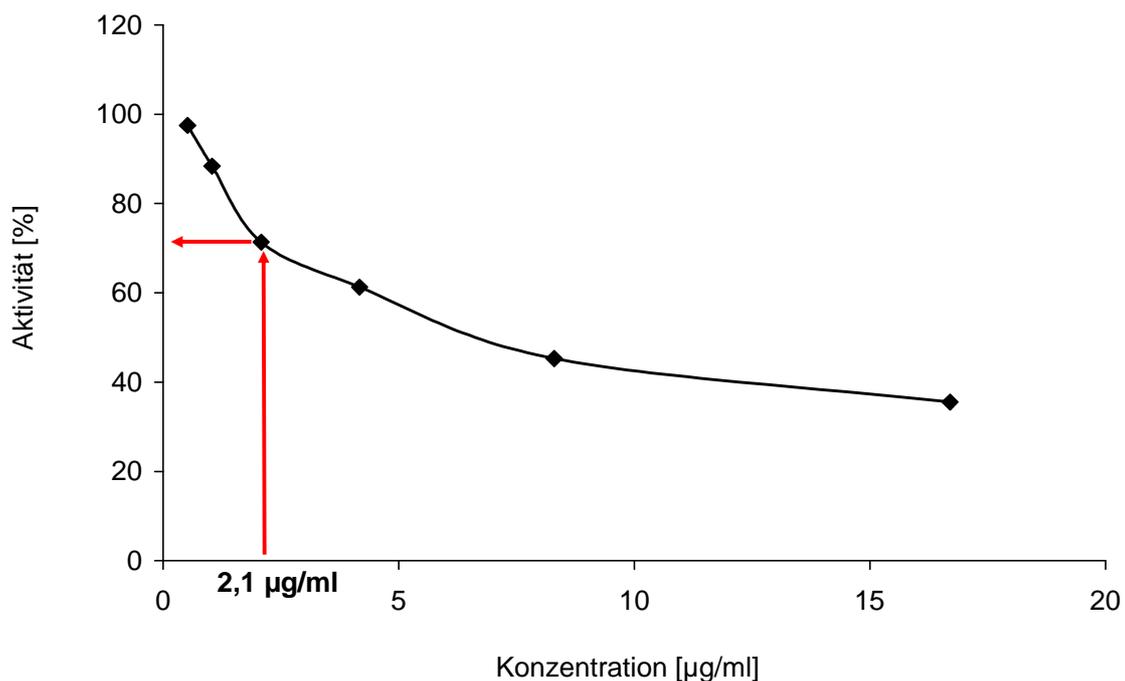


Abb. 7: Xanthin/ Xanthinoxidase-Reaktion: Bestimmung der relativen Aktivität [%] bei einer Extraktendkonzentration von 2,1 µg/ml

Von den 22 zur Verfügung stehenden Extrakten gingen die chromatographischen und pharmakologischen Daten von 19 Extrakten in die multivariaten Datenanalysen ein, die restlichen drei Extrakte (WEI 10, WEI 12, WEI 14) waren nach dem Zufallsprinzip ausgesucht worden, gingen zu keiner Zeit in die Berechnung der multivariaten Datenanalysen mit ein, sondern dienten als externes Testset zur Validierung. Mit Hilfe von PLS 1-Berechnungen (Partial Least Squares Regression) wurde überprüft, ob zwischen den chromatographischen Daten und den Ergebnissen aus den pharmakologischen Tests eine Korrelation besteht (= Kalibrierung). Die Überprüfung der Kalibrierung erfolgte sowohl durch Full Cross Validation (= interne Validierung) als auch durch das externe Testset (= externe Validierung). Ähnliche Untersuchungen wurden von Roos *et al.* bereits mit Johanniskraut durchgeführt (Roos *et al.*, 2004). Die chromatographischen Untersuchungen, die multivariaten Datenanalysen, die Kalibrierungen und Validierungen wurden von Frau Dr. K. Wuthold durchgeführt.

3.6 Statistik

Die statistische Auswertung der Versuche erfolgte mit WinSTAT für Excel und JMP Version 3.1.6.2.

Bei der Untersuchung, ob ein Zusammenhang zwischen den Inhaltsstoffen des Iberisextraktes (Kämpferol-3,4'-O-diglucopyranosid-7-O-rhamnopyranosid, Cucurbitacin E und I) und der Auslöschzeit besteht, wurde die Korrelation nach Pearson durchgeführt (siehe Kapitel 4.1.2.4).

4 Ergebnisse

4.1 Untersuchungen zur Wirkung von Iberogast[®] (STW 5) und seiner Komponenten

4.1.1 Radikalfangende Effekte von Iberogast[®] und seiner Einzelextrakte in verschiedenen Testsystemen

4.1.1.1 Radikalproduktion durch AAPH

In der AAPH-Reaktion, bei der verschiedene Arten von Radikalen entstehen, wurde zur Quantifizierung der radikalfangenden Effekte der Extrakte die Auslöschzeit verwendet (**Abb. 8**). Alle Extrakte zeigten in unterschiedlichem Ausmaß und dosisabhängig radikalfangende Eigenschaften, die in den eingesetzten Konzentrationen streng linear verliefen. Als Maß für die antioxidative Wirkung diente die Steigung der Regressionsgeraden (**Tab. 18**). Der radikalfangende Effekt nahm in folgender Reihung ab: Pfefferminzblätterextrakt (Steigung der RG 828,8), Melissenblätterextrakt, Iberogast[®], Kamillenblütenextrakt, Kümmelfrüchteextrakt, Angelikawurzelextrakt, Schöllkrautextrakt, Mariendistelfrüchteextrakt, Süßholzwurzelextrakt, Iberisextrakt (Steigung der RG 4,1). Dieselbe Reihenfolge erhält man auch, wenn direkt die Auslöschzeiten unter Berücksichtigung der eingesetzten Konzentrationen verglichen werden (**Abb. 8**). Es wurden Vergleichsmessungen mit dem Vitamin-E-Analogon Trolox durchgeführt. Dabei zeigte Trolox in Konzentrationen von 2 µM bzw. 10 µM Auslöschzeiten von 7 bzw. 29 Minuten.

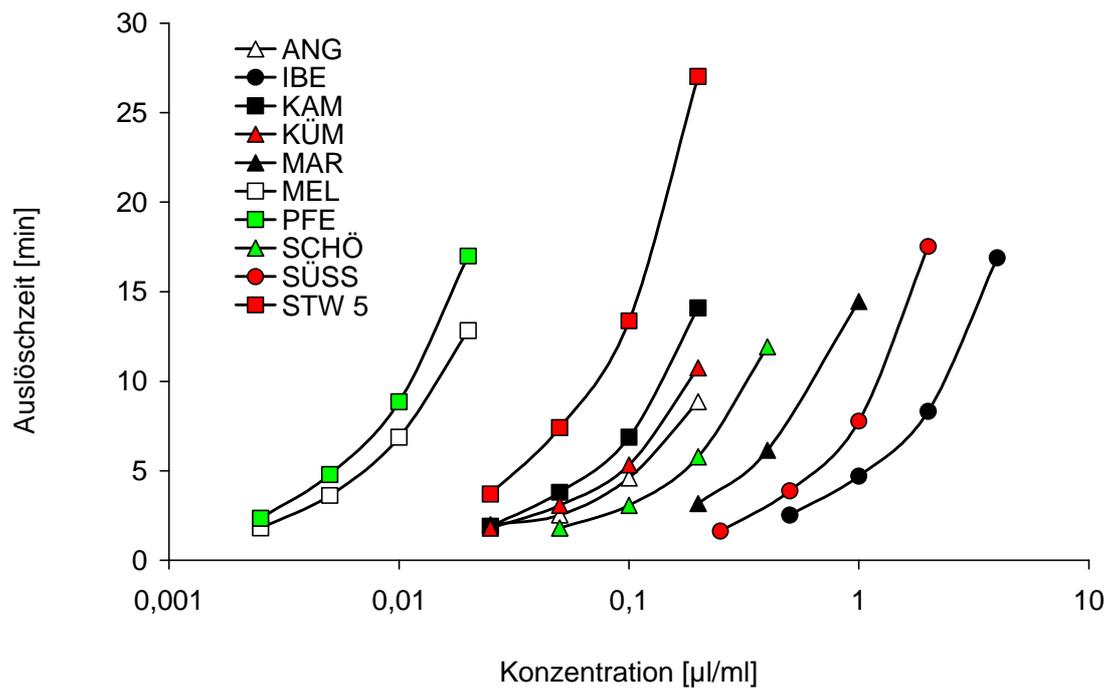


Abb. 8: **AAPH-Reaktion:** Auslöschzeiten von Iberogast® und seiner Einzel-extrakte in Abhängigkeit der Konzentration (logarithmische Darstellung), [MW, jeweils n = 2]

Tab. 18: **AAPH-Reaktion:** Vergleich der radikalfangenden Effekte von Iberogast® und seiner Einzel-extrakte, Darstellung der linearen Regression, Bestimmtheitsmaß R^2

Extrakt	Steigung der RG	R^2
ANG	40,2	0,9954
IBE	4,1	0,9989
KAM	69,2	0,9990
KÜM	51,0	0,9985
MAR	14,1	0,9998
MEL	625,5	0,9988
PFE	828,8	0,9993
SCHÖ	29,1	0,9986
SÜSS	9,1	0,9978
STW 5	132,2	0,9993

4.1.1.2 Radikalproduktion durch das Xanthin/ Xanthinoxidase-System

Mit Hilfe der Xanthin/ Xanthinoxidase-Reaktion wurde untersucht, in welchem Ausmaß Iberogast[®] und seine Einzalextrakte spezifisch Superoxid-Radikale abfangen. Alle Extrakte wurden in 6 Konzentrationen (0,17 nI/ml bis 16,7 µl/ml) eingesetzt, wobei jede Konzentration dreimal vermessen wurde. Die Standardabweichung lag im Mittel bei circa 10 % des Mittelwertes. Als Maß für die radikalfangende Wirkung diente die Konzentration bei einer Restaktivität von 50 % (IC 50), wobei die ungehemmte Reaktion zu 100 % gesetzt wurde. Wie auch bei der AAPH-Reaktion fingen die Extrakte aus Pfefferminz- und Melissenblättern und Iberogast[®] Radikale am stärksten ab – die IC 50 lagen für den Extrakt aus Pfefferminzblättern bei 0,01 µl/ml, für den Melissenblätterextrakt bei 0,016 µl/ml, für Iberogast[®] bei 0,1 µl/ml –, die Extrakte aus Süßholzwurzel und Iberis amara am schwächsten (IC 50 1,35 bzw. 1,42 µl/ml). Alle anderen Extrakte zeigten ein mittleres radikalfangendes Potential (**Abb. 9**). Trolox hatte in dieser Reaktion eine IC 50 von 5,75 µM.

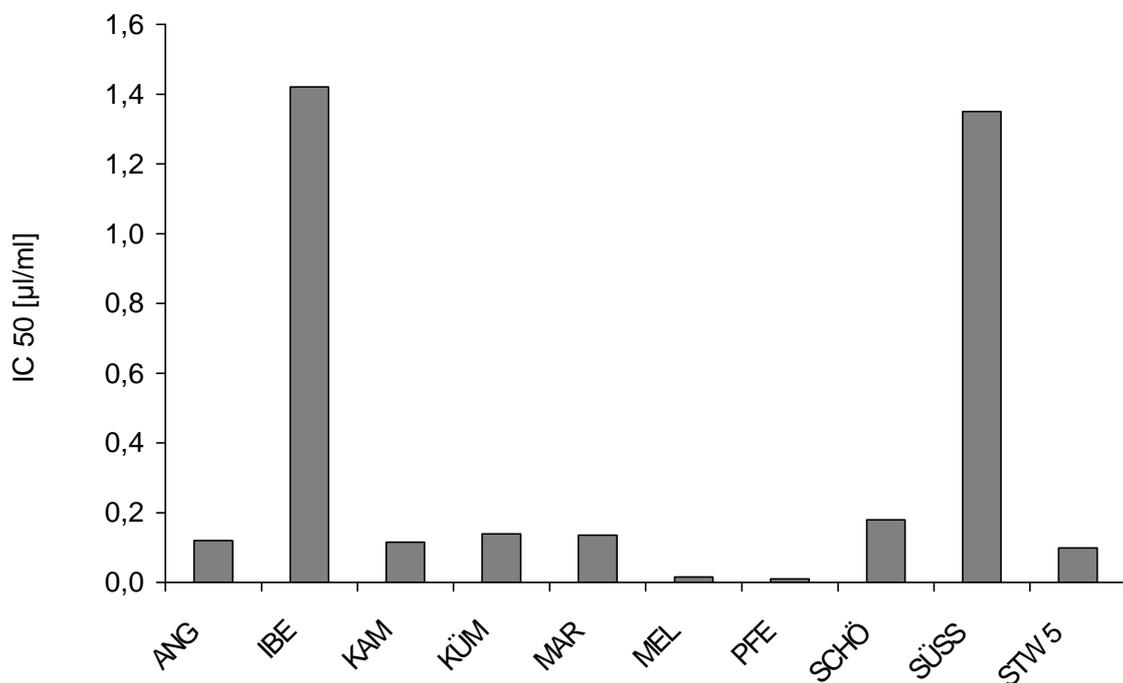


Abb. 9: Xanthin/ Xanthinoxidase-Reaktion: IC 50 von Iberogast[®] und seiner Einzalextrakte. Die Säulen stellen graphisch ermittelte Werte dar (siehe **Abb. 3**).

4.1.1.3 Radikalproduktion in exzidierten Präparaten aus Schweinelunge

Als Modell für entzündetes Gewebe dienten exzidierte Präparate aus Schweinelunge, die durch ihren hohen Gehalt an Alveolarmakrophagen ohne weitere Stimulation eine intensive Radikalproduktion aufwiesen. Alle Extrakte wurden in 4 Konzentrationen vermessen (9,8 µl/ml, 0,98 µl/ml, 0,098 µl/ml, 9,8 nl/ml), doch sind nur die Ergebnisse für die höchste Konzentration dargestellt, da in den tieferen Konzentrationen nur geringe bzw. keine Effekte gefunden wurden. Auch in diesem Testsystem, bei dem die Radikalbildung auf zelluläre Mechanismen zurück zu führen ist, zeigten alle Extrakte entsprechende Wirkungen (**Abb. 10**), wobei der Pfefferminzblätterextrakt mit einer verbleibenden Radikalproduktion von 24,2 % den stärksten Effekt, der Iberisextrakt mit 58,8 % den geringsten Effekt zeigte. Das antioxidative Potential nahm in der Reihenfolge Pfefferminz-, Melissenblätterextrakt, Iberogast[®], Kamillenblütenextrakt, Extrakte aus Angelikawurzel, Kümmelfrüchten, Mariendistelfrüchten, Süßholzwurzel, Schöllkraut und Iberis amara ab.

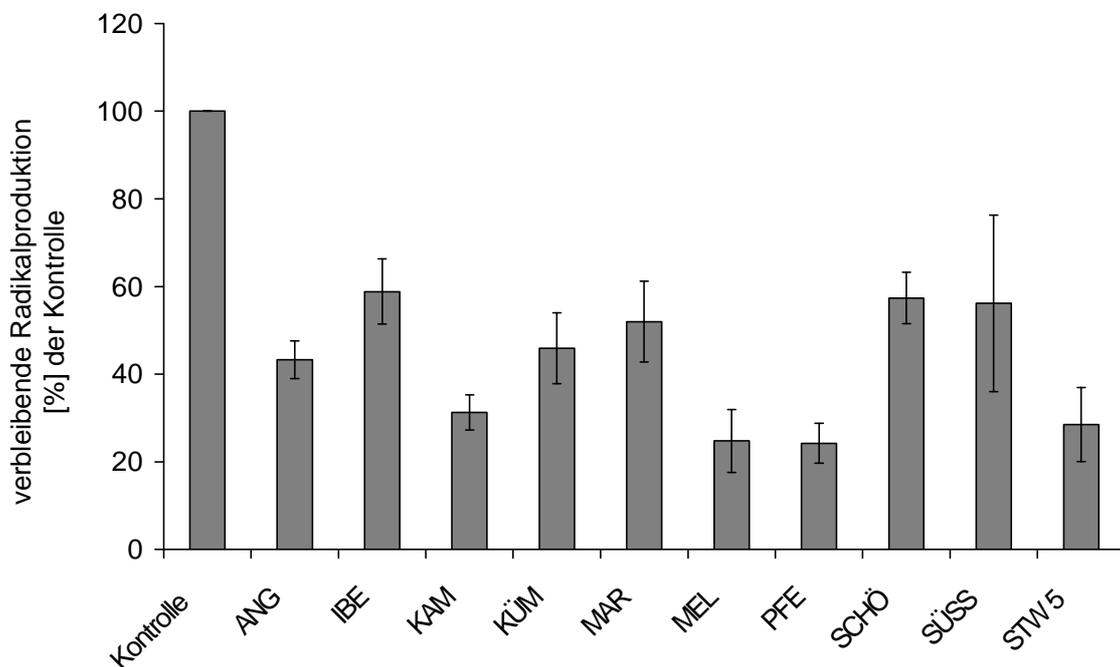


Abb. 10: Lungenmodell: Effekte von Iberogast[®] und seiner Einzelextrakte auf die Radikalbildung durch Lungengewebe
Endkonzentration der Extrakte 9,8 µl/ml
[MW, SD, jeweils n = 3 bis 4]

Die stark antioxidativ wirksame Substanz Nordihydroguarsäure zeigte in einer Konzentration von 25 μM eine verbleibende Radikalproduktion von 59 %.

4.1.1.4 Radikalproduktion von isolierten Leukozyten

Zur Untersuchung, ob und in welchem Ausmaß Iberogast[®] und seine Einzel-extrakte auch bei humanen Leukozyten Radikale abfangen oder die Radikalproduktion beeinflussen, wurden die Extrakte an Buffy-Coat-Zellen getestet. Die Extrakte wurden in einer einheitlichen Endkonzentration von 3,3 $\mu\text{l/ml}$ vermessen.

Zunächst wurde der Einfluss der Extrakte auf die basale Radikalproduktion der Leukozyten untersucht: Der Extrakt aus Kamillenblüten war am wirksamsten und senkte die verbleibende basale Radikalproduktion auf 16,6 %, gefolgt vom Pfefferminz- (18,5 %) und Melissenblätterextrakt (26,0 %) und Iberogast[®] (27,0 %). Die Extrakte aus Angelikawurzel, Mariendistelfrüchten, Süßholzwurzel und Schöllkraut waren weniger stark wirksam, zeigten aber noch deutlich antioxidative Effekte. Dagegen hatten die Extrakte aus Iberis amara und Kümmel kaum noch Effekte auf die Radikalproduktion (verbleibende Radikalproduktion 85,1 bzw. 87,4 %) (**Abb. 11**). Das Vitamin-E-Analogon Trolox verringerte in einer Konzentration von 10 μM die verbleibende basale Radikalproduktion auf 74,1 %.

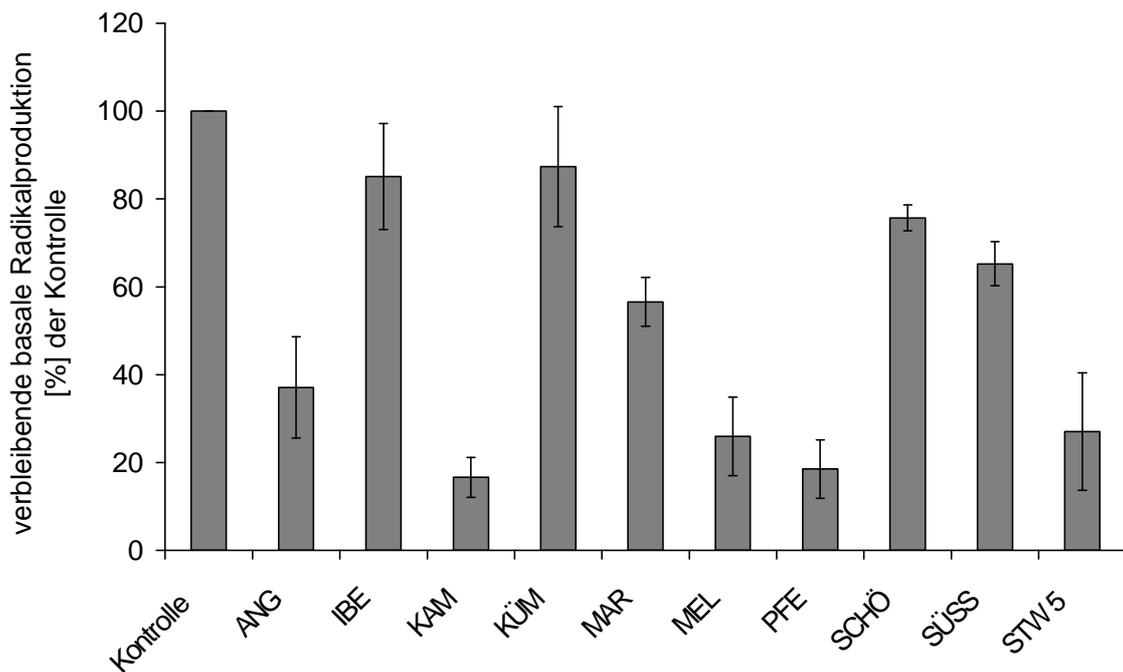


Abb. 11: **Leukozytenmodell:** Einfluss von Iberogast[®] und seiner Einzelextrakte auf die basale Radikalproduktion von Leukozyten
Endkonzentration der Extrakte 3,3 µl/ml
[MW, SD, n = 4]

Im zweiten Teil der Untersuchung wurden die Zellen in Gegenwart der Extrakte mit Zymosan stimuliert, wodurch die anschließende Steigerung der Radikalbildung beeinflusst wurde. Bei den Extrakten aus Pfefferminzblättern, Melissenblättern, Iberogast[®] und Iberis amara wurde die verbleibende Stimulierbarkeit auf unter 50 % gesenkt. Bei den übrigen Extrakten lag sie zwischen 50 und 73 % (**Abb. 12**). Trolox 10 µM setzte die verbleibende Stimulierbarkeit auf 61,7 % herab.

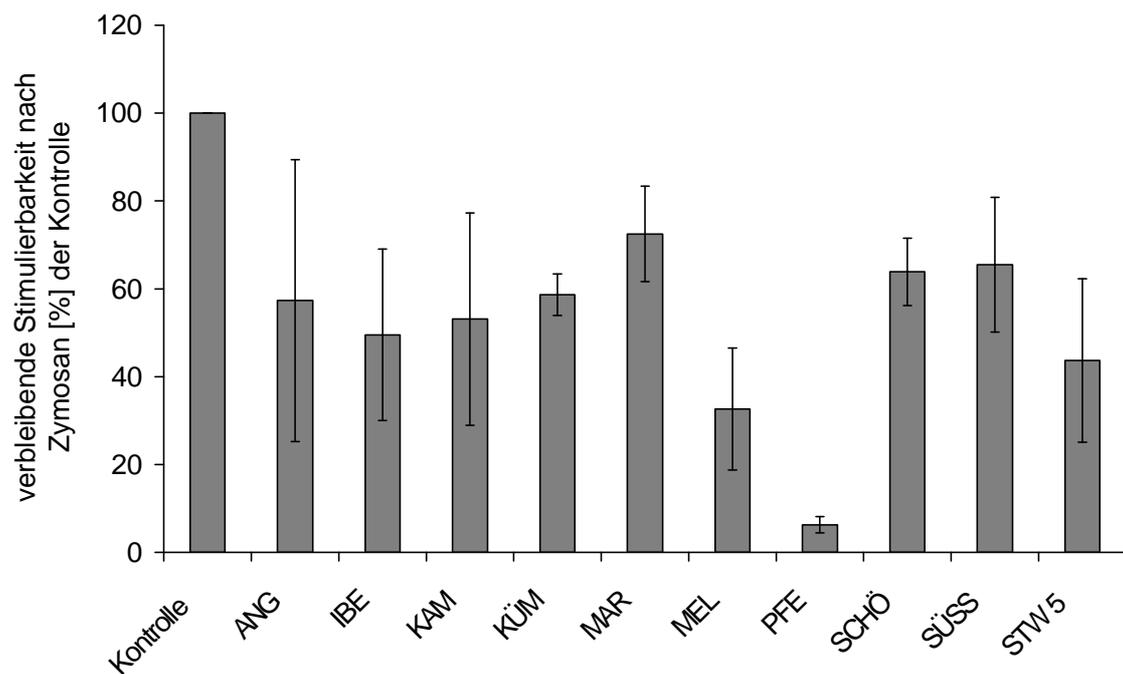


Abb. 12: **Leukozytenmodell:** Einfluss von Iberogast® und seiner Einzelextrakte auf die Radikalproduktion von Leukozyten nach Stimulation mit Zymosan
Endkonzentration der Extrakte 3,3 µl/ml
[MW, SD, n = 4]

4.1.2 Radikalfangende Eigenschaften isolierter, in den Extrakten enthaltener Inhaltsstoffe mittels der AAPH-Reaktion

In den folgenden Abschnitten soll dargestellt werden, welchen Anteil bestimmte isolierte Inhaltsstoffe der Einzelextrakte an dem gesamten radikalfangenden Effekt der Einzelextrakte haben. Zur Untersuchung der radikalfangenden Eigenschaften diente die AAPH-Reaktion.

4.1.2.1 Vergleich der radikalfangenden Eigenschaften von isolierten Inhaltsstoffen und den der dazugehörigen Extrakte

Von einigen Einzelextrakten des Iberogasts[®] standen genaue Angaben bezüglich der Konzentration isolierter Inhaltsstoffe in den Extrakten zur Verfügung (**Tab. 4**). Vermessen wurden jeweils die Einzelextrakte und die dazugehörigen Lösungen der isolierten Inhaltsstoffe mit derselben Konzentration, in der diese in den Extrakten vorkommen. Alle Einzelextrakte zeigten die schon bekannten Auslöschzeiten in der AAPH-Reaktion. Die isolierten Inhaltsstoffe dagegen zeigten antioxidative oder prooxidative Effekte, oder waren in dieser Reaktion wirkungslos:

Zu den antioxidativ wirksamen Inhaltsstoffen gehörten die Rosmarinsäure (Inhaltsstoff des Melissen- und Pfefferminzblätterextraktes) und Kämpferol (Inhaltsstoff des Iberisextraktes). Stellvertretend zeigt **Abb. 13** die Originalaufzeichnung des Melissenblätterextraktes (Auslöschzeit 13,5 min) im Vergleich mit Rosmarinsäure (Auslöschzeit 5,6 min).

Keine radikalfangenden Effekte wurden dagegen bei Menthol (Inhaltsstoff des Pfefferminzblätterextraktes), Osthol (Inhaltsstoff des Angelikawurzelextraktes), Carvon (Inhaltsstoff des Kümmelfrüchteextraktes), Protopin-HCl (Inhaltsstoff des Schöllkrautextraktes), Glycyrrhizinsäure-Ammoniumsalz (Inhaltsstoff des Süßholzwurzelextraktes) und Kämpferol-3,4'-O-diglucoopyranosid-7-O-rhamnopyranosid (Kämpferol-dGR) (Inhaltsstoff des Iberisextraktes) gefunden. Als Beispiel ist die Originalaufzeichnung des Kümmelfrüchteextraktes und Carvon dargestellt (**Abb. 14**).

Das prooxidative Verhalten von Chelidonin zeigt **Abb. 15**, wohingegen der Schöllkrautblätterextrakt deutlich Radikale abfängt. Auch beim Vergleich von Silibinin und dem Extrakt aus Mariendistelfrüchten konnte ein leicht prooxidatives Verhalten von Silibinin gefunden werden.

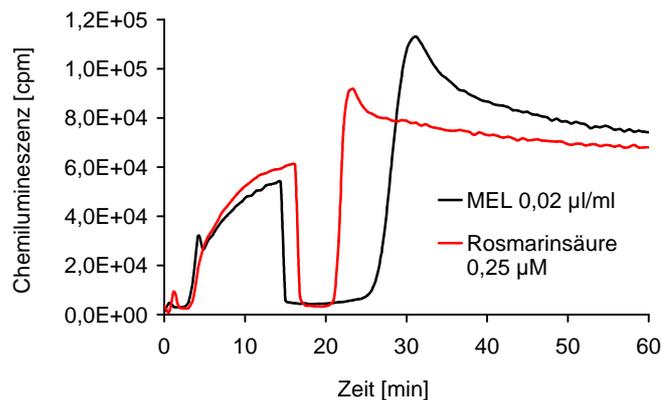


Abb. 13: AAPH-Reaktion: Originalaufzeichnung der Chemilumineszenzreaktion: Melissenblätterextrakt und Rosmarinsäure in äquivalenter Konzentration

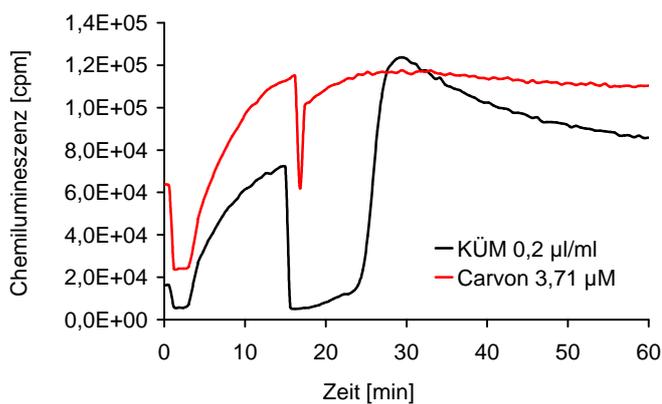


Abb. 14: AAPH-Reaktion: Originalaufzeichnung der Chemilumineszenzreaktion: Kümmelfrüchteextrakt und Carvon in äquivalenter Konzentration

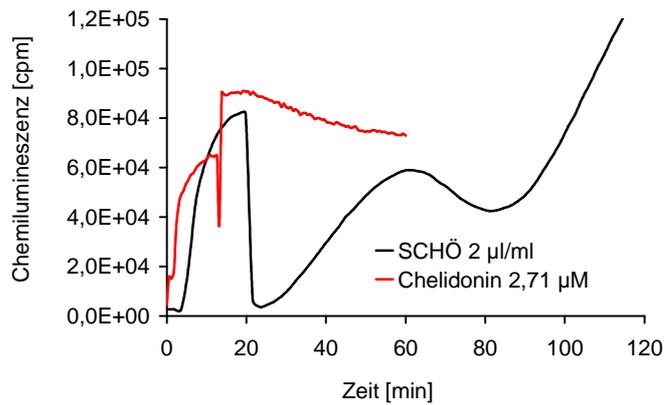


Abb. 15: AAPH-Reaktion: Originalaufzeichnung der Chemilumineszenzreaktion: Schöllkrautextrakt und Chelidonin in äquivalenter Konzentration

Bei allen diesen Beispielen wurde deutlich, dass jeweils der gesamte radikal-fangende Effekt der Extrakte nicht durch einen einzelnen Inhaltsstoff erklärt werden kann, sondern dass sich die Effekte der verschiedenen Extraktkomponenten zu ihrer Gesamtwirkung addieren.

4.1.2.2 Radikalfangende Eigenschaften verschiedener, isolierter Inhaltsstoffe

Für einige isolierte Inhaltsstoffe der Einzelnextrakte des Iberogasts[®] (Strukturformeln im Anhang) wurden die radikalfangenden Eigenschaften in verschiedenen Konzentrationen in der AAPH-Reaktion untersucht. Wie in **Abb. 16** dargestellt, fing Kämpferol etwa gleich stark Radikale ab wie Trolox. Die Flavonoide Luteolin, Luteolin-7-glucosid, Rutin-Trihydrat, Quercetin-Dihydrat und das Phenylpropanderivat Rosmarinsäure waren deutlich stärker antioxidativ wirksam als Trolox.

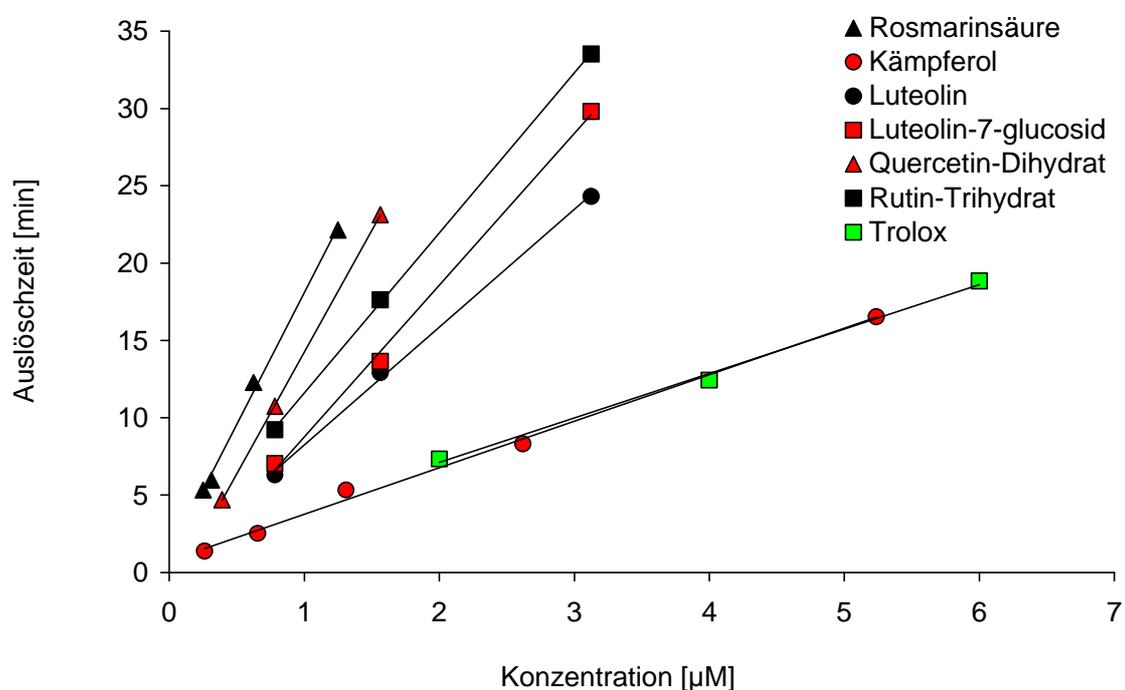


Abb. 16: **AAPH-Reaktion:** Auslöschzeiten einiger isolierter Inhaltsstoffe der Einzelnextrakte von Iberogast[®] [MW, n = 2]

Menthon (Endkonzentration 25 µM bis 100 µM), Menthol (0,16 µM bis 1,57 mM), Osthon (0,11 µM bis 11,09 µM) und Kämpferol-3,4'-O-diglucopyranosid-7-O-rhamnopyranosid (Kämpferol-dGR) (0,26 µM bis 5,24 µM) hatten in den getesteten Konzentrationen keinen Einfluss auf die Radikalproduktion.

Bei dieser Untersuchung wurde ebenfalls deutlich, dass Unterschiede zwischen den jeweiligen Flavonoiden und ihren Glycosiden bezüglich der radikalfangenden Effekte bestehen: So zeigte Kämpferol eine deutliche Auslöschzeit, wohingegen Kämpferol-dGR keinen antioxidativen Effekt hatte (beide gemessen in einer Endkonzentration von $2,6 \mu\text{M}$) (**Abb. 17**). Apigenin (Endkonzentration $100 \mu\text{M}$) reagierte in der AAPH-Reaktion deutlich prooxidativ, Apigenin-7-glycosid (Endkonzentration $100 \mu\text{M}$) fing Radikale ab und unterdrückte die Chemilumineszenz während der gesamten 60 Minuten (**Abb. 18**). Luteolin und sein Glucosid (Endkonzentration $3,1 \mu\text{M}$) zeigten beide radikalfangende Effekte (**Abb. 19**).

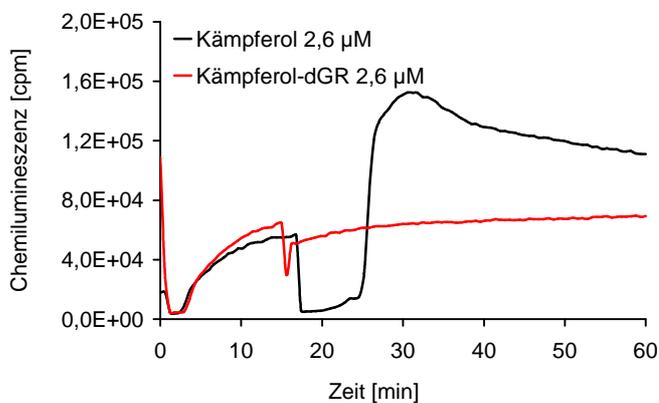


Abb. 17: AAPH-Reaktion: Originalaufzeichnung der Chemilumineszenzreaktion: Kämpferol und Kämpferol-dGR (Endkonzentration $2,6 \mu\text{M}$)

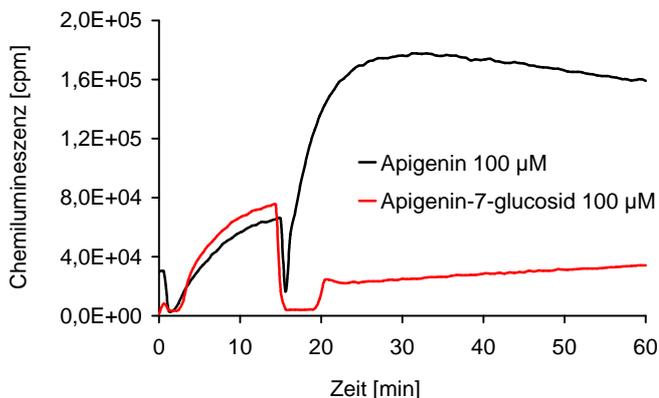


Abb. 18: AAPH-Reaktion: Originalaufzeichnung der Chemilumineszenzreaktion: Apigenin und Apigenin-7-glycosid (Endkonzentration $100 \mu\text{M}$)

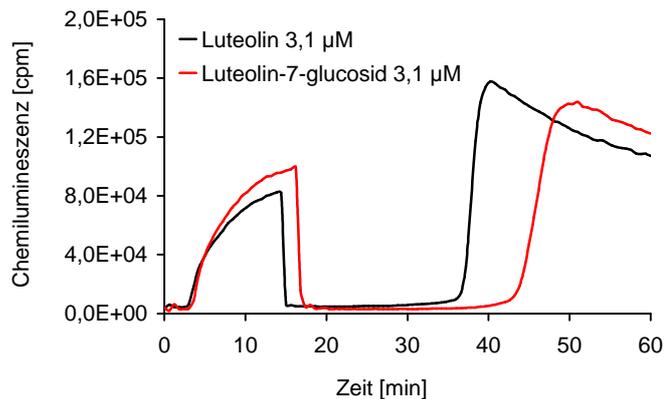


Abb. 19: AAPH-Reaktion: Originalaufzeichnung der Chemilumineszenzreaktion: Luteolin und Luteolin-7-glucosid (Endkonzentration 3,1 µM)

4.1.2.3 Einflüsse der Alkaloide im Schöllkrautextrakt auf dessen radikalfangende Eigenschaften

Um den Einfluss der Alkaloide im Schöllkrautextrakt auf den radikalfangenden Effekt des Extraktes zu untersuchen, standen folgende Schöllkrautextrakte zur Verfügung: ein flüssiger, alkaloidhaltiger Schöllkrautextrakt (SCHÖ AH) und ein flüssiger, alkaloidfreier Schöllkrautextrakt (SCHÖ AF). Beide Extrakte fingen in der AAPH-Reaktion Radikale ab, wobei der alkaloidabgereicherte Extrakt etwas weniger wirksam (Steigung der RG 39,5) war als der flüssige, alkaloidhaltige Schöllkrautextrakt (Steigung der RG 43,2) (**Abb. 20**). Somit könnten also Alkaloide zum radikalfangenden Effekt des Schöllkrautextraktes leicht beitragen.

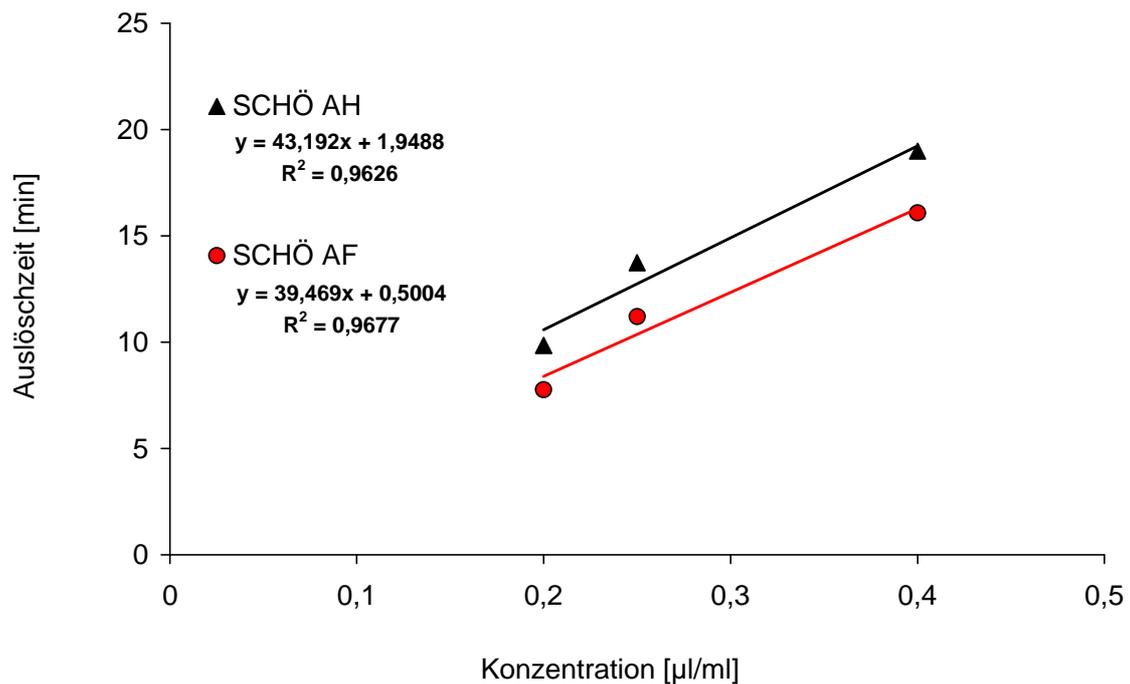


Abb. 20: **AAPH-Reaktion:** Vergleich von einem alkaloidhaltigen mit einem alkaloid-abgereicherten Extrakt aus Schöllkraut [MW, n = 2, RG]

4.1.2.4 Einfluss des Gehaltes an Kämpferol und Cucurbitacin E und Cucurbitacin I in Iberisextrakten auf die radikalfangenden Eigenschaften von Iberisextrakten

Es standen 22 verschiedene Iberisextrakte, bei denen jeweils die Mengen an den enthaltenen Inhaltsstoffen Kämpferol-3,4'-O-digluco-pyranosid-7-O-rhamnopyranosid (Kämpferol-dGR), Cucurbitacin E und I bekannt waren, zur Verfügung. Bei diesen Extrakten wurden die Auslöschzeiten in der AAPH-Reaktion bei einer Konzentration von 4 µl/ml untersucht. Jeder Extrakt wurde zweimal vermessen. In **Tab. 19** ist zu sehen, dass die verschiedenen Iberisextrakte, die sich hinsichtlich Spezies, Herkunft, Erntedatum der Pflanzen und Extraktionszeitpunkt unterschieden, auch deutliche Unterschiede in den Auslöschzeiten aufwiesen. Anschließend wurden die erhaltenen Auslöschzeiten mit den Gehalten der einzelnen Inhaltsstoffe korreliert. Die berechneten Korrelationskoeffizienten (r) lagen für Kämpferol-dGR bei -0,2665, für Cucurbitacin E bei -0,0437 und für Cucurbitacin I bei -0,2344. Da keine Korrelationen festgestellt werden konnten, dürften für die antioxidativen Eigenschaften dieser

Extrakte nicht die genannten Inhaltsstoffe verantwortlich sein. In den Kapiteln 4.1.2.1 und 4.1.2.2 konnte bereits gezeigt werden, dass Kämpferol-dGR keine radikalfangenden Eigenschaften besaß, was die fehlende Korrelation zwischen Kämpferol-dGR und den Auslöschzeiten bestätigt.

Tab. 19: AAPH-Reaktion: Versuchsergebnisse der Iberisextrakte und Korrelation der Auslöschzeiten mit den Inhaltsstoffen
Endkonzentration der Extrakte 4 µl/ml
[Korrelation nach Pearson, $p > 0,1$]

Extrakt	Kämpferol-dGR [µg/ml]	Cucurbitacin E [µg/ml]	Cucurbitacin I [µg/ml]	Auslöschzeit [min]
IBE-IF1	133,71	44,84	26,12	24,0
IBE-IF1a	114,73	40,24	24,24	21,0
IBE-IF2	87,51	35,60	31,85	33,1
IBE-IF4	150,75	32,88	22,22	30,5
IBE-IF5	117,67	36,09	25,96	31,3
IBE-IF8	0,00	31,82	27,00	27,2
IBE-IF9	100,57	30,95	24,82	21,0
IBE-IF10	0,00	41,62	28,77	51,9
IBE-IF11	84,94	44,10	34,96	24,4
IBE-IF14	0,00	66,01	121,64	29,9
IBE-IF15	0,00	48,74	3,75	40,7
IBE-IF17	126,82	42,76	31,04	25,1
IBE-IF18	119,17	34,04	25,58	28,4
IBE-IF19	138,89	30,46	27,43	35,7
IBE-IF20	119,14	27,00	21,87	25,8
IBE-IF21	134,56	29,31	20,70	30,8
IBE-IF22	106,49	33,24	20,36	26,5
IBE-IF23	0,00	71,06	1,00	31,4
IBE-IF99	0,00	29,27	12,34	38,4
IBE-IF100	112,89	37,82	25,66	29,4
IBE-IFA	60,49	57,47	57,85	26,1
IBE-IFX	0,00	48,17	56,67	11,6
Korrelation				
r	-0,2665	-0,0437	-0,2344	

4.1.3 Untersuchungen zu pharmakologischen Wechselwirkungen zwischen den Einzelextrakten in Iberogast[®]

Mit Hilfe der AAPH-Reaktion, des In-vitro-Inflammodells aus Schweineleukozyten und des Leukozytenmodells sollte ermittelt werden, ob Wechselwirkungen zwischen den Einzelextrakten die Wirkung von Iberogast[®] aktivierend oder hemmend modulieren können.

4.1.3.1 Untersuchung mittels der AAPH-Reaktion

Berechnete man die Auslöschzeit von Iberogast[®] als Summe der Auslöschzeiten der Einzelextrakte in den entsprechenden Verdünnungen, so erhielt man eine Auslöschzeit von 26,6 min (siehe Abschnitt 4.1.1.1). Der gemessene Wert bei dieser Verdünnung (1:5000) betrug 26,4 min. Diese Ergebnisse deuteten auf additive Wechselwirkungen zwischen den Einzelextrakten hin. Um dies genauer zu untersuchen, wurden für jeden Einzelextrakt jeweils Iberogast[®] selbst, eine Mangelvariante von Iberogast[®] (MV), die alle Komponenten außer eben diesen Einzelextrakt enthielt und der Einzelextrakt in der entsprechenden in Iberogast[®] vorkommenden Konzentration (= äquivalenter Einzelextrakt = ÄE) getestet. Diese Lösungen wurden in einer Verdünnung von 1 zu 5000 je dreimal vermessen. Zur besseren Übersicht wurden die Auslöschzeit von Iberogast[®] zu 100% gesetzt und die Auslöschzeiten der Mangelvarianten und der äquivalenten Einzelextrakte darauf bezogen. In **Abb. 21** sieht man, dass die Summen der Auslöschzeiten aus äquivalenten Einzelextrakten und Mangelvarianten in etwa die Auslöschzeit von Iberogast[®] ergeben. Alle Einzelextrakte leisten einen Beitrag zur Wirkung von Iberogast[®], wobei die Daten auf additive Wechselwirkungen deuten.

Außerdem wurde deutlich, dass die antioxidative Wirkung in Iberogast[®] hauptsächlich durch die Extrakte aus Melissenblättern, Pfefferminzblättern und Kamillenblüten verursacht wurde.

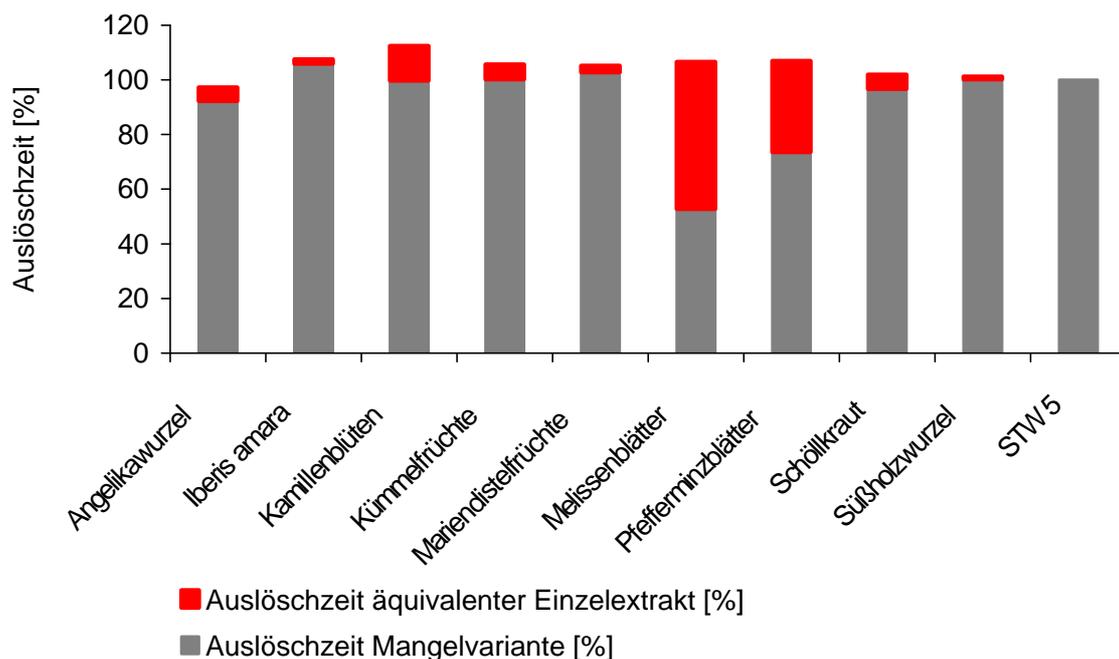


Abb. 21: AAPH-Reaktion: Gegenüberstellung der Auslöschzeit von Iberogast[®] und den Auslöschzeiten der äquivalenten Einzextracte und der Mangelvarianten für die Einzextracte in Iberogast[®] [MW, n = 3]

4.1.3.2 Untersuchung mittels des Lungenmodells

Mittels des Lungentestsystems sollten ebenfalls die Wechselwirkungen zwischen den Einzextracten in Iberogast[®] untersucht werden. Wie in Kapitel 4.1.1.3 dargestellt, wurden alle Extrakte in einer Konzentration von 9,8 µl/ml mindestens dreimal vermessen und die verbleibenden Radikalproduktionen in Prozent der Kontrolle ermittelt. Der Effekt von Iberogast[®] wurde einerseits als Summe der Effekte der Einzextracte, entsprechend den Konzentrationsverhältnissen in Iberogast[®], berechnet, andererseits direkt gemessen. Der berechnete Wert betrug 44,2 %, der gemessene 28,5 %. Dieses Ergebnis deutet darauf hin, dass die antioxidative Wirkung der Mischung aktivierend verstärkt wird (**Abb. 22**).

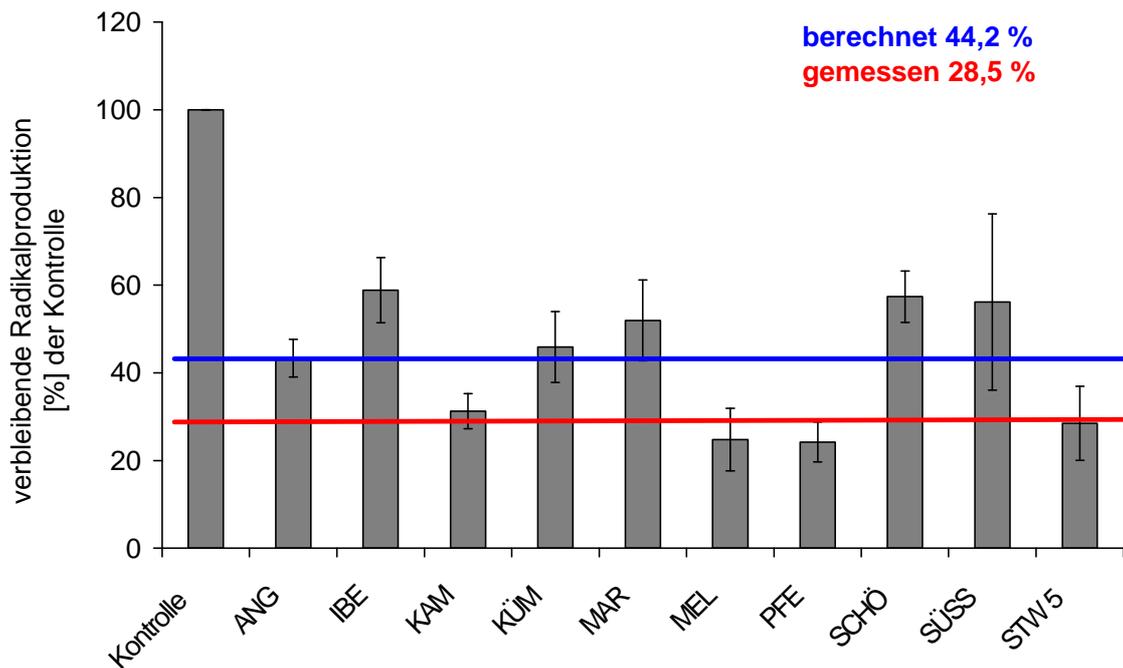


Abb. 22: **Lungenmodell:** Untersuchung zu pharmakologischen Wechselwirkungen zwischen den Einzelextrakten von Iberogast®
 Endkonzentration der Extrakte 9,8 µl/ml
 [MW, jeweils n = 3 bis 4]

4.1.3.3 Untersuchung mittels des Leukozytenmodells

Auch im Leukozytenmodell wurden die Wechselwirkungen zwischen den Einzelextrakten in Iberogast® untersucht. Die Extrakte wurden in einer einheitlichen Endkonzentration von 3,3 µl/ml eingesetzt und die Effekte sowohl auf die basale Radikalproduktion als auch auf den Aktivierungsgrad nach Zymosanstimulation untersucht. Die verbleibende Radikalproduktion von Iberogast® wurde als Summe der Einzeleffekte der verschiedenen Extrakte berechnet und mit dem gemessenen Wert von Iberogast® verglichen. Für die basale Radikalproduktion betrug der berechnete Wert 51,8 %, der gemessene 27,0 % (**Abb. 23**). Diese Daten deuten auf supraadditive Wechselwirkungen zwischen den Einzelextrakten hin. Nach Zusatz von Zymosan war kein so deutlicher Unterschied für die berechnete und gemessene verbleibende Stimulierbarkeit feststellbar (berechnet 53,4 %, gemessen bei 43,7 %) (**Abb. 24**).

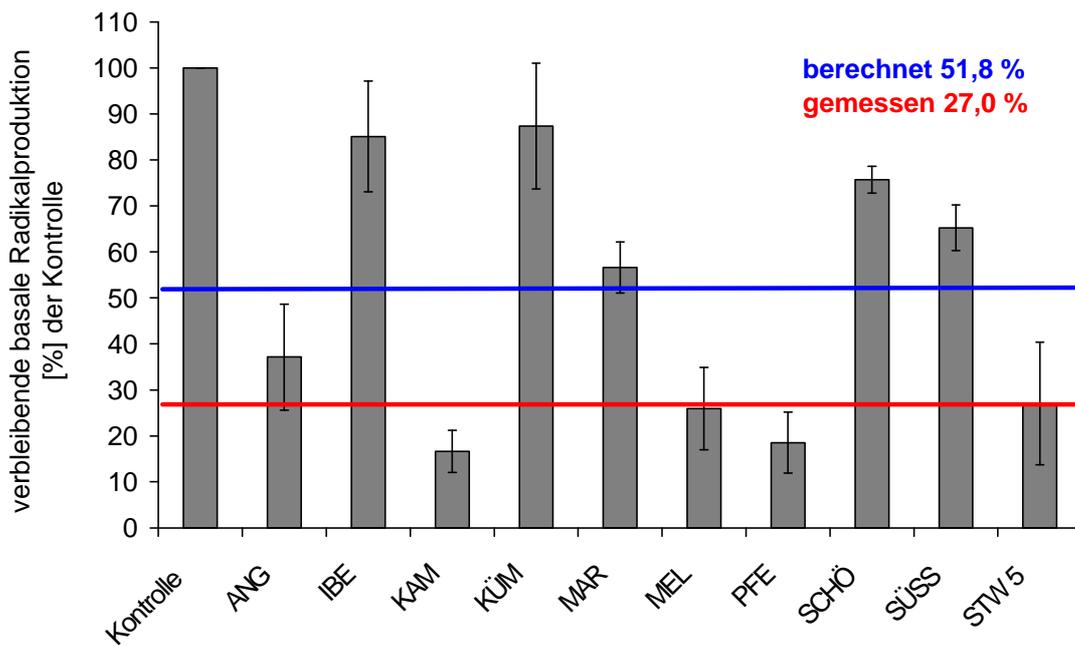


Abb. 23: Leukozytenmodell (basale Radikalproduktion): Untersuchung zu pharmakologischen Wechselwirkungen zwischen den Einzelextrakten von Iberogast®
Endkonzentration der Extrakte 3,3 µl/ml, [MW, SD, n = 4]

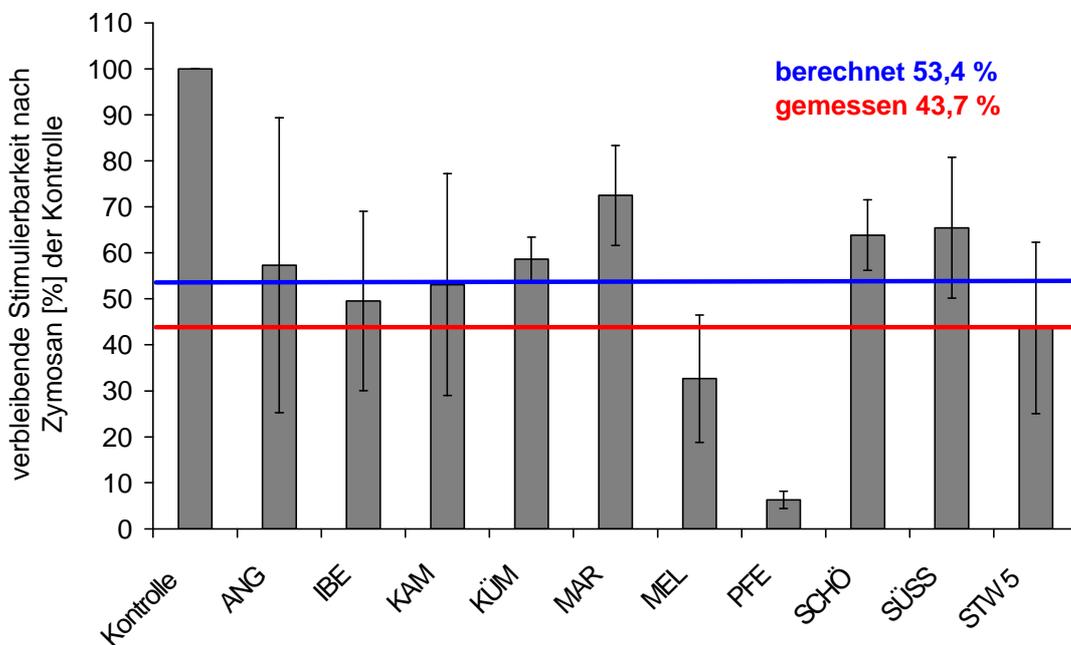


Abb. 24: Leukozytenmodell (Radikalproduktion nach Zymosan): Untersuchung zu pharmakologischen Wechselwirkungen zwischen den Einzelextrakten von Iberogast®
Endkonzentration der Extrakte 3,3 µl/ml, [MW, SD, n = 4]

4.2 Untersuchungen zur Wirkung von Extrakten aus Weidenrinde, Teufelskrallenwurzel und Brennnesselblättern

4.2.1 Radikalfangende Effekte der Extrakte aus Weidenrinde, Teufelskrallenwurzel und Brennnesselblättern in verschiedenen Testsystemen

In unterschiedlichen radikalbildenden Systemen sollten die radikalfangenden Eigenschaften von Trockenextrakten aus Weidenrinde, Teufelskrallenwurzel und Brennnesselblättern, die als Antirheumatika Verwendung finden, untersucht werden.

4.2.1.1 Radikalproduktion durch AAPH

Auch bei der Untersuchung der Trockenextrakte aus Weidenrinde (wässrig und ethanolisch), Teufelskrallenwurzel und Brennnesselblättern mittels der AAPH-Reaktion wurde zur Quantifizierung des radikalfangenden Potentials die Auslöschzeit verwendet, zum Vergleich der Extrakte untereinander die Steigungen der jeweiligen Regressionsgeraden. Alle vermessenen Extrakte fingen die durch AAPH produzierten Radikale ab, wobei dieser Effekt dosisabhängig war und im untersuchten Konzentrationsbereich streng linear verlief (**Abb. 25**). Der wässrige und der ethanolische Weidenrindenextrakt zeigten ein annähernd gleiches antioxidatives Verhalten (Steigung der RG 3,5 bzw. 3,2), der Teufelskrallenextrakt war etwas weniger stark wirksam (Steigung der RG 1,8), gefolgt vom Brennnesselblätterextrakt (Steigung der RG 0,2), der den schwächsten Effekt hatte. Im Vergleich zum Vitamin-E-Analogon Trolox waren alle diese Extrakte deutlich weniger wirksam (Auslöschzeiten von 7 bis 29 min bei einer Konzentration von 0,5 bis 2,5 µg/ml, Steigung der RG 11,0).

Die in der Weidenrinde vorkommenden Saligeninglykoside haben Prodrug-Charakter und werden im Körper in ihre Wirkform, die Salicylsäure, umgesetzt. Salicylsäure selbst zeigte im Konzentrationsbereich von 0,002 µg/ml bis 197 µg/ml in der AAPH-Reaktion keine antioxidativen Eigenschaften, sodass andere Inhaltsstoffe der Extrakte für die radikalfangenden Eigenschaften verantwortlich sein müssen (Ergebnisse nicht dargestellt).

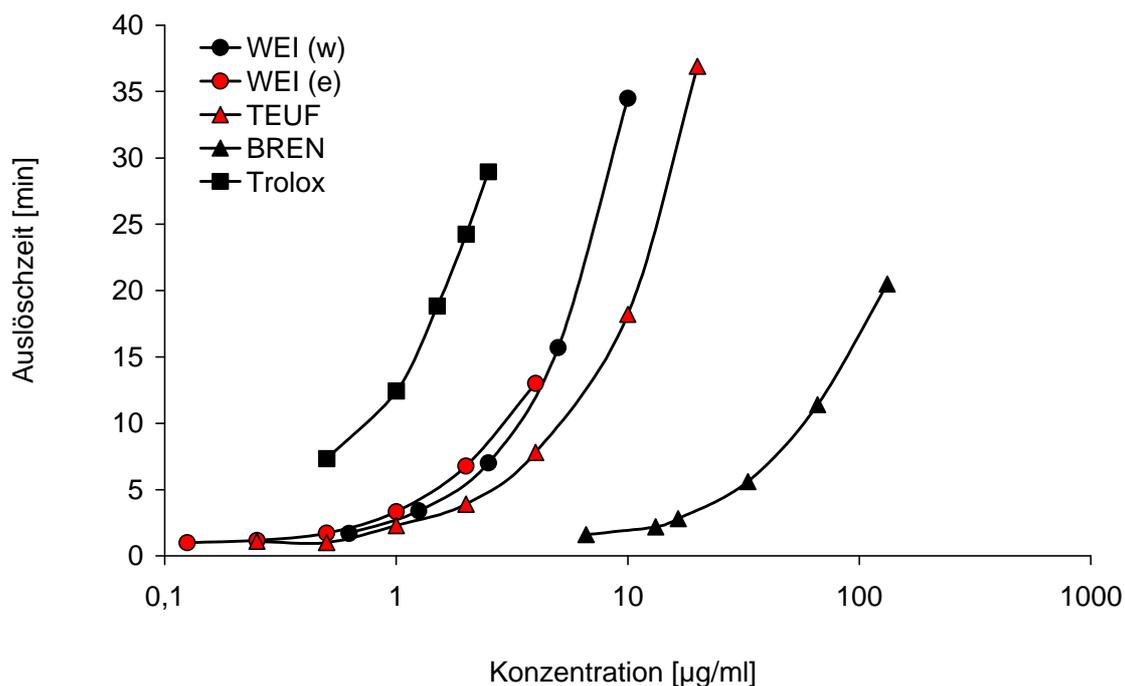


Abb. 25: AAPH-Reaktion: Auslöschzeiten des wässrigen und ethanolischen Weidenrindenextraktes und der Extrakte aus Teufelskrallenwurzel und Brennnesselblättern in Abhängigkeit der Konzentration [MW, n = 2]

4.2.1.2 Radikalproduktion durch das Xanthin/ Xanthinoxidase-System

Wie auch bei Iberogast[®] und seinen Einzelnextrakten sollte im Xanthin/ Xanthinoxidase-Test untersucht werden, inwieweit die Trockenextrakte aus Weidenrinde, Teufelskrallenwurzel und Brennnesselblättern spezifisch Superoxid-Radikale abfangen. Um die Konzentration bei einer Restaktivität von 50 % (IC 50) zu bestimmen, wurden alle Extrakte bei mindestens fünf Konzentrationen je dreimal vermessen. Die eingesetzten Konzentrationen waren auf Grund der unterschiedlichen Wirksamkeit der Proben sehr verschieden und lagen zwischen 0,002 µg/ml und 1100 µg/ml. Die Standardabweichung lag im Mittel bei circa 5 % des Mittelwertes. Wie **Abb. 26** zeigt, hatte der wässrige Weidenrindenextrakt (IC 50 4,8 µg/ml) den stärksten antioxidativen Effekt, gefolgt vom ethanolischen Weidenrindenextrakt (IC 50 8,5 µg/ml) und vom Extrakt aus Teufelskrallenwurzel (IC 50 11 µg/ml). Auch in diesem Testsystem war der Brennnesselblätterextrakt am wenigsten wirksam (IC 50 60 µg/ml). Die

Vergleichsmessungen mit Trolox und Salicylsäure ergaben, dass ersteres eine IC 50 von 1,5 µg/ml aufwies, während Salicylsäure in Konzentrationen unter 100 µg/ml keine radikalfangende Eigenschaften zeigte (Ergebnisse nicht dargestellt).

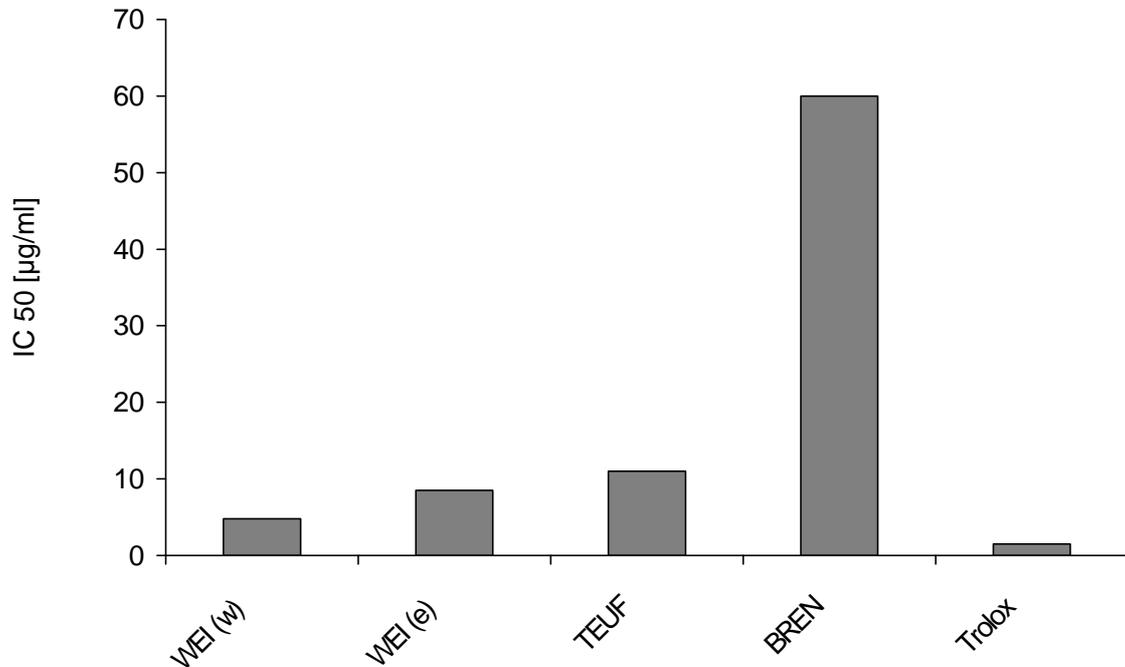


Abb. 26: Xanthin/ Xanthinoxidase-Reaktion: IC 50 der Trockenextrakte aus Weidenrinde (wässrig und ethanolisch), Teufelskrallenwurzel, Brennnesselblättern und Trolox
Die Säulen stellen graphisch ermittelte Werte dar (siehe **Abb. 3**).

4.2.1.3 Radikalproduktion in exzidierten Präparaten aus Schweinelunge

Die Extrakte aus Weidenrinde, Teufelskrallenwurzel und Brennnesselblättern wurden auch im Lungen-Inflammationsmodell auf ihre radikalfangenden Eigenschaften untersucht. Die Extrakte wurden jeweils in 4 Konzentrationen vermessen (190 µg/ml bis 1 µg/ml), allerdings ist in **Abb. 27** nur die Konzentration von 19 µg/ml dargestellt, da bei 190 µg/ml die Lösungsmiteleinflüsse sehr stark waren und bei den tieferen Konzentrationen (4 und 1 µg/ml) nur schwache Extrakt-Effekte zu sehen waren. Sowohl der wässrige, als auch der ethanolische Weidenrindenextrakt besaßen in diesem Testsystem radikalfangende Eigenschaften: Die verbleibende Radikalproduktion betrug beim wässrigen

Weidenrindenextrakt 72 %, beim ethanolischen 75,6 %. Dagegen zeigten die Extrakte aus Teufelskrallenwurzel und Brennnesselblättern keine antioxidativen sondern eher prooxidative Effekte (verbleibende Radikalproduktion 122,5 % bzw. 112,8 %). In der höheren Konzentration (190 µg/ml) fing der Brennnesselblätterextrakt jedoch im Gegensatz zum Extrakt aus Teufelskrallenwurzel Radikale ab (Ergebnisse nicht dargestellt).

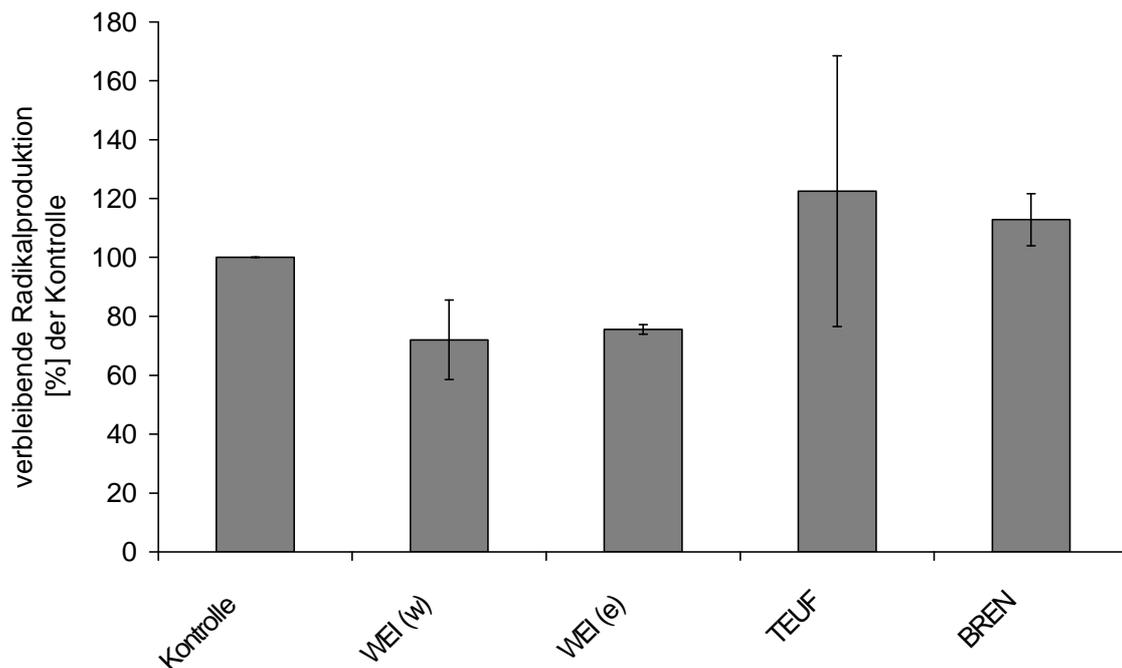


Abb. 27: **Lungenmodell:** Effekte der Extrakte aus Weidenrinde (wässrig und ethanolisch), Teufelskrallenwurzel und Brennnesselblättern auf die Radikalproduktion durch Lungengewebe
Endkonzentration der Extrakte 19 µg/ml
[MW, SD, n = 3 bis 4]

4.2.1.4 Radikalproduktion von Leukozyten in Vollblut

Um den Einfluss der Extrakte auf die Radikalproduktion von humanen Leukozyten zu untersuchen, wurden die Extrakte aus Weidenrinde, Teufelskrallenwurzel und Brennnesselblättern zunächst an Vollblut getestet. Vermessen wurden sowohl die Extrakte (Endkonzentration 38,8 µg/ml) als auch DMSO, das zum Lösen der Extrakte aus Teufelskrallenwurzel und Weidenrinde (ethanolisch) verwendet wurde.

Im ersten Teil des Versuchs wurde der Effekt der Extrakte auf die basale Radikalproduktion von Vollblut untersucht, dargestellt in **Abb. 28**. Die Extrakte aus Brennnesselblättern und Teufelskrallenwurzel waren unwirksam. Dagegen zeigten beide Weidenrindenextrakte eine deutliche antioxidative Wirkung: Der wässrige Weidenrindenextrakt senkte die verbleibende Radikalproduktion auf 48,6 %, der ethanolische Weidenrindenextrakt auf 54,2 %.

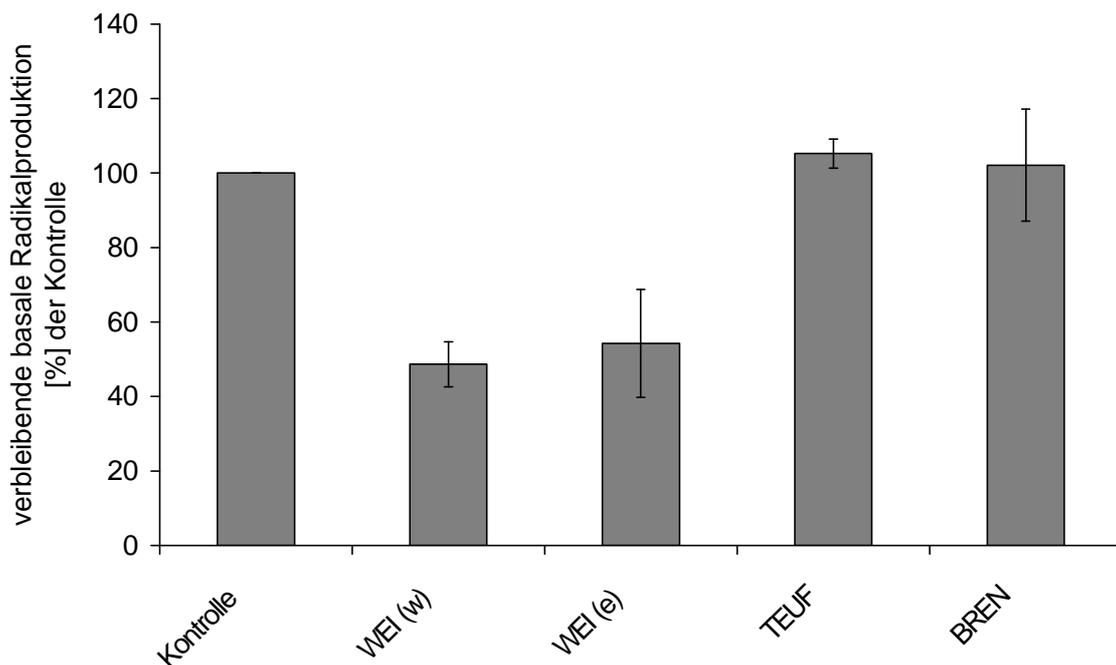


Abb. 28: **Vollblutmodell:** Einfluss der Extrakte aus Weidenrinde, Teufelskrallenwurzel und Brennnesselblättern auf die basale Radikalproduktion von Vollblut
Endkonzentration der Extrakte 38,8 µg/ml
[MW, SD, n = 4]

Im zweiten Teil des Versuchs, in dem die Blutzellen mit Zymosan stimuliert wurden, hatten sowohl der wässrige Weidenrindenextrakt (verbleibende Stimulierbarkeit 53,1 %) als auch der ethanolische Weidenrindenextrakt (verbleibende Stimulierbarkeit 39,3 %) einen hemmenden Einfluss auf die Radikalproduktion. Der Brennnesselblätterextrakt, der keinen Einfluss auf die basale Radikalproduktion zeigte, verringerte die verbleibende Stimulierbarkeit der Blutzellen nach Zugabe von Zymosan auf 79,6 %. Für den Extrakt aus Teufelskrallenwurzel konnte kein antioxidativer, sondern ein deutlich prooxidativer Effekt gefunden werden (verbleibende Stimulierbarkeit 121 %) (**Abb. 29**).

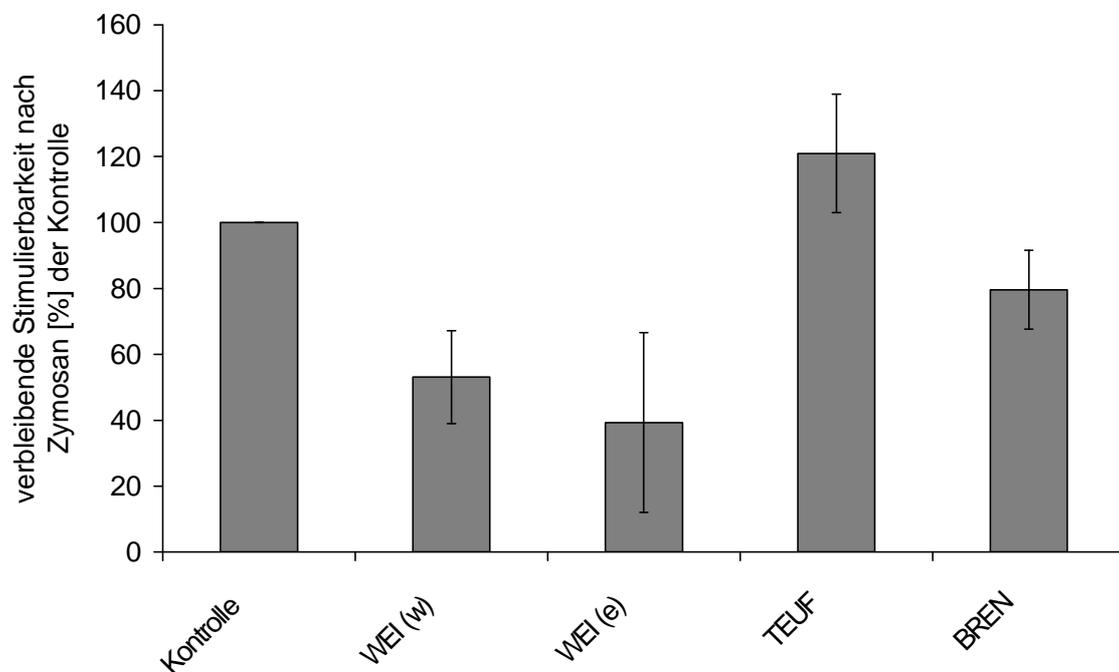


Abb. 29: **Vollblutmodell:** Einfluss der Extrakte aus Weidenrinde, Teufelskrallenwurzel und Brennnesselblättern auf die Radikalproduktion von Vollblut nach Stimulation mit Zymosan
Endkonzentration der Extrakte 38,1 µg/ml
[MW, SD, n = 4]

4.2.1.5 Radikalproduktion von isolierten Leukozyten

Die mit den Extrakten an Vollblut erhaltenen Ergebnisse sollten nun an isolierten Leukozyten überprüft werden, wobei die untersuchten Extraktkonzentrationen zwischen 2 und 39 µg/ml lagen. In **Abb. 30** ist der Einfluss der Extrakte auf die basale Radikalproduktion in [%] der Kontrolle dargestellt. Der Brennnesselblätterextrakt zeigte keinen antioxidativen Effekt auf die basale Radikalproduktion der Buffy-Coat-Zellen, sondern mit steigender Konzentration einen deutlich prooxidativen. Die Radikalproduktion stieg bei einer Konzentration von 37 µg/ml auf 143,6 % an. Der wässrige Weidenrindenextrakt hatte geringe radikalfangende Eigenschaften; er senkte in der höchsten vermessenen Konzentration (39 µg/ml) die verbleibende Radikalproduktion auf 81,8 %. Der ethanolische Weidenrindenextrakt war deutlich stärker wirksam (verbleibende Radikalproduktion 56,0 % bei einer Konzentration von 39 µg/ml). Der Extrakt aus Teufelskrallenwurzel hatte bei einer Konzentration von 10 µg/ml einen leicht prooxidativen Effekt, bei einer Konzentration von 39 µg/ml aber einen deutlich antioxidativen (verbleibende Radikalproduktion 38,3 %). Trolox senkte in einer Konzentration von 2,6 µg/ml die Radikalproduktion auf 74,1 %.

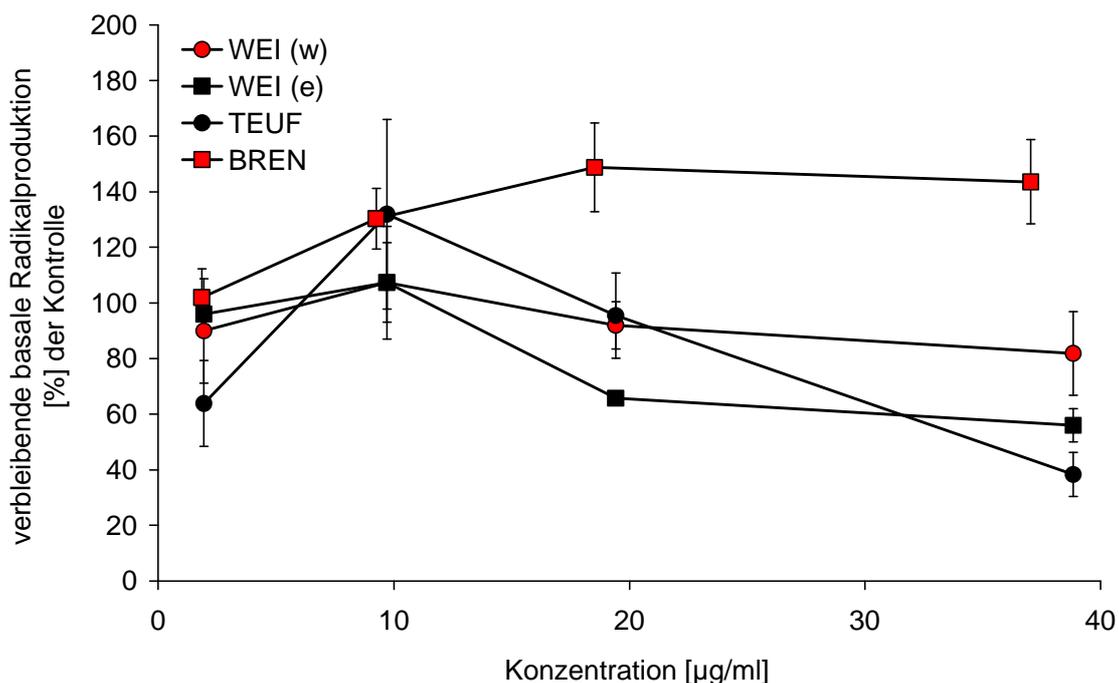


Abb. 30: Leukozytenmodell: Einfluss der Extrakte aus Weidenrinde, Teufelskrallenwurzel und Brennnesselblättern auf die basale Radikalproduktion von Leukozyten
[MW, SD, n = 4]

Nach Stimulation der Leukozyten mit Zymosan senkten vor allem die Extrakte aus Weidenrinde (wässrig und ethanolisch) und der Extrakt aus Brennnesselblättern die verbleibende Radikalproduktion der Leukozyten mit steigender Konzentration immer mehr (**Abb. 31**). In der höchsten vermessenen Konzentration wurden für den wässrigen bzw. ethanolischen Weidenrindenextrakt (38 µg/ml) und den Brennnesselblätterextrakt (36 µg/ml) verbleibende Stimulierbarkeiten von 28,4%, 49,5 % und 39,5 % gefunden. Der Extrakt aus Teufelskrallenwurzel hatte nur geringe Effekte auf die verbleibende Stimulierbarkeit (bei 38 µg/ml 81,4 %), während Trolox (2,5 µg/ml) diese auf 61,7 % senkte.

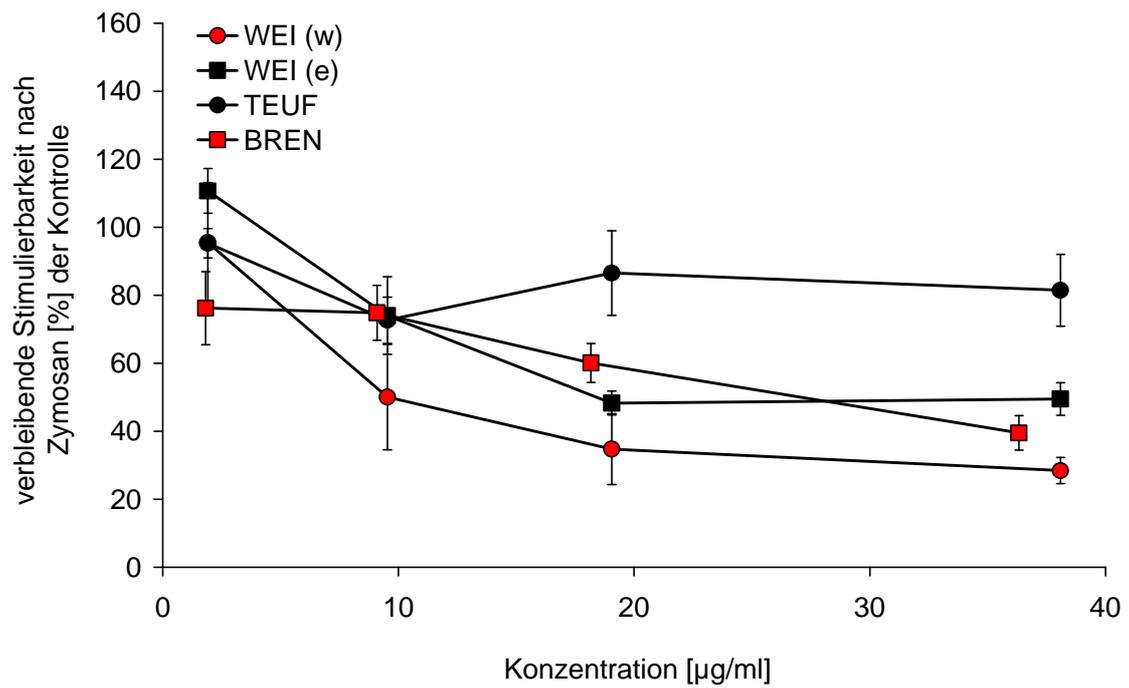


Abb. 31: Leukozytenmodell: Einfluss der Extrakte aus Weidenrinde, Teufelskrallenwurzel und Brennnesselblättern auf die Radikalproduktion von Leukozyten nach Stimulation mit Zymosan [MW, SD, n = 4]

4.2.2 Radikalfangende Effekte des wässrigen Weidenrindenextraktes und seiner unterschiedlich polarer Fraktionen in verschiedenen Testsystemen

Der wässrige Weidenrindenextrakt (WEI (w)) wurde durch Extraktion mit Lösungsmitteln unterschiedlicher Polarität (Toluol, Ethylacetat, Butanol und Ethanol) fraktioniert. Die daraus resultierenden Fraktionen A, B, C, D und die verbleibende wässrige Fraktion E wurden auf ihr radikalfangendes Potential in verschiedenen Testsystemen untersucht.

4.2.2.1 Radikalproduktion durch AAPH

In der AAPH-Reaktion, bei der wiederum die Auslöschzeit zur Quantifizierung des antioxidativen Verhaltens herangezogen wurde, zeigten die Fraktionen A und B, die mit apolaren Extraktionsmitteln gewonnen wurden, stärkere radikalfangende Eigenschaften als der Gesamtextrakt WEI (w). Die Fraktionen C, D und E, gewonnen mit polaren Extraktionsmitteln, waren dagegen weniger wirksam als der Gesamtextrakt (**Abb. 32**). Auch bei den Fraktionen A bis E waren die radikalfangenden Effekte dosisabhängig und streng linear: Die Steigungen der Regressionsgeraden betragen bei Fraktion A 17,6, Fraktion B 13,4, Trolox 11,0, WEI (w) 3,5, Fraktion C 2,1, Fraktion E 1,6 und bei Fraktion D 0,7.

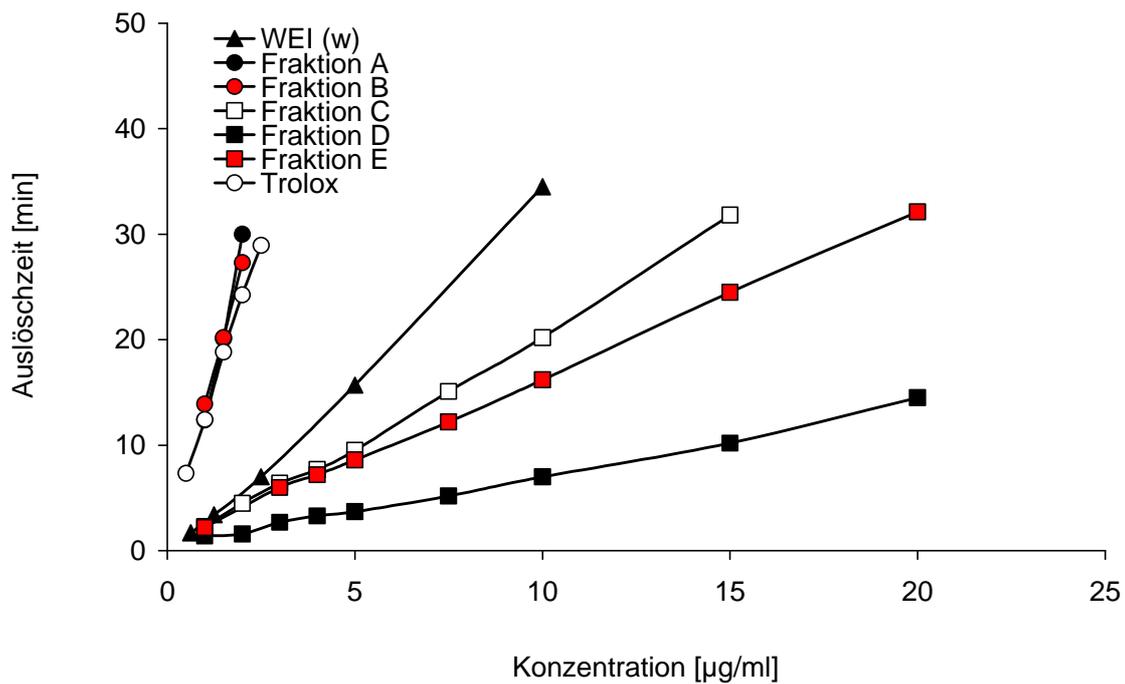


Abb. 32: AAPH-Reaktion: Auslöschzeiten des wässrigen Weidenrindenextraktes und seiner Fraktionen A bis E in Abhängigkeit der Konzentration [MW, n = 2]

4.2.2.2 Radikalproduktion durch das Xanthin/ Xanthinoxidase-System

Mittels des Xanthin/ Xanthinoxidase-Testsystems wurde auch für die Fraktionen A bis E die IC 50 ermittelt und somit das antioxidative Potential speziell bei Anwesenheit von Superoxid-Radikalen. Die IC 50 der Fraktionen wurden in mindestens acht verschiedenen Konzentrationen (zwischen 0,8 µg/ml und 16,7 µg/ml) jeweils dreimal bestimmt. Die Standardabweichung lag im Mittel bei 6 % des Mittelwertes. Auch in diesem Testsystem waren die Fraktionen A und B, gewonnen mit apolaren Lösungsmitteln, stärker, die Fraktionen C, D und E schwächer wirksam als der Gesamtextrakt WEI (w). Die Fraktionen A bzw. B waren mit einer IC 50 von 1,3 bzw. 1 µg/ml stärker wirksam als das Vitamin-E-Analogon Trolox (IC 50 1,5 µg/ml). Die geringsten radikalfangenden Eigenschaften hatte Fraktion D mit einer IC 50 von circa 37,5 µg/ml (Wert extrapoliert) (**Abb. 33**).

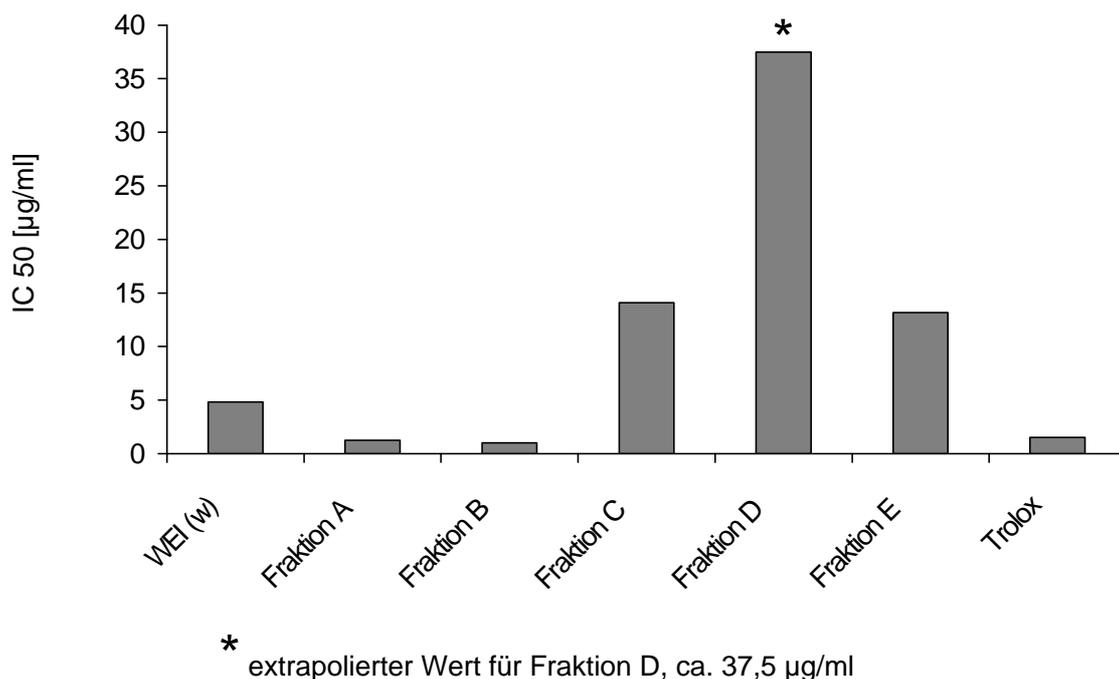


Abb. 33: Xanthin/ Xanthinoxidase-Reaktion: IC₅₀ des wässrigen Weidenrindenextraktes und der Fraktionen A bis E
Die Säulen stellen graphisch ermittelte Werte dar (siehe **Abb. 3**).

4.2.2.3 Radikalproduktion in exzidierten Präparaten aus Schweinelunge

Als weitere Analyse wurden die isolierten Fraktionen A bis E im Konzentrationsbereich von 1 µg/ml bis 19 µg/ml auch im Lungen-Inflammationsmodell getestet. In **Abb. 34** ist die verbleibende Radikalproduktion in [%] der Kontrolle für den Gesamtextrakt (WEI (w)) und seine Fraktionen A bis E in einer Konzentration von 19 µg/ml dargestellt. In tieferen Konzentrationen traten nur geringe Extrakt-Effekte auf. Wie auch in der AAPH-Reaktion und in der Xanthin/ Xanthinoxidase-Reaktion zeigten die Fraktionen A und B mit einer verbleibenden Radikalproduktion von 30,2 % und 24,8 % deutlich stärkere antioxidative Effekte als der Gesamtextrakt (verbleibende Radikalproduktion 72 %), die Fraktionen C, D und E waren schwächer wirksam als der Gesamtextrakt. Fraktion C war mit einer verbleibenden Radikalproduktion von 91,4 % noch minimal antioxidativ wirksam, die Fraktionen D und E zeigten sogar ein prooxidatives Verhalten (121,2 % und 151,4 %).

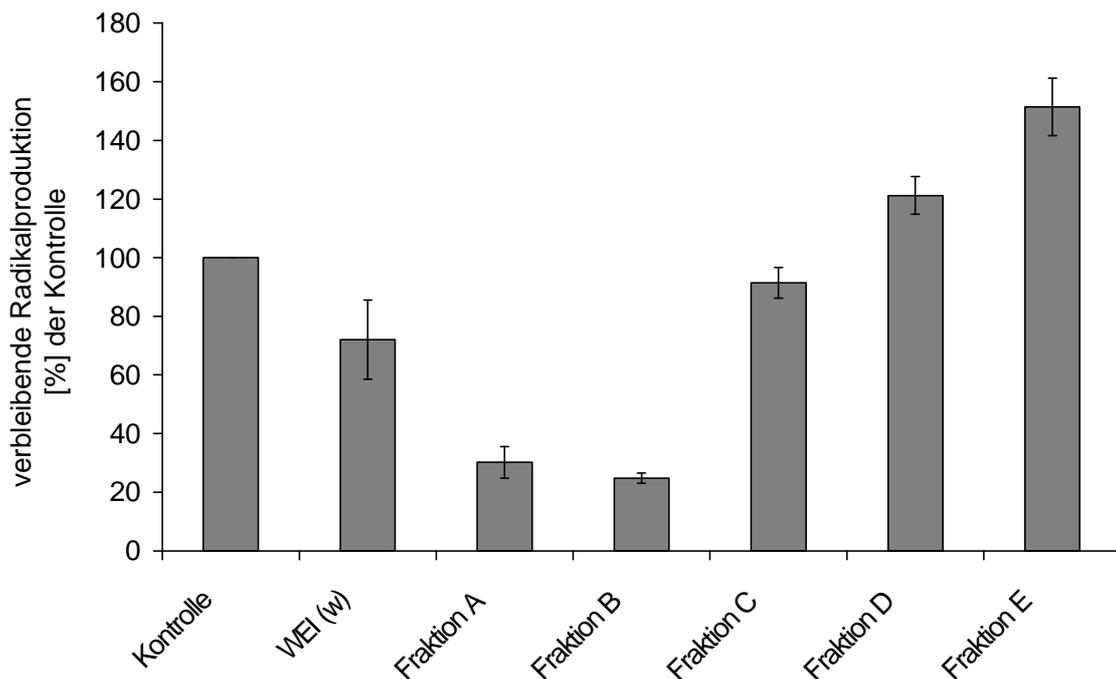


Abb. 34: **Lungenmodell:** Effekte des wässrigen Weidenrindenextraktes und seiner Fraktionen A bis E auf die Radikalbildung durch Lungengewebe
Endkonzentration der Extrakte 19 µg/ml
[MW, SD, n = 3 bis 4]

Um Rückschlüsse auf Inhaltsstoffe der Fraktionen A bis E ziehen zu können, wurden HPLC-Analysen von Frau Dr. K. Berger-Büter, Pharmazeutische Biologie, Universität Basel durchgeführt. Die dazugehörigen Chromatogramme sind in **Abb. 35** dargestellt (Jäggi *et al.*, 2003). Sowohl in der AAPH-Reaktion, in der Xanthin/ Xanthinoxidase-Reaktion als auch im Lungen-Inflammationsmodell wurde deutlich, dass sich die für die radikalfangenden Eigenschaften verantwortlichen Inhaltsstoffe in den Fraktionen anreicherten, die mit apolaren Extraktionsmitteln gewonnen wurden (Fraktion A und B). Die Fraktionen C, D und E, die mit polaren Lösungsmitteln gewonnen wurden, zeigten schwächere radikalfangende Eigenschaften. Daher scheinen vor allem Flavonoide und Polyphenole für den radikalfangenden Effekt verantwortlich zu sein.

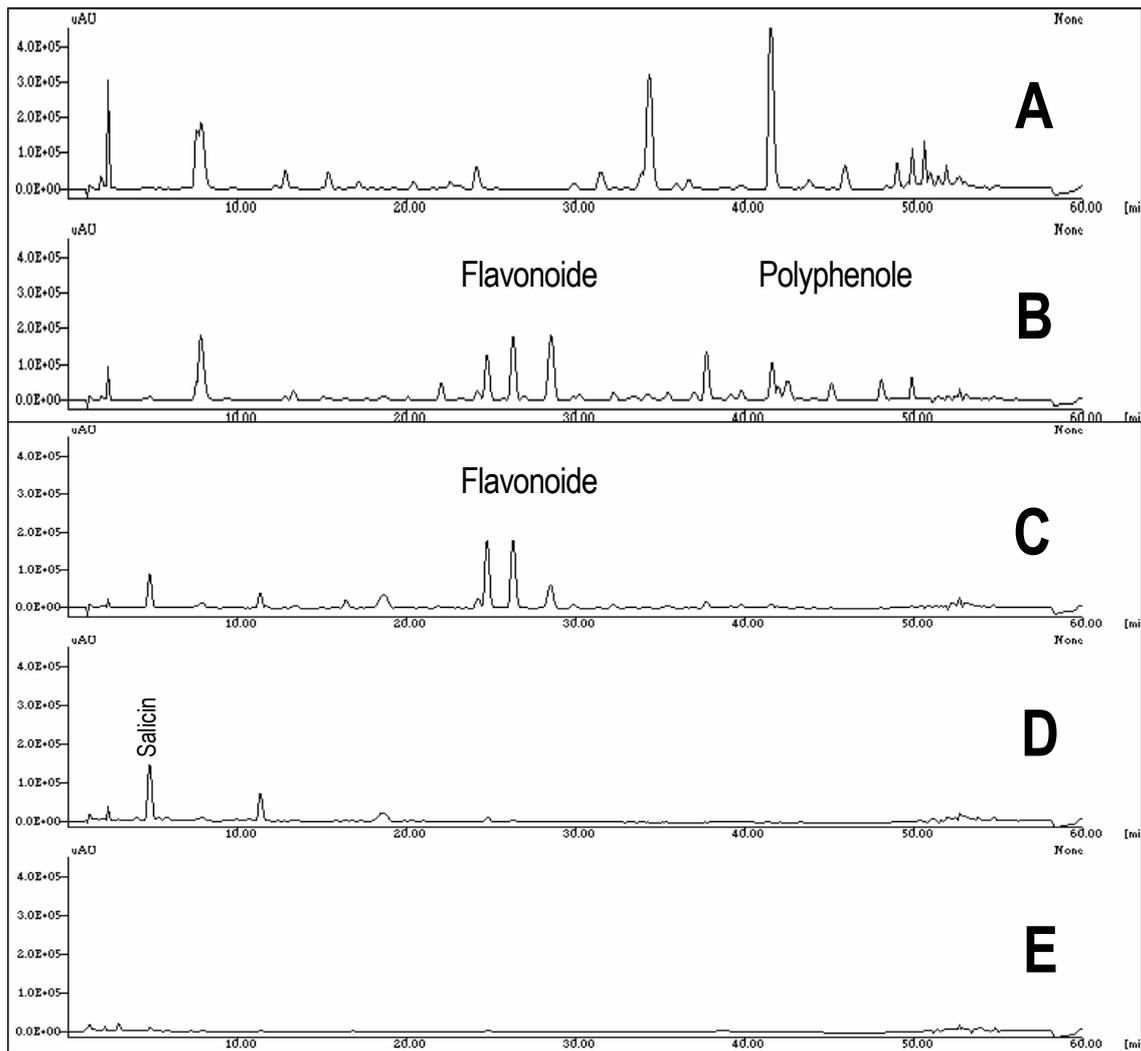


Abb. 35: HPLC-Chromatogramme der Fraktionen A bis E (Jäggi *et al.*, 2003)

4.2.3 Korrelation von chromatographischer Analyse und radikalfangenden Eigenschaften bei verschiedenen Weidenrindenextrakten

Um chemische Analyse und pharmakologische Wirkungen von Multikomponentensystemen zu korrelieren, bzw. letztere aus ersteren vorhersagen zu können, wurden in einer Kooperation mit Frau Dr. K. Wuthold, Institut für Pharmazeutische Chemie, Universität Tübingen, chromatographische Daten (HPTLC und HPLC) mit den Ergebnissen aus der AAPH- und der Xanthin/ -Xanthinoxidase-Reaktion verschiedener Weidenrindenextrakte mit Hilfe der multivariaten Datenanalyse in Zusammenhang gebracht (Wuthold, 2004). Die Extrakte wurden in der AAPH-Reaktion in Konzentrationen von 0,63 bis 20 µg/ml, in der Xanthin/ Xanthinoxidase-Reaktion in Konzentrationen von 0,52 bis 166,7 µg/ml vermessen. Zur Charakterisierung der radikalfangenden Eigenschaften diente in der AAPH-Reaktion die Steigung der Regressionsgeraden, in der Xanthin/ Xanthinoxidase-Reaktion die relative Aktivität [%] bei einer Extraktkonzentration von 2,1 µg/ml (**Tab. 20**). Drei Extrakte wurden nicht in die Korrelation eingeschlossen, sie dienten zur externen Validierung des Verfahrens (**Tab. 21**).

Tab. 20: AAPH- und Xanthin/ Xanthinoxidase-Reaktion: pharmakologische Daten der Weidenrindenextrakte, die in die multivariate Datenanalyse einfließen
[Xanthin/ Xanthinoxidase: MW, SD, n = 3; AAPH: Steigung der RG, Bestimmtheitsmaß R²]

Extrakte für MVD	Xanthin/ Xanthinoxidase-Reaktion	AAPH-Reaktion
	relative Aktivität [%] bei einer Extraktkonzentration von 2,1 µg/ml	Steigung der Regressionsgeraden
WEI 01	76,4 ± 1,8	4,0 R ² = 0,9968
WEI 02	62,9 ± 2,6	4,5 R ² = 0,9978
WEI 03	87,3 ± 10,1	2,8 R ² = 0,9955
WEI 04	87,5 ± 5,4	1,0 R ² = 0,9991
WEI 05	60,7 ± 2,1	2,9 R ² = 0,9991
WEI 06	71,7 ± 3,2	3,0 R ² = 0,9980
WEI 07	64,7 ± 1,2	2,1 R ² = 0,9752
WEI 08	86,4 ± 2,4	0,9 R ² = 0,9982
WEI 09	78,5 ± 5,4	3,2 R ² = 0,9965
WEI 11	79,6 ± 3,2	3,0 R ² = 0,9968
WEI 13	95,9 ± 1,1	1,0 R ² = 0,9965
WEI 15	85,7 ± 1,7	4,5 R ² = 0,9992
WEI 16	91,0 ± 7,9	2,7 R ² = 0,9966
WEI 17	90,7 ± 5,8	1,9 R ² = 0,9989
WEI 18	81,3 ± 3,6	3,9 R ² = 0,9949
WEI 19	73,7 ± 3,7	3,4 R ² = 0,9955
WEI 20	26,3 ± 3,2	5,2 R ² = 0,9998
WEI 21	21,8 ± 1,8	6,5 R ² = 0,9997
WEI 22	71,3 ± 5,1	3,0 R ² = 0,9983

Tab. 21: AAPH- und Xanthin/ Xanthinoxidase-Reaktion: pharmakologische Daten der Weidenrindenextrakte, die zur externen Validierung dienten
[Xanthin/ Xanthinoxidase: MW, SD, n = 3; AAPH: Steigung der RG, Bestimmtheitsmaß R²]

Extrakte für MVD	Xanthin/ Xanthinoxidase-Reaktion	AAPH-Reaktion
	relative Aktivität [%] bei einer Extraktkonzentration von 2,1 µg/ml	Steigung der Regressionsgeraden
WEI 10	85,1 ± 4,9	2,5 R ² = 0,9995
WEI 12	82,6 ± 5,4	2,8 R ² = 0,9989
WEI 14	96,2 ± 3,0	0,7 R ² = 0,9991

In den Abbildungen **Abb. 36** bis **Abb. 39** sind jeweils die Regressionsgeraden für die Kalibrierungen und die Validierungen zwischen pharmakologischen und analytischen Daten dargestellt. Angegeben sind jeweils die Steigung der Regressionsgeraden (Slope), der Achsenabschnitt (Offset) und der Korrelationskoeffizient (Corr), wobei in den Abbildungen der obere Wert immer für die Kalibrierung, der untere Wert immer für die Validierung steht.

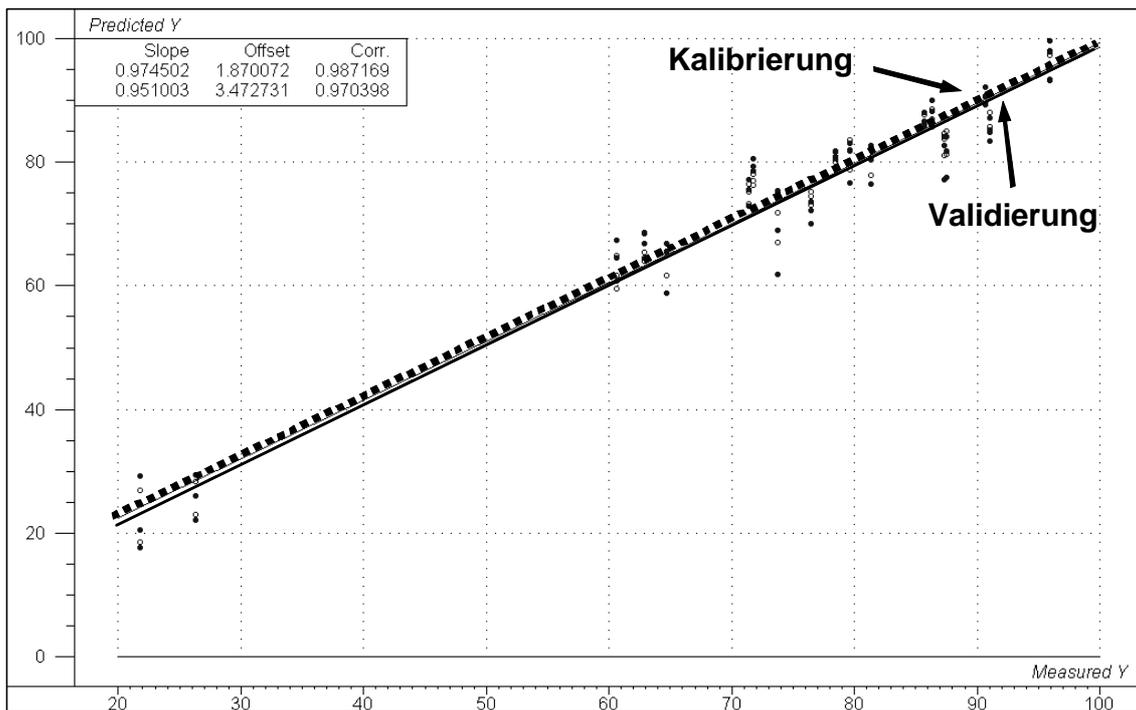


Abb. 36: PLS-1 Regressionsgeraden (HPTLC/ Xanthin/ Xanthinoxidase-Reaktion)
(Wuthold, 2004)

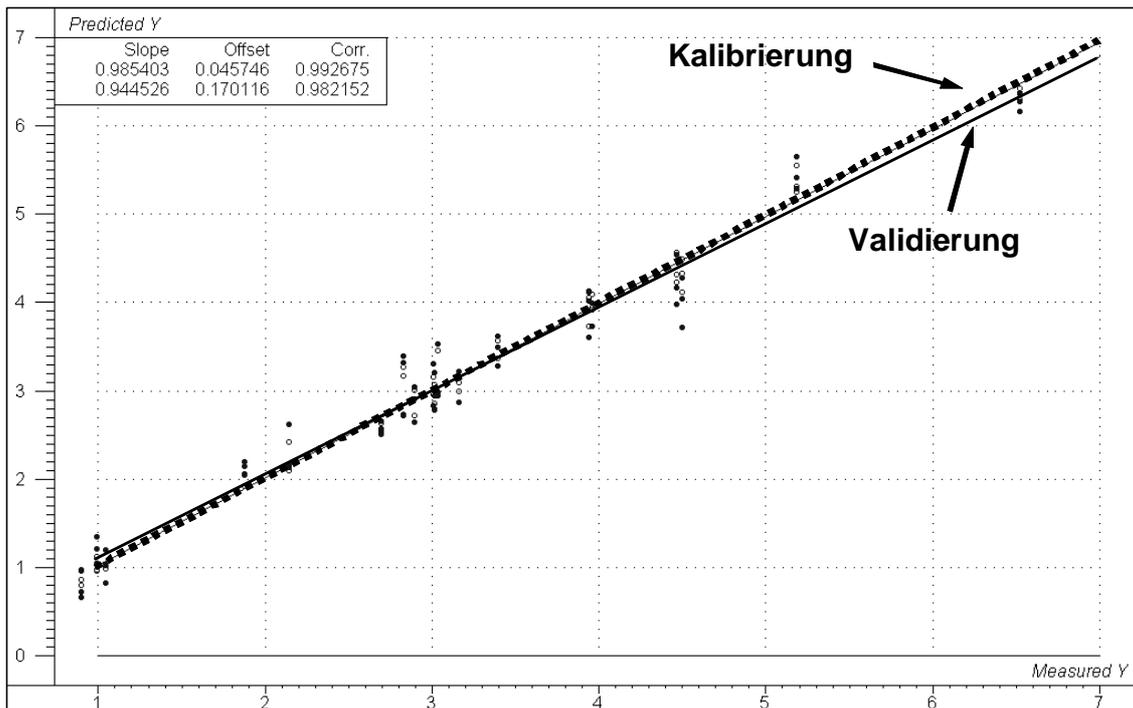


Abb. 37: PLS-1 Regressionsgeraden (HPTLC/ AAPH-Reaktion)
(Wuthold, 2004)

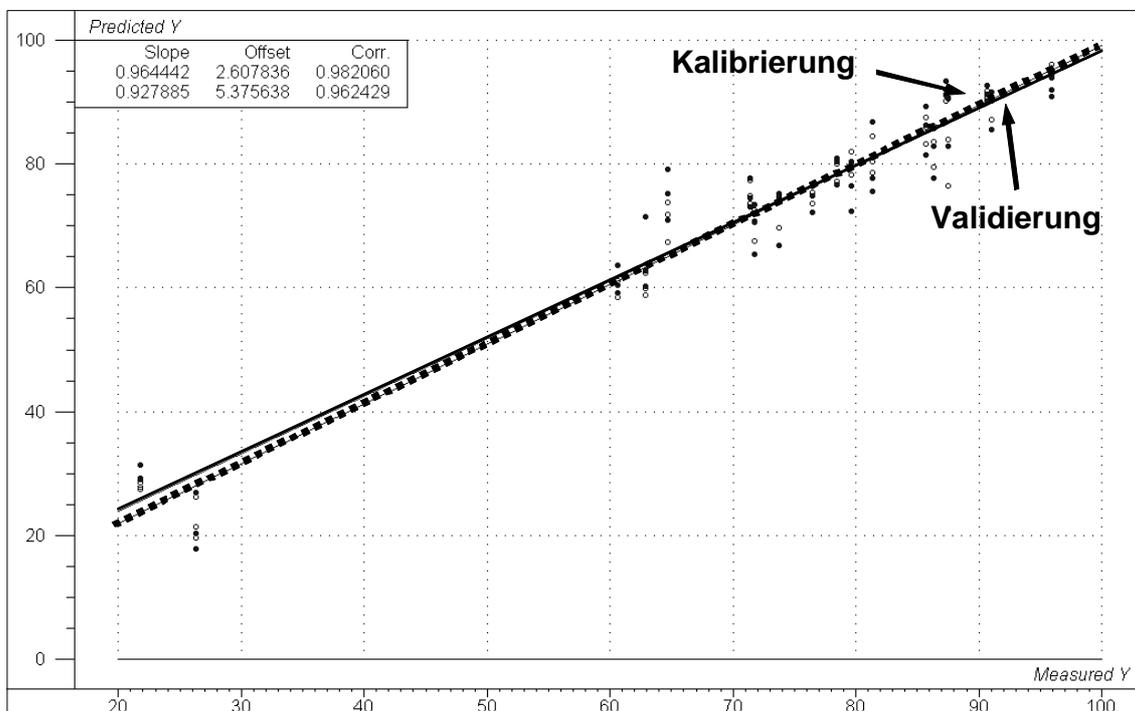


Abb. 38: PLS-1 Regressionsgeraden (HPLC/ Xanthin/ Xanthinoxidase-Reaktion)
(Wuthold, 2004)

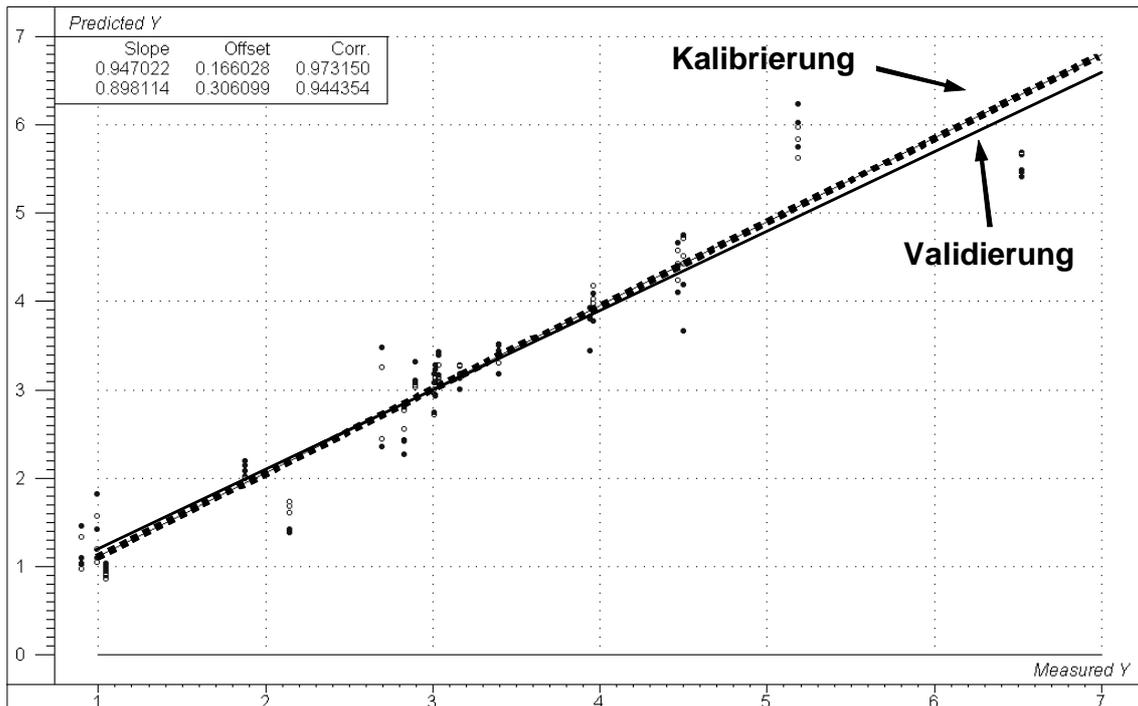


Abb. 39: PLS-1 Regressionsgeraden (HPLC/ AAPH-Reaktion)
(Wuthold, 2004)

Es konnte gezeigt werden, dass sich die chromatographischen Daten gut mit den pharmakologischen Daten korrelieren lassen. Die Korrelationskoeffizienten lagen für die Kalibrierung zwischen 0,973 und 0,993. Die Ergebnisse der Full Cross Validierung ließen für das gewählte Modell eine gute Vorhersage aufgrund des „Root mean square error of prediction“ erwarten. Die Korrelationskoeffizienten für die Validierung lagen zwischen 0,944 und 0,982. Auch bei der externen Validierung mittels der Testproben WEI 10, 12, 14 wurden gute Vorhersagewerte erzielt (**Abb. 40, Abb. 41**).

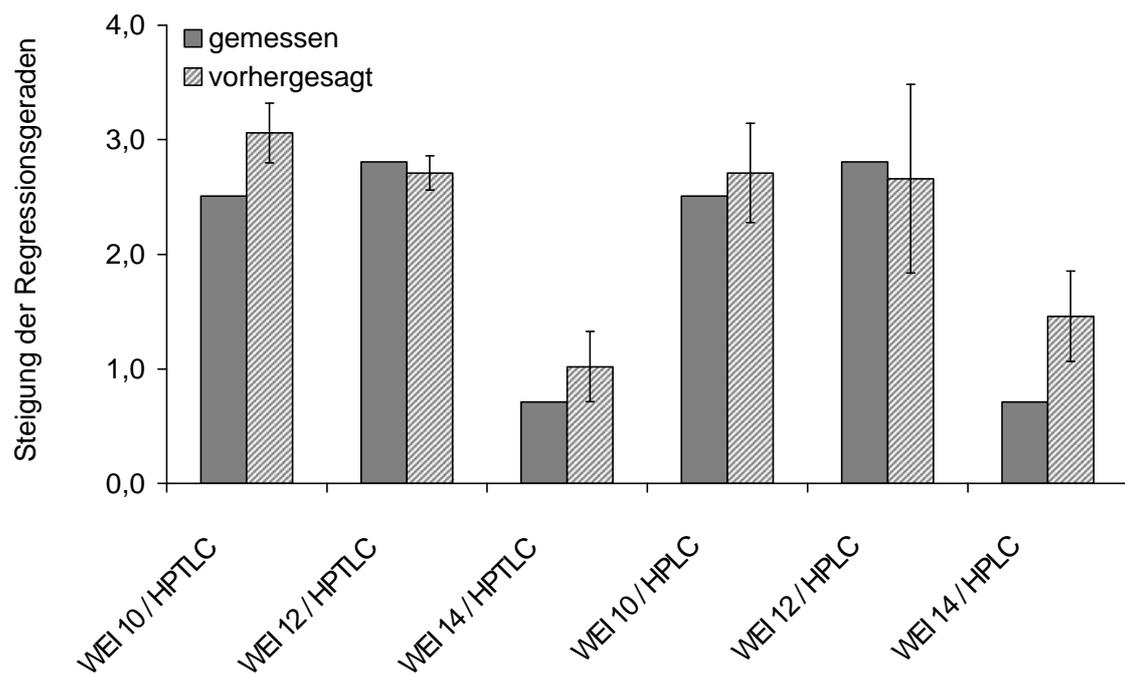


Abb. 40: **AAPH-Reaktion:** Vorhersage der pharmakologischen Testergebnisse (AAPH-Reaktion) der Extrakte WEI 10, 12, 14 mittels des PLS-1-Modells (schraffierte Säule) und Vergleich mit dem jeweiligen gemessenen Wert (graue Säule)

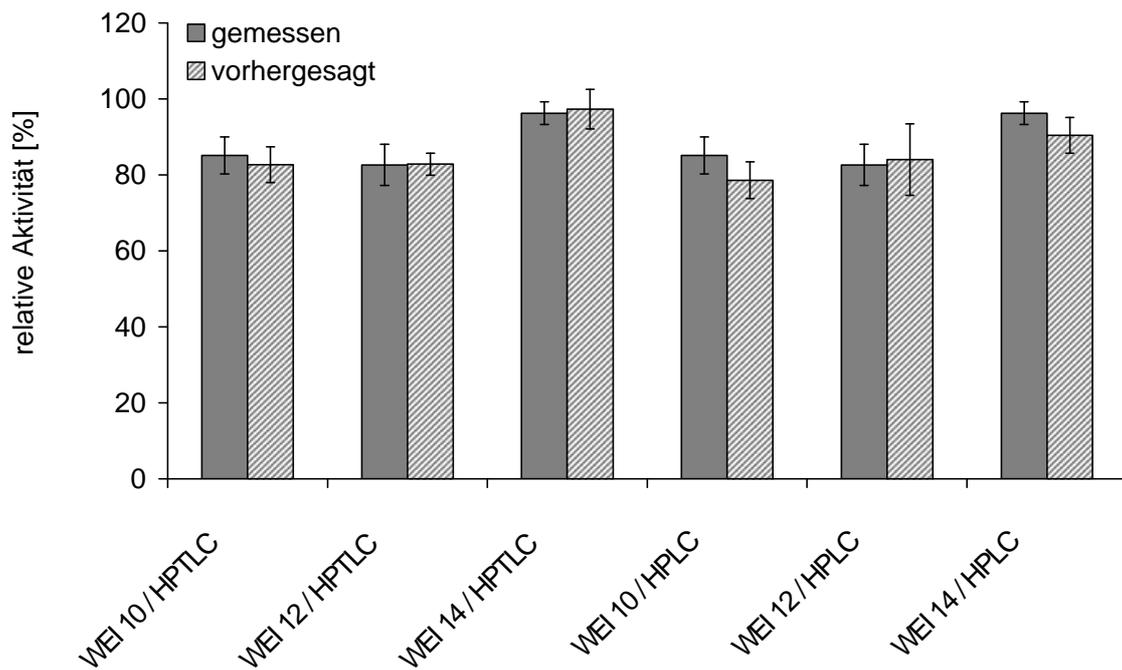


Abb. 41: Xanthin/ Xanthinoxidase-Reaktion: Vorhersage der pharmakologischen Testergebnisse (Xanthin/ Xanthinoxidase-Reaktion) der Extrakte WEI 10, 12, 14 mittels des PLS-1-Modells (schraffierte Säule) und Vergleich mit dem jeweiligen gemessenen Wert (graue Säule)

4.3 Untersuchungen zur Wirkung von Phytodolor[®] (STW 1) und seiner Komponenten

4.3.1 Effekte von Phytodolor[®] und seiner Einzelextrakte auf die Radikalproduktion durch AAPH

Phytodolor[®] und seine Einzelextrakte aus Eschenrinde, Zitterpappelrinde und – blättern und Goldrutenkraut wurden in der AAPH-Reaktion auf ihre radikal-fangenden Eigenschaften untersucht. Dafür wurden alle Extrakte in jeweils vier Konzentrationen (0,025 bis 0,2 $\mu\text{l/ml}$) vermessen und die Auslöschzeiten bestimmt. Die untersuchten Extrakte zeigten dosisabhängig einen antioxidativen Effekt, der im untersuchten Konzentrationsbereich streng linear verlief. Am wirksamsten war der Eschenrindenextrakt (Steigung der RG 165,7), gefolgt vom Zitterpappelextrakt (Steigung der RG 114,6) und Phytodolor[®] (Steigung der RG 111,8). Der Extrakt aus Goldrutenkraut hatte das geringste radikal-fangende Potential (Steigung der RG 47,0), wobei die Auslöschzeit bei einer Konzentration von 0,2 $\mu\text{l/ml}$ immer noch 10,1 min betrug, was der Auslöschzeit einer 3 μM Trolox-Lösung entspricht (**Abb. 42**).

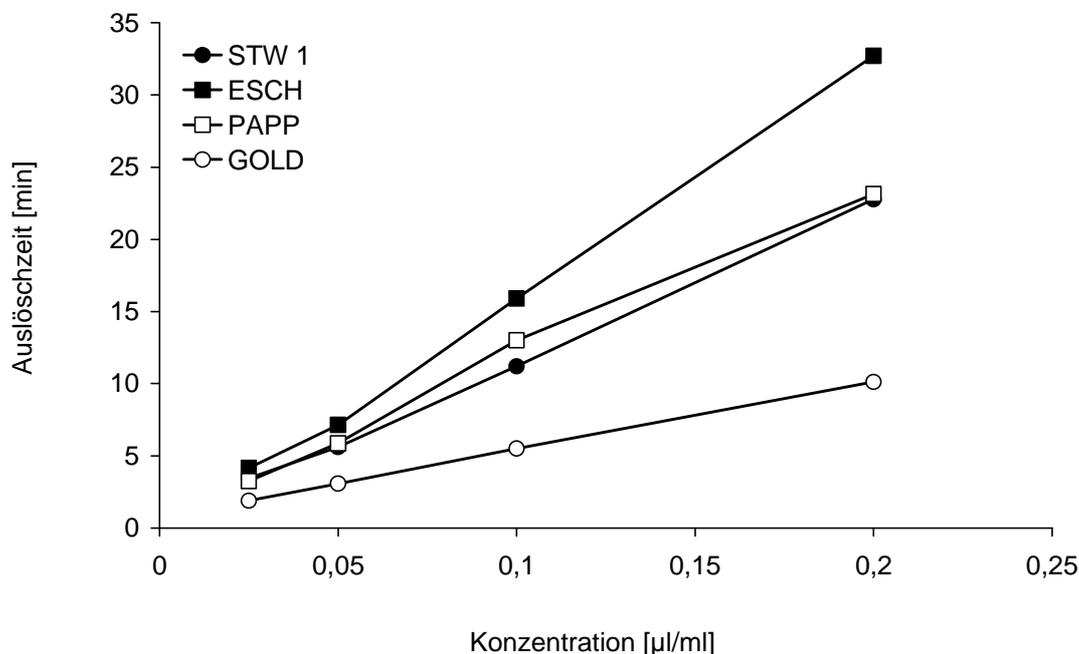


Abb. 42: AAPH-Reaktion: Auslöschzeiten von Phytodolor[®] und seiner Einzel-extrakte in Abhängigkeit der Konzentration [MW, n = 2]

4.3.2 Wechselwirkungen zwischen den Einzelextrakten in Phytodolor[®], ermittelt durch die AAPH-Reaktion

Um die Wechselwirkungen zwischen den Einzelextrakten in Phytodolor[®] zu untersuchen, standen 21 verschiedene Mischungen (PHY M1 bis PHY M21) zur Verfügung mit jeweils unterschiedlichen Anteilen der drei Einzelextrakte aus Pappel, Goldrutenkraut und Eschenrinde. Bei diesen 21 Mischungen wurden in der AAPH-Reaktion für die Konzentration 0,2 µl/ml die Auslöschzeiten bestimmt. Es wurden jeweils Doppelbestimmungen durchgeführt. Wie in Kapitel 4.3.1 beschrieben, wurden für die Einzelextrakte aus Pappel, Eschenrinde und Goldrutenkraut die Auslöschzeiten in einer Konzentration von 0,2 µl/ml bereits ermittelt (Auslöschzeiten Pappel 23,1 min, Esche 32,7 min, Goldrute 10,1 min). Mit Hilfe dieser Ergebnisse wurden die Auslöschzeiten der 21 Mischungen berechnet und mit den gemessenen Werten verglichen. In **Abb. 43** sind die gemessenen und die berechneten Auslöschzeiten für jede Mischung dargestellt. Bei den Mischungen PHY M8, PHY M11, PHY M15, PHY M16 lagen die gemessenen und die berechneten Werte so nah beieinander, dass jeweils nur ein Wert zu sehen ist. Auch bei allen übrigen Mischungen gab es nur kleine Unterschiede zwischen den gemessenen und den berechneten Auslöschzeiten. Diese Befunde deuten auf additive Wechselwirkungen zwischen den Einzelextrakten hin.

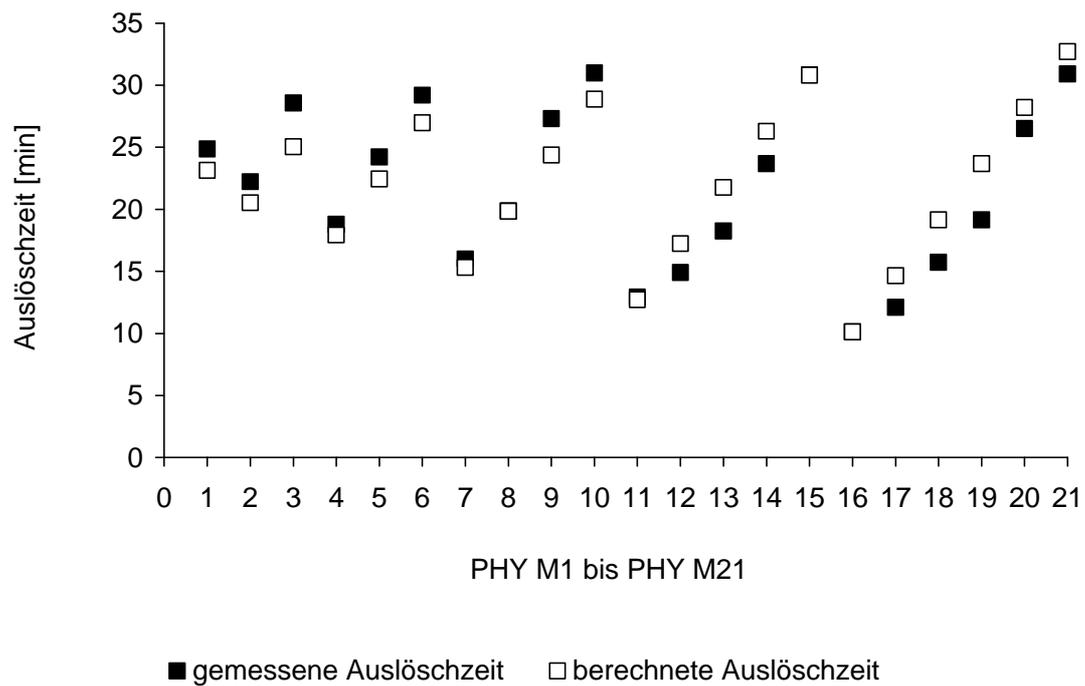


Abb. 43: AAPH-Reaktion: Vergleich der berechneten und gemessenen Auslöschzeiten der 21 Mischungen PHY M1 bis PHY M21
Endkonzentration der Extrakte 0,2 µl/ml
[MW, n = 2]

5 Diskussion

5.1 Iberogast[®] und Komponenten

5.1.1 Antioxidative Wirkungen von Iberogast[®] und seiner Einzelextrakte in isolierten und zellulären radikalbildenden Systemen

Bei zahlreichen Erkrankungen des Gastrointestinaltraktes, wie Reizmagen, Reizdarm und Gastritis spielt die Entzündungsreaktion eine wichtige Rolle (Barbara *et al.*, 2002; Collins *et al.*, 2001; Gwee *et al.*, 2003). Häufig werden zu deren Behandlung Phytopharmaka, wie zum Beispiel Iberogast[®], eingesetzt. Da bei Entzündungen ROS von Bedeutung sind, könnten radikalfangende Eigenschaften der eingesetzten Arzneimittel zur therapeutischen Wirkung beitragen.

Es konnte in rein chemischen so wie in zellulären Testsystemen gezeigt werden, dass Iberogast[®] und seine Einzelextrakte Radikale abfangen. In ersteren waren die Extrakte aus Pfefferminz- und Melissenblättern am stärksten, die aus Süßholzwurzel und der Iberis amara am schwächsten wirksam. Die übrigen Einzelextrakte und Iberogast[®] selbst befanden sich bezüglich der Wirkstärke im Mittelfeld. Bemerkenswert ist die sehr ähnliche Verteilung der antioxidativen Potentiale der Extrakte in beiden Testsystemen, da in der AAPH-Reaktion und in der Xanthin/ Xanthinoxidase-Reaktion verschiedene Spezies an Radikalen gebildet werden. Die Extrakte fangen also sowohl Kohlenstoff zentrierte Radikale (AAPH-Reaktion) als auch Superoxid-Radikale (Xanthin/ -Xanthinoxidase-Reaktion) ab.

Auch im Lungenmodell konnte eine ähnliche Verteilung bezüglich der Wirksamkeit gefunden werden: Die Extrakte aus Pfefferminz- und Melissenblättern hatten das stärkste, der Iberisextrakt das schwächste antioxidative Potential. Eine etwas andere Verteilung wurde im Leukozytenmodell gefunden. Dort bewirkte der Kamillenblütenextrakt die stärkste Hemmung der basalen Radikalproduktion, wobei auch die Extrakte aus Pfefferminz- und Melissenblättern noch stark wirksam waren. Kümmel war in diesem Test im Vergleich zu den vorherigen Tests auffallend wenig wirksam. Der Pfefferminzblätterextrakt

zeigte auf die Radikalproduktion nach Stimulation mit Zymosan den deutlichsten hemmenden Effekt, der Extrakt aus Mariendistel war am schwächsten wirksam.

Durch diese Untersuchungen können Rückschlüsse auf die Wirkmechanismen gezogen werden, was an zwei Beispielen deutlich gemacht werden soll. Der Extrakt aus Pfefferminzblättern, der auch in den chemischen Systemen stark wirksam war, hatte im Leukozytenmodell sowohl auf die basale Radikalproduktion als auch auf die Radikalproduktion nach Stimulation mit Zymosan einen stark hemmenden Einfluss. Man kann daher annehmen, dass diese ausgeprägte Wirkung eher durch radikalfangende Mechanismen als durch eine Hemmung der Aktivierung der Leukozyten zustande kommt. Der Kümmelfrüchteextrakt dagegen hatte kaum einen Effekt auf die basale Radikalproduktion, reduzierte aber die Radikalproduktion nach Stimulation mit Zymosan deutlich. Hier kommt als Wirkmechanismus eher eine Hemmung der Aktivierung der Leukozyten in Frage als radikalfangende Eigenschaften.

Beachtet werden sollte beim Leukozytenmodell, dass nicht mit vollständig gereinigten Leukozyten gearbeitet wurde, sondern mit Buffy-Coat-Zellen, die noch kleine Mengen an anderen Blutbestandteilen enthielten. Diese könnten eventuell auch mit freien Radikalen oder den Extrakten reagieren und so das Ergebnis verändern. Für alle Extrakte herrschten aber gleiche Bedingungen.

Ähnliche Studien wurden von Schempp et al. mit einem Myeloperoxidase-Modell durchgeführt. Dabei wurde die Hypochloritbildung einerseits in einem rein chemischen Testsystem, andererseits in Vollblut durch die Ethenbildung aus 1-Aminocyclopropan-1-carbonsäure (ACC) verfolgt. In der ersten Reaktion zeigten die Extrakte aus Iberis, Kamillenblüten, Melissenblättern, Mariendistelfrüchten und Süßholzwurzel die stärkste hemmende Wirkung, der Angelikawurzelextrakt war unwirksam, während die Extrakte aus Kümmelfrüchten, Pfefferminzblättern und Schöllkraut prooxidative Effekte zeigten. Dies konnte auf die Autooxidation von Monoterpenen in den Extrakten zurückgeführt werden, bei der Wasserstoffperoxid entsteht. Iberogast[®] selbst wirkte in dieser Reaktion antioxidativ. In der zweiten Reaktion hatte der Iberisextrakt die

stärkste Wirkung. Gute Hemmwirkungen wurden ebenfalls für die Extrakte aus Kamillenblüten und Melissenblättern gefunden, mittlere für die Extrakte aus Pfefferminzblättern und Angelikawurzel, während die übrigen Einzelextrakte praktisch unwirksam waren (Schempp *et al.*, 2004).

Es wird deutlich, dass pflanzliche Extrakte in verschiedenen Testsystemen unterschiedlich starke Wirkungen bezüglich ihrer radikalfangenden Eigenschaften zeigen können. So war zum Beispiel der Iberisextrakt bei den Untersuchungen von Schempp *et al.* der wirksamste Extrakt, während in den in dieser Arbeit vorgestellten Modellen der Iberisextrakt im Allgemeinen nur sehr schwach wirksam war, mit Ausnahme im Leukozytenmodell nach Stimulation mit Zymosan. Da anzunehmen ist, dass auch *in vivo* unterschiedliche Spezies von Radikalen aus unterschiedlichen Quellen wirksam werden, müssen also zur Beschreibung der antioxidativen Eigenschaften von Phytopharmaka immer verschiedene Testsysteme eingesetzt werden.

Für Iberogast[®] und seine Komponenten lässt sich sagen, dass sich Iberogast[®] selbst in den verschiedenen Testsystemen als radikalfangend erwiesen hat, wobei die Einzelextrakte quantitativ sehr unterschiedlich stark wirksam waren. Man kann annehmen, dass diese Wirkungen auch zum therapeutischen Effekt von Iberogast[®] beitragen.

5.1.2 Wechselwirkungen zwischen den Einzelextrakten von Iberogast[®]

Aus dem bisher geschilderten Sachverhalt ergibt sich die Frage, in welcher Weise die Einzelextrakte zur Gesamtwirkung beitragen und ob Synergieeffekte dabei eine Rolle spielen.

Sowohl die Berechnung der Auslöschzeit von Iberogast[®] aus der der Einzel-extrakte als auch die Untersuchungen mit Mangelvarianten von Iberogast[®] in der AAPH-Reaktion deuten darauf hin, dass sich in diesem Testsystem die Wirkungen der Einzelextrakte additiv zur Gesamtwirkung zusammensetzen. Die Untersuchungen im Lungenmodell und im Leukozytenmodell (basale Radikalproduktion) dagegen deuten eher auf supraadditive Wechselwirkungen zwischen den Einzelextrakten hin. Dies zeigt sich darin, dass in beiden Systemen bei der Wirkung auf die nicht stimulierte Radikalproduktion große Unterschiede zwischen den berechneten und den gemessenen Effekten auftreten – die gemessene verbleibende Radikalproduktion beträgt nur 64 % bzw. 52 % des berechneten Wertes –, das heißt, dass supraadditive Wechselwirkungen vorliegen. Bei der Untersuchung der Extrakte auf die Radikalproduktion nach Stimulation mit Zymosan betrug der gemessene Wert 82 % des berechneten Wertes, sodass supraadditive Wechselwirkungen unwahrscheinlich sind. Dieser Befund könnte dadurch erklärt werden, dass die Radikalproduktion nach Zymosanstimulation anders reguliert wird und durch die Pflanzenextrakte in unterschiedlicher Weise beeinflusst wird. Eine Ursache für das unterschiedliche Verhalten der Extrakte in den chemischen und zellulären Testmodellen ist vermutlich die höhere Komplexität des Lungen- und Leukozytenmodells im Vergleich zur AAPH-Reaktion. Beide zellulären Modelle bieten den Extrakten mehr Angriffspunkte und ermöglichen verschiedene Wirkmechanismen. Ähnliche Effekte traten auch bei der Untersuchung der Synergismen von Phytodolor[®] auf (siehe Kapitel 5.3.2).

Auch in anderen Studien mit pflanzlichen Extrakten konnten synergistische antioxidative Effekte gefunden werden (Liu, 2003; Liu, 2004; Shobana and Naidu, 2000).

Die berichteten Wechselwirkungen bei Mehrstoffgemischen, wie Extrakten oder Extraktkombinationen, können demnach sowohl additiver als auch supra-additiver Natur sein. Vorteile des Einsatzes von Mehrstoffgemischen können sein, dass durch die geringere Dosierung der Einzelkomponenten das Nebenwirkungsrisiko deutlich reduziert oder sogar eliminiert werden kann und dass eine größere Wirksamkeit erreicht werden kann. Auch in der konventionellen Arzneimitteltherapie wird dieses Konzept umgesetzt. So stehen zum Beispiel für die Hypertonie-Behandlung eine Reihe verschiedener Kombinationspräparate zur Verfügung (u.a. Triamteren tri-comp. Sandoz[®], Moducrin[®]).

5.1.3 Vergleich der antioxidativen Wirkungen von isolierten Inhaltsstoffen und von Extrakten

In dieser Arbeit wurde für einige Extrakte untersucht, inwieweit deren antioxidatives Potential durch einzelne, isolierte Inhaltsstoffe erklärt werden kann.

Für den antioxidativen Effekt des Melissenblätterextraktes in der AAPH-Reaktion ist zu etwa 40 % die Rosmarinsäure verantwortlich. Die restlichen 60 % werden von anderen Inhaltsstoffen verursacht (siehe Kapitel 4.1.2.1). In der Literatur ist beschrieben, dass auch die Inhaltsstoffe Geraniol (Choi *et al.*, 2000), Kaffeesäure (Raneva *et al.*, 2001), Ferulasäure (Andreasen *et al.*, 2001), Oleanolsäure und Ursolsäure (Balanehru and Nagarajan, 1991) antioxidative Eigenschaften besitzen. Aesculetin ist ein starker Inhibitor der Xanthinoxidase (Chang and Chiang, 1995).

Dagegen leistet die Rosmarinsäure im Pfefferminzblätterextrakt nur einen geringen Beitrag (ca. 13 %) zur antioxidativen Kapazität in der AAPH-Reaktion (siehe Kapitel 4.1.2.1). Menthol als weiterer wichtiger Bestandteil des Extraktes fing keine Radikale ab. Neben Rosmarinsäure gibt es aber noch weitere Substanzen im Extrakt, die antioxidative Effekte besitzen, zum Beispiel Kaffeesäure (Raneva *et al.*, 2001), Ferulasäure (Andreasen *et al.*, 2001) und Pelargonidin (Kahkonen and Heinonen, 2003).

Beim Iberisextrakt trägt Kämpferol, aber nicht Kämpferol-3,4'-O-digluco-pyranosid-7-O-rhamnopyranosid, in der AAPH-Reaktion zum radikalfangenden Effekt bei. In der gleichen Reaktion wurden 22 verschiedene Iberisextrakte auf ihre antioxidativen Eigenschaften hin untersucht und die Auslöschzeiten mit den Gehalten der Inhaltsstoffe Kämpferol-3,4'-O-digluco-pyranosid-7-O-rhamnopyranosid, Cucurbitacin E und I, die von ihrer chemischen Struktur als potentielle Antioxidantien anzusehen sind, die aber nicht als isolierte Substanzen zur Verfügung standen, korreliert. Dabei wurde deutlich, dass keiner dieser Inhaltsstoffe für die radikalfangenden Effekte verantwortlich ist. Als mögliche Antioxidantien in Extrakten aus *Iberis amara* kommen ein Sinapinsäureester und Quercetin in Frage (Fabre *et al.*, 2000; Glasser *et al.*, 2002).

Die antioxidativen Effekte des Kümmelextraktes lassen sich nicht durch den wichtigen Inhaltsstoff Carvon erklären. Allerdings enthält der Kümmelextrakt Quercetin (Glasser *et al.*, 2002), Hydroxycumarin (Chang and Chiang, 1995), Chlorogen-, Kaffee-, Ferula- und Sinapinsäure, die alle antioxidative Eigenschaften besitzen (Andreasen *et al.*, 2001; Jung *et al.*, 1999; Raneva *et al.*, 2001).

Ähnlich verhielt es sich beim Angelikawurzelextrakt, bei dem Osthol in der AAPH-Reaktion keine Radikale abfing. Auch hier sind in der Literatur für andere Inhaltsstoffe wie Umbelliferon, Chlorogensäure und Kaffeesäure antioxidative Wirkungen beschrieben (Jung *et al.*, 1999; Raneva *et al.*, 2001; Toda, 2002).

Die im Schöllkrautextrakt enthaltenen Alkaloide Protopin und Chelidonin waren in der AAPH-Reaktion unwirksam bzw. zeigten prooxidative Effekte. Ein alkaloidfreier Schöllkrautextrakt hatte in der gleichen Reaktion etwas geringere radikalfangende Eigenschaften als der alkaloidhaltige Extrakt. Möglicherweise sind bei der Alkaloidextraktion auch antioxidative Komponenten entfernt worden. Eine weitere Erklärung könnte sein, dass die Alkaloide zwar selbst keine radikalfangende Wirkung besitzen, aber die Wirkung der vorhandenen Substanzen unterstützen (Franz, 2001).

Das im Süßholzwurzelextrakt enthaltene Glycyrrhizinsäure-Ammoniumsalz fing in der AAPH-Reaktion keine Radikale ab. Weitere Inhaltsstoffe wie Liquiritigenin, Glabridin und Glabren könnten allerdings die antioxidative Wirkung des Süßholzwurzelextraktes erklären (Aviram and Fuhrman, 1998; Schöpke, 2003).

Im Gegensatz zum Mariendisteleextrakt, der deutlich radikalfangende Effekte aufwies, fing Silibinin keine Radikale ab, sondern war prooxidativ wirksam. Für weitere Inhaltsstoffe wie Apigenin, Quercetin und Taxifolin sind antioxidative Effekte beschrieben (Areias *et al.*, 2001; Fuchs and Milbradt, 1993; Glasser *et al.*, 2002). Allerdings wird in der Literatur auch erwähnt, dass Silybin unter bestimmten Bedingungen freie Radikale fangen kann (Silybin A und Silybin B werden zusammengefasst als Silibinin) (Valenzuela *et al.*, 1986).

Die Bedeutung der verschiedenen pflanzlichen Antioxidantien für die gesamte antioxidative Wirkung kommt auch in einer weiteren Untersuchung zum Ausdruck, in der gezeigt werden konnte, dass Vitamin C weniger als 0,4 % zur gesamten antioxidativen Aktivität von Äpfeln beiträgt (Liu, 2003).

In weiteren Tests wurden zusätzlich einige isolierte Inhaltsstoffe in der AAPH-Reaktion auf die Dosisabhängigkeit ihrer radikalfangenden Eigenschaften untersucht. Dabei wurde deutlich, dass die Flavonoide Kämpferol, Luteolin, Luteolin-7-glucosid, Apigenin-7-glucosid, Rutin-Trihydrat und Quercetin-Dihydrat und das Phenylpropanderivat Rosmarinsäure gleich stark oder stärker antioxidativ wirksam sind als Trolox. Bemerkenswerterweise fing ein Glycosid von Kämpferol (Kämpferol-3,4'-O-diglucoopyranosid-7-O-rhamnopyranosid), keine Radikale ab und Apigenin zeigte in dieser Reaktion prooxidative Effekte.

Diese Untersuchungen belegen, dass in den meisten Fällen die antioxidative Wirkung eines Extraktes nicht durch einen einzigen Inhaltsstoff beschrieben werden kann. Extrakte sind Vielstoffgemische und die Wirkung kommt durch die Gesamtheit aller enthaltenen Substanzen zustande. Die Inhaltsstoffe können selbst wirksam sein bzw. die anderen Wirkstoffe in deren Wirkung unterstützen. Die Forderung nach Arzneimitteln mit isolierten Pflanzeninhaltsstoffen scheint daher nicht sinnvoll, dagegen scheint in der weiteren Charakterisierung der anderen Pflanzeninhaltsstoffe noch ein großes Potential zu liegen.

5.1.4 Zur antioxidativen Wirksamkeit und Struktur der Flavonoide

Flavonoide können auf Grund ihrer Eigenschaft als Wasserstoff-Donatoren, ihrer phenolischen Hydroxylgruppen und chinoiden Ringstruktur als Antioxidantien agieren. Entscheidend dafür ist auch ihr Redoxpotential, wodurch Substanzen mit höherem Redoxpotential wie zum Beispiel Superoxid-, Hydroxyl- oder Peroxylradikale reduziert werden können. Die Stärke der antioxidativen Kapazität der Flavonoide hängt von bestimmten strukturellen Merkmalen ab. Ausgehend von einer Flavan-Grundstruktur sollte am Ring B eine Catecholstruktur vorliegen. Ferner sollte der Ring C eine Doppelbindung zwischen Position 2 und 3 haben, verbunden mit einer Ketogruppe an Position 4 und einer Hydroxylgruppe an Position 3. Weitere Hydroxylgruppen verstärken die radikalfangenden Eigenschaften. Die Bedeutung der Hydroxylgruppen wird besonders deutlich am Beispiel von Ring B: Gibt es eine zusätzliche Hydroxylgruppe zu den bereits vorhandenen zwei, so steigt die antioxidative Kapazität. Fehlt eine der zwei Hydroxylgruppen, so sinkt die antioxidative Kapazität. Glycosylierungen von Hydroxylgruppen können die radikalfangenden Effekte stark reduzieren (Pietta, 2000; Rice-Evans *et al.*, 2000).

Die antioxidativen Effekte der Flavonoide in der AAPH-Reaktion nahmen in folgender Reihenfolge ab: Quercetin-Dihydrat, Rutin-Trihydrat, Luteolin-7-glucosid, Luteolin, Kämpferol. Quercetin-Dihydrat erfüllt alle oben genannten Anforderungen für eine gute antioxidative Wirkung. Da bei Rutin-Trihydrat die OH-Gruppe an Position 3 durch die Glycosylierung blockiert ist, hatte es nicht die volle Wirkung wie das Aglykon Quercetin. Luteolin besitzt im Vergleich zu Quercetin-Dihydrat eine OH-Gruppe weniger (Position 3) und war daher auch schwächer antioxidativ wirksam. Überraschend war, dass Luteolin-7-glucosid stärker wirksam war als Luteolin, obwohl durch die Glycosylierung die Hydroxylgruppe an Position 7 ausgeschaltet ist. Kämpferol ist in dieser Reihe am schwächsten wirksam, da ihm die Catecholstruktur am Ring B fehlt. Kämpferol-3,4'-O-diglucoopyranosid-7-O-rhamnopyranosid zeigte in der AAPH-Reaktion keine Wirkung, was darauf zurückzuführen sein könnte, dass hier

sowohl die OH-Gruppen an den Positionen 3 und 7 als auch an der Position 4' blockiert waren.

Pietta beschrieb die Trolox-Equivalent-Antioxidant-Capacity (TEAC) für einige Flavonoide. Dafür wird die Fähigkeit von Flavonoiden zum Abfangen von Radikalen aus 2,2'-Azinobis(3-ethylbenzthiazolin-6-sulfonsäure) im Vergleich zu Trolox getestet. Quercetin hatte eine TEAC von 4,7 mM, Luteolin von 2,09 mM, Apigenin von 1,45 mM und Kämpferol von 1,34 mM. Es wurde also eine sehr ähnliche Abstufung in der Wirksamkeit gefunden, mit der Ausnahme, dass Apigenin in diesem System antioxidativ wirksam war (Pietta, 2000).

Bei Untersuchungen von Hirano et al. fing Apigenin im 1,1-Diphenyl-2-picrylhydrazyl-Test keine Radikale ab. In der AAPH-Reaktion war Apigenin prooxidativ wirksam. Am Beispiel von Apigenin wird wieder deutlich, dass Substanzen je nach Testsystem und somit abhängig vom Redoxpotential der Komponenten verschiedene Wirkungen zeigen können (Hirano *et al.*, 2001).

Gerade in der Gruppe der Flavonoide und der Phenolcarbonsäuren scheinen besonders viele Substanzen radikalfangende Eigenschaften zu besitzen. Da diese auch Bestandteile pflanzlicher Extrakte mit entzündungshemmender Wirkung sind, dürften sie auch mit zur antiinflammatorischen Wirkung beitragen.

5.2 Weidenrindenextrakte im Vergleich zu Extrakten aus Teufelskralle und Brennnesselblättern

5.2.1 Antioxidative Wirkungen von Extrakten aus Weidenrinde, Teufelskrallenwurzel und Brennnesselblättern in isolierten und zellulären radikalbildenden Systemen

Extrakte aus Weidenrinde, Teufelskrallenwurzel und Brennnesselblättern werden häufig zur Behandlung entzündlicher Erkrankungen des Bewegungsapparates eingesetzt. Da bei diesen Krankheiten reaktive Sauerstoffspezies eine wichtige Rolle spielen, stellte sich die Frage, ob bei allen drei Extrakten antioxidative Eigenschaften festgestellt werden können.

Dazu wurden die zu untersuchenden Extrakte in den verschiedenen Testsystemen charakterisiert.

In den rein chemischen Testsystemen, wie der AAPH- und der Xanthin/-Xanthinoxidase-Reaktion, zeigten sowohl der wässrige als auch der ethanolinische Extrakt aus Weidenrinde die stärksten radikalfangenden Effekte, gefolgt vom Extrakt aus Teufelskrallenwurzel. Mit Abstand am wenigsten wirksam war der Brennnesselblätterextrakt. Insgesamt fingen aber alle vier Extrakte in beiden Systemen Radikale ab. Interessant dabei ist, dass die Extrakte im Vergleich untereinander in beiden Testsystemen eine ähnliche Abstufung der Wirksamkeit zeigten. Die Extrakte scheinen also bezüglich der Interaktion mit den Radikalen sehr unselektiv zu sein.

In einem Testsystem, bestehend aus der Xanthin/Xanthinoxidase-Reaktion, aber mit der Oxidation von Hydroxylamin zu Nitrit als Analysenparameter, wurde von Milde (2004) eine ähnliche Abstufung der Wirksamkeit gefunden: Die Extrakte aus Weidenrinde und Teufelskrallenwurzel hemmten die Nitrit-Bildung signifikant, der Brennnesselblätterextrakt war nur schwach wirksam (Milde, 2004).

Im komplexeren Lungenmodell senkten nur der ethanolinische und der wässrige Weidenrindenextrakt die verbleibende Radikalproduktion, die Extrakte aus Teufelskrallenwurzel und Brennnesselblättern erhöhten sie.

Im Vollblutmodell zeigten die Extrakte aus Teufelskrallenwurzel und Brennnesselblättern keine Effekte auf die basale Radikalproduktion. Diese wurde nur durch die Weidenrindenextrakte gesenkt. Nach Stimulation der Blutleukozyten mit Zymosan waren die Extrakte aus Weidenrinde und Brennnesselblättern antioxidativ wirksam, der Teufelskrallenwurzelextrakt dagegen erhöhte die Radikalproduktion. Im Leukozytenmodell wiesen die Extrakte aus Weidenrinde (ethanolisch) und Teufelskrallenwurzel im Bezug auf die basale Radikalproduktion den stärksten antioxidativen Effekt auf. Der Brennnesselblätterextrakt dagegen steigerte die basale Radikalproduktion. Die Radikalproduktion nach Stimulation mit Zymosan wurde von den Extrakten aus Weidenrinde und Brennnesselblättern gesenkt.

Daraus wird deutlich, dass nur die Extrakte aus Weidenrinde eindeutig radikalfangende Effekte in den zellulären Systemen aufweisen. Für die Extrakte aus Teufelskrallenwurzel und Brennnesselblättern sind auf Grund des unterschiedlichen Verhaltens in den Testmodellen nur begrenzte Aussagen möglich.

Welche Inhaltsstoffe könnten in diesen Extrakten für die antioxidativen Effekte verantwortlich sein? Obwohl auch in Extrakten aus Teufelskrallenwurzel und Brennnesselblättern antioxidative Inhaltsstoffe gefunden wurden (Kämpferol, Luteolin (siehe Kapitel 4.1.2), Quercetin (Glasser *et al.*, 2002), Isorhamnetin (Yamamoto *et al.*, 1999), Acteosid, Isoacteosid (Chiou *et al.*, 2004; Wong *et al.*, 2001), Sitosterol (Yoshida and Niki, 2003), Kaffee-, Ferula-, Chlorogensäure (Andreasen *et al.*, 2001; Jung *et al.*, 1999; Raneva *et al.*, 2001)), soll nur auf Weidenrinde näher eingegangen werden.

Weidenrinde enthält Salicin in Form seiner Ester Tremulacin, Acetylsalicortin und Salicortin, die aber während der Extraktion gespalten werden. Im Körper kommt es zu einer Glycosidspaltung von Salicin, wobei Saligenin entsteht und nach anschließender Oxidation Salicylsäure. Daneben enthält Weidenrinde noch Flavonoide wie Naringenin-, Quercetin-, Luteolin-Glycoside, Chalkone wie Isosalipurposid, Säuren wie Cumar-, Kaffee-, Ferulasäure, Catechin und Gerbstoffe (Meier, 2004; Wagner *et al.*, 2003; Wichtl, 2002). Für Naringenin,

Quercetin, Luteolin, Catechin und Cumar-, Kaffee- und Ferulasäure sind bereits antioxidative Effekte nachgewiesen (Andreasen *et al.*, 2001; Glasser *et al.*, 2002; Milde, 2004; Pietta, 2000; Raneva *et al.*, 2001). Dagegen hatte Salicylsäure keine oder nur sehr schwache radikalfangende Effekte und scheint damit für die antioxidative Wirkung nicht von großer Bedeutung zu sein. Durch die im nachfolgenden Kapitel 5.2.2 weiter diskutierte Untersuchung der unterschiedlich polaren Fraktionen A bis E konnte festgestellt werden, dass die Fraktionen, die reich an Flavonoiden und Polyphenolen waren, auch die stärksten antioxidativen Effekte aufwiesen. Zusammen mit den Untersuchungen zu den isolierten Inhaltsstoffen in den Einzalextrakten von Iberogast[®], durch die gezeigt werden konnte, dass Flavonoide starke Radikalfänger sein können, kann vermutet werden, dass gerade die Flavonoide auch bei der Weidenrinde für einen Großteil der antioxidativen Wirkung verantwortlich sind.

5.2.2 Vergleich der antioxidativen Effekte eines Weidenrindenextraktes mit denen seiner durch sequentielle Extraktion entstandenen verschieden polaren Fraktionen

Die verschieden polaren Fraktionen A bis E wurden in verschiedenen Testsystemen auf ihr radikalfangendes Potential hin untersucht, um heraus zu finden, welche Gruppen von Inhaltsstoffen für den antioxidativen Effekt der Extrakte verantwortlich sind.

Sowohl in den rein chemischen Testsystemen als auch im zellulären System mit Schweinelunge waren die Fraktionen A und B, die mit lipophilen Extraktionsmitteln (Toluol, Ethylacetat) gewonnen wurden, stärker wirksam als der Ursprungsextrakt WEI (w), die Fraktionen C, D, E, die mit hydrophileren Extraktionsmitteln (Butanol, Ethanol, Wasser) gewonnen wurden, schwächer wirksam als der Ursprungsextrakt.

Milde untersuchte dieselben Fraktionen im Modell der Xanthin/ Xanthinoxidase-Reaktion mit Hydroxylamin-Oxidation. Auch hier zeigte sich, dass die Fraktionen A und B wirksamer als der Ursprungsextrakt waren. Die Fraktion D war deutlich schwächer antioxidativ wirksam, die Fraktionen E und C etwa gleich stark wirksam wie der Ursprungsextrakt (Milde, 2004).

Vergleicht man diese Ergebnisse mit den HPLC-Analysen, so scheinen vor allem Flavonoide und Polyphenole für den radikalfangenden Effekt der Extrakte verantwortlich zu sein.

Werden aber andere Parameter zum Wirksamkeitsnachweis gewählt, können sich ganz andere Relationen ergeben:

Wurde zum Beispiel der Einfluss der Fraktionen auf Enzymaktivitäten betrachtet, hatten die Fraktionen A und E den größten hemmenden Einfluss auf die Aktivität der Cyclooxygenase 1 (COX 1) und der humanen Leukozytenelastase (HLE), die Cyclooxygenase 2 (COX 2) wurde am stärksten von den Fraktionen A und B, die Lipoxygenase (LOX) von den Fraktionen B und C gehemmt (Jäggi *et al.*, 2003). Bonaterra *et al.* testeten den hemmenden Effekt der Fraktionen auf die INF-gamma-LPS-stimulierte Nitrit-Freisetzung bei

humanen Monozyten. In diesem Modell zeigte Fraktion E eine deutlich stärkere Hemmung der Nitrit-Freisetzung als die lipophileren Fraktionen (Bonaterra *et al.*, 2003).

Diese Ergebnisse zeigen, dass sich antioxidative Eigenschaften pflanzlicher Extrakte auf bestimmte Inhaltsstoffe zurückführen lassen, aber vermutlich nur eine Wirkkomponente von Entzündungshemmern sind. Alternative Wirkungen, wie zum Beispiel Enzymhemmungen, werden vermutlich durch andere Inhaltsstoffe bewirkt.

5.2.3 Multivariate Datenanalyse

Die Korrelation von analytischen Daten mit pharmakologischen Daten mittels multivariater Datenanalyse könnte für zahlreiche industrielle Zwecke genutzt werden. Einsatzgebiete könnten zum Beispiel Qualitätskontrollen oder Screeningprozesse sein. Allerdings müssen dafür die Ergebnisse reproduzierbar, exakt und verlässlich sein. Im Folgenden werden nun einige Untersuchungen vorgestellt, in denen dieses Verfahren angewendet wurde.

Wie in Kapitel 4.2.3 dargestellt, konnten die chromatographischen Daten (HPLC und HPTLC) der Weidenrindenextrakte gut mittels multivariater Datenanalyse mit den pharmakologischen Daten zum antioxidativen Potential (AAPH-Reaktion und Xanthin/ Xanthinoxidase-Reaktion) korreliert werden. Sowohl bei der externen als auch bei der internen Validierung konnten gute Vorhersagen getroffen werden (PLS-1-Algorithmus).

Mit Hilfe der multivariaten Datenanalyse wurden für Johanniskrautextrakte HPTLC-Daten bzw. Daten aus der H-NMR-Spektroskopie mit Daten aus Opioidrezeptor-Bindungsstudien korreliert. In beiden Untersuchungen war eine Vorhersage der Wirkungen der Extrakte für ein externes Testset möglich (Roos *et al.*, 2004; Wuthold, 2004).

Aus diesen Untersuchungen wird deutlich, dass dieses Verfahren gute Vorhersageergebnisse liefert, wenn bestimmte Voraussetzungen erfüllt sind: So sollte eine ausreichende Probenzahl und Variabilität der Extrakte vorhanden sein, um das Modell zu erstellen, und die pharmakologischen Methoden sollten keine zu großen Standardabweichungen aufweisen (Wuthold, 2004). Außerdem muss darauf geachtet werden, dass die zur Modellerstellung verwendeten Extrakte unter den gleichen Extraktionsbedingungen hergestellt wurden wie die zu voraussagenden Extrakte (Roos *et al.*, 2004).

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass die Korrelation von analytischen und pharmakologischen Daten mittels multivariater Datenanalyse eine brauchbare Methode ist, um die Wirkung von Extrakten nur auf Grund der Analytik vorherzusagen.

5.3 Phytodolor[®]

5.3.1 Antioxidative Wirksamkeit von Phytodolor[®] und seiner Einzelextrakte

Wie in Kapitel 4.3.1 beschrieben, fingen sowohl Phytodolor[®] als auch seine Einzelextrakte Radikale, die in der AAPH-Reaktion gebildet wurden, ab. Dabei zeigte der Extrakt aus Eschenrinde den größten antioxidativen Effekt, gefolgt vom Pappelextrakt und Phytodolor[®]. Den geringsten Einfluss hatte in diesem System der Extrakt aus Goldrute.

Phytodolor[®] und seine Einzelextrakte wurden von Hartwich et al. (2005), Strehl et al. (1995) und Meyer et al. (1995) in weiteren Untersuchungen auf ihre antioxidativen Eigenschaften hin getestet, die kurz beschrieben werden sollen:

Im Leukozytenmodell (identisch mit dem in dieser Arbeit vorgestellten Testverfahren) zeigten die vier Extrakte nur einen geringen Einfluss auf die basale Radikalproduktion der Leukozyten. Dagegen wurde die Radikalproduktion der Leukozyten nach Stimulation mit Zymosan von allen vier Extrakten deutlich gehemmt. Phytodolor[®] zeigte eine Hemmung von 52 %, Pappel von 37 %, Esche von 30 % und Goldrute von 25 % (Hartwich et al., 2005).

Im Modell der Dihydrofolat-Reduktase (DHFR), die bei der Übertragung von C1-Einheiten und somit bei der Biosynthese von Purinen und Aminosäuren eine wichtige Rolle spielt, führten Phytodolor[®] und seine Einzelextrakte zu signifikanten Hemmungen: Die gefundenen IC₅₀-Werte waren für Esche, Phytodolor[®], Pappel bzw. Goldrute 0,26 %, 0,3 %, 0,46 % bzw. 0,6 % (alle v/v) (Strehl et al., 1995).

Im Xanthinoxidase-System kam die antioxidative Wirkung sowohl durch Einfluss der Extrakte auf das Enzym selbst zustande als auch durch radikalfangende Effekte. Vor allem der Extrakt aus Pappel zeigte einen deutlicheren Einfluss auf die Xanthinoxidase, die Extrakte aus Goldrute und Esche fingen eher Radikale ab. Die IC₅₀-Werte im Bezug auf das Abfangen von Hydroxylradikalen waren für Esche 0,1 % (v/v), Pappel 0,2 % (v/v), Goldrute 0,2-1 % (v/v), Phytodolor[®] 1,0-2,0 % (v/v) (Meyer et al., 1995).

Bei diesen Untersuchungen zu den antioxidativen Effekten der Extrakte wurde deutlich, dass der Goldrutenkrautextrakt in allen Systemen wenig wirksam war, der Pappelextrakt ein mittleres antioxidatives Potential zeigte und dass der Extrakt aus Eschenrinde starke Effekte zeigte mit Ausnahme im Leukozytenmodell. Auf mögliche Wechselwirkungen zwischen den verschiedenen Einzelextrakten wird im Abschnitt 5.3.2 eingegangen.

5.3.2 Wechselwirkungen zwischen den Einzelextrakten von Phytodolor[®]

Die Einzelextrakte von Phytodolor[®] (Pappel-, Eschenrinden-, Goldrutenkraut-extrakt) zeigten wie auch die Einzelextrakte von Iberogast[®] in der AAPH-Reaktion additive Wechselwirkungen. Bei allen 21 Mischungen, bei denen die Einzelextrakte in verschiedenen Verhältnissen eingesetzt wurden, konnten nur geringe oder keine Abweichungen zwischen den berechneten und gemessenen Werten gefunden werden.

Im Leukozytenmodell wurden die Wechselwirkungen zwischen den Einzel-extrakten ebenfalls untersucht. Wie in Kapitel 5.3.1 beschrieben, hatten Phyto-dolor[®] und seine Einzelextrakte vor allem einen Einfluss auf die Radikal-produktion (%) der Leukozyten nach Stimulation mit Zymosan. Die Unter-suchungen deuten auf supraadditive Wechselwirkungen zwischen den drei Ein-zelextrakten hin (Hartwich *et al.*, 2005).

Je nach Testmodell und Extrakt können also ganz verschiedene Wirkmecha-nismen der Extrakte beobachtet werden. Damit lassen sich auch die unterschiedlichen Wirkstärken der einzelnen Extrakte in den verschiedenen Modellen erklären.

Auch hier wurde, wie bei den Untersuchungen zu Iberogast[®], deutlich, dass in komplexeren Testmodellen, die mehr Angriffspunkte und Interaktionsmöglich-keiten bieten, die Wechselwirkungen eher supraadditiver Art zu sein scheinen. Da diese zellulären Systeme eher den Vorgängen im Organismus entsprechen, kann vermutet werden, dass diese supraadditiven Wechselwirkungen auch therapeutisch von Bedeutung sind.

6 Zusammenfassung

Bei entzündlichen Erkrankungen des Magen-Darm-Trakts wie Gastritis, Reizmagen und Reizdarm und bei entzündlichen Gelenkerkrankungen spielen reaktive Sauerstoffspezies eine wichtige Rolle. Da zur Behandlung häufig Phytopharmaka eingesetzt werden, wurden Iberogast[®] und seine Einzelextrakte, Extrakte aus Weidenrinde, Teufelskrallenwurzel, Brennnesselblättern und Phytodolor[®] und seine Einzelextrakte sowohl in rein chemischen Testsystemen (AAPH-Reaktion, Xanthin/ Xanthinoxidase-Reaktion) als auch in zellulären Modellen (Lungen-, Vollblut-, Leukozytenmodell) auf ihre radikalfangenden Eigenschaften hin untersucht.

Für das Magen-Darm-Therapeutikum Iberogast[®] und seine neun pflanzlichen Komponenten wurden in allen Testmodellen radikalfangende Effekte gefunden, wobei die Extrakte je nach Testsystem unterschiedlich stark wirksam waren. In den chemischen Testsystemen und im Lungenmodell war der Extrakt aus Pfefferminzblättern am wirksamsten. Im Leukozytenmodell senkte der Extrakt aus Kamillenblüten die verbleibende basale Radikalproduktion am stärksten, die Radikalproduktion nach Stimulation mit Zymosan wurde am stärksten durch den Pfefferminzblätterextrakt reduziert. Um die radikalfangenden Eigenschaften von Extrakten zu charakterisieren, sollten diese also immer in verschiedenen Testsystemen geprüft werden.

Zusätzlich wurde der Frage nachgegangen, ob in Vielstoffgemischen wie Iberogast[®] hemmende oder aktivierende Wechselwirkungen zwischen den Einzelextrakten auftreten. Die Ergebnisse deuteten in den chemischen Modellen auf additive, in den zellulären Systemen auf supraadditive Wechselwirkungen hin, was eventuell an der höheren Komplexität der zellulären Modelle liegt. Auf Grund dieser Ergebnisse scheint der Einsatz solcher Vielstoffgemische in vielen Fällen der Verwendung von Einzelsubstanzen überlegen zu sein, eine Erkenntnis, die auch in der konventionellen Arzneimitteltherapie bei multifaktoriellen Erkrankungen, wie der Hypertonie, wieder zunehmend Anwendung findet.

Exemplarische Untersuchungen zu einzelnen isolierten Inhaltsstoffen der Einzelextrakte von Iberogast[®] zeigten große Unterschiede zwischen dem antioxidativen Verhalten des jeweiligen Gesamtextraktes im Vergleich zur Wirkung der isolierten Substanz, sodass in der Regel die Wirkung eines Extraktes nicht durch einen einzelnen Inhaltsstoff zustande kommt.

Auch die bei entzündlichen Gelenkerkrankungen eingesetzten Extrakte aus Weidenrinde (ethanolisch und wässrig), Teufelskrallenwurzel und Brennnesselblättern wurden in verschiedenen Testsystemen auf ihre radikalfangenden Eigenschaften untersucht. In den chemischen Modellen fingen alle vier Extrakte Radikale ab, wobei die Extrakte aus Weidenrinde die stärksten Wirkungen hatten, der Brennnesselblätterextrakt die schwächsten. In den zellulären Modellen konnte nur für Weidenrinde eine eindeutige antioxidative Wirkung gefunden werden.

Die Untersuchung verschieden polarer Fraktionen des wässrigen Weidenrindenextraktes auf ihr radikalfangendes Potential in verschiedenen Testsystemen deutete darauf hin, dass sich die antioxidativ wirksamen Substanzen in den lipophilen Fraktionen anreicherten. So scheinen vor allem Polyphenole für den radikalfangenden Effekt verantwortlich zu sein. Da auch die anderen Fraktionen zum Beispiel Enzym hemmende Wirkungen zeigten, sollte weiter untersucht werden, welcher Anteil der antiinflammatorischen Wirkung den verschiedenen Fraktionen zuzuschreiben ist. Damit könnte geklärt werden, ob Entzündungshemmung entweder durch antioxidative Mechanismen oder COX-Hemmung oder nur synergistisch erreicht wird.

Um bei komplexen Wirkstoffgemischen, wie sie in pflanzlichen Extrakten vorliegen, aus analytischen Daten pharmakologische Wirkungen vorhersagen zu können, wurde in Zusammenarbeit mit Frau Dr. K. Wuthold, Pharmazeutische Chemie, Universität Tübingen, ein neuartiges Verfahren angewandt, bei dem für verschiedene Weidenrindenextrakte analytische Daten (HPLC, HPTLC) mit pharmakologischen Daten (antioxidative Effekte) mittels multivariater Datenanalyse korreliert wurden. Die Ergebnisse zeigten, dass dieses

Verfahren gut geeignet ist, um die pharmakologische Wirkung von Extrakten nur mit Hilfe der Analytik vorzuberechnen.

Auch Phytodolor[®], das bei rheumatischen Erkrankungen und Neuralgien eingesetzt wird, und seine Einzelextrakte waren in der AAPH-Reaktion als Radikalfänger wirksam, wobei der Extrakt aus Eschenrinde den stärksten Effekt zeigte, der Goldrutenkrautextrakt den schwächsten. Bei der Untersuchung der Wechselwirkungen zwischen den Einzelextrakten von Phytodolor[®] in der AAPH-Reaktion deuteten die Ergebnisse auf eine additive Verstärkung hin. In komplexeren Modellen, wie dem Leukozytenmodell, scheinen supraadditive Wechselwirkungen aufzutreten.

Wenn diese in vitro gefundenen antioxidativen Wirkungen der verschiedenen Extrakte auch in vivo bestätigt werden, kann man annehmen, dass ein Teil der antiinflammatorischen Wirkungen der Extrakte auch über diesen Mechanismus zustande kommt, zumindest, dass damit entsprechende pleiotrope Effekte verbunden sind. Allerdings muss bei einer Therapie mit Antioxidantien auch immer bedacht werden, dass bei einer zu hohen Dosierung des Radikalfängers eventuell auch physiologische Aufgaben der ROS nicht mehr erfüllt werden und entsprechende Nebenwirkungen auftreten könnten.

7 Literaturverzeichnis

Andreasen,M.F., Landbo,A.K., Christensen,L.P., Hansen,A. and Meyer,A.S. (2001) *Antioxidant effects of phenolic rye (Secale cereale L.) extracts, monomeric hydroxycinnamates, and ferulic acid dehydrodimers on human low-density lipoproteins.* J. Agric. Food Chem., 49, 4090-4096.

Areias,F.M., Rego,A.C., Oliveira,C.R. and Seabra,R.M. (2001) *Antioxidant effect of flavonoids after ascorbate/Fe(2+)-induced oxidative stress in cultured retinal cells.* Biochem. Pharmacol., 62, 111-118.

Arrigoni-Martelli,E. (1985) *Pharmacology of free radical scavenging in inflammation.* Int. J. Tissue React., 7, 513-519.

Aviram,M. and Fuhrman,B. (1998) *Polyphenolic flavonoids inhibit macrophage-mediated oxidation of LDL and attenuate atherogenesis.* Atherosclerosis, 137 Suppl, S45-S50.

Babior,B.M. (1978) *Oxygen-dependent microbial killing by phagocytes (first of two parts).* N. Engl. J. Med., 298, 659-668.

Balanehru,S. and Nagarajan,B. (1991) *Protective effect of oleanolic acid and ursolic acid against lipid peroxidation.* Biochem. Int., 24, 981-990.

Barbara,G., De Giorgio,R., Stanghellini,V., Cremon,C. and Corinaldesi,R. (2002) *A role for inflammation in irritable bowel syndrome?* Gut, 51 Suppl 1, i41-i44.

Bonaterra,G.A., Kelber,O., Kinscherf,R., Weiser,D. and Metz,J. (2003) *Willow bark extract STW 33-I inhibits lipopolysaccharide-induced pro-inflammatory effects in human monocytes.* Poster. 8th World Congress of the OsteoArthritis Research Society International, Berlin, 12. -15. Oktober 2003.

Bruchelt,G. and Schmidt,K.H. (1984) *Comparative studies on the oxidative processes during phagocytosis measured by luminol-dependent chemiluminescence.* J. Clin. Chem. Clin. Biochem., 22, 1-13.

Brune,K. (2002) *Medikamentöse Therapie heute.* In Laufer S. , Gay S. , Brune K. (Hrsg.): Rheumatische Erkrankungen und Entzündung. Georg Thieme Verlag, Stuttgart, 59-83.

Cerutti,P.A. (1994) *Oxy-radicals and cancer.* Lancet, 344, 862-863.

Chang,W.S. and Chiang,H.C. (1995) *Structure-activity relationship of coumarins in xanthine oxidase inhibition.* Anticancer Res., 15, 1969-1973.

Chapple,I.L. (1997) *Reactive oxygen species and antioxidants in inflammatory diseases*. J. Clin. Periodontol., 24, 287-296.

Chiou,W.F., Lin,L.C. and Chen,C.F. (2004) *Acteoside protects endothelial cells against free radical-induced oxidative stress*. J Pharm. Pharmacol., 56, 743-748.

Choi,H.S., Song,H.S., Ukeda,H. and Sawamura,M. (2000) *Radical-scavenging activities of citrus essential oils and their components: detection using 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl*. J. Agric. Food Chem., 48, 4156-4161.

Chrubasik,S. (2000) *Weidenrindenextrakt: Wirkmechanismus und klinische Wirksamkeit*. Deutsche Apothekerzeitung, 140, 83-85.

Chrubasik,S. (2004) *Osteoarthritis: Pharmacology and clinical indications of selected botanicals*. The Pain Clinic, 16, 1-16.

Chrubasik,S., Kunzel,O., Model,A., Conradt,C. and Black,A. (2001) *Treatment of low back pain with a herbal or synthetic anti-rheumatic: a randomized controlled study. Willow bark extract for low back pain*. Rheumatology. (Oxford), 40, 1388-1393.

Chrubasik,S. and Pollak,S. (2002) *[Pain management with herbal antirheumatic drugs]*. Wien. Med. Wochenschr., 152, 198-203.

Collins,S.M., Piche,T. and Rampal,P. (2001) *The putative role of inflammation in the irritable bowel syndrome*. Gut, 49, 743-745.

Di Virgilio,F. (2004) *New pathways for reactive oxygen species generation in inflammation and potential novel pharmacological targets*. Curr. Pharm. Des, 10, 1647-1652.

Drath,D.B. and Karnovsky,M.L. (1975) *Superoxide production by phagocytic leukocytes*. J. Exp. Med., 141, 257-262.

Dworski,R. (2000) *Oxidant stress in asthma*. Thorax, 55 Suppl 2, S51-S53.

el Ghazaly,M., Khayyal,M.T., Okpanyi,S.N. and Arens-Corell,M. (1992) *Study of the anti-inflammatory activity of Populus tremula, Solidago virgaurea and Fraxinus excelsior*. Arzneimittelforschung., 42, 333-336.

Fabre,N., Urizzi,P., Souchard,J.P., Frechard,A., Claparols,C., Fouraste,I. and Moulis,C. (2000) *An antioxidant sinapic acid ester isolated from Iberis amara*. Fitoterapia, 71, 425-428.

Fels,A.O. and Cohn,Z.A. (1986) *The alveolar macrophage*. J. Appl. Physiol, 60, 353-369.

Franz,G. (2001) *Zukunftsperspektiven für pflanzliche Extrakte*. Pharmazeutische Zeitung, 146, 488-494.

- Fuchs,J. and Milbradt,R.** (1993) *Skin anti-inflammatory activity of apigenin-7-glucoside in rats.* *Arzneimittelforschung.*, 43, 370-372.
- Fuhrman,B. and Aviram,M.** (2001) *Flavonoids protect LDL from oxidation and attenuate atherosclerosis.* *Curr. Opin. Lipidol.*, 12, 41-48.
- Ghosh,P. and Smith,M.** (2002) *Osteoarthritis, genetic and molecular mechanisms.* *Biogerontology.*, 3, 85-88.
- Glasser,G., Graefe,E.U., Struck,F., Veit,M. and Gebhardt,R.** (2002) *Comparison of antioxidative capacities and inhibitory effects on cholesterol biosynthesis of quercetin and potential metabolites.* *Phytomedicine.*, 9, 33-40.
- Grisham,M.B.** (1994) *Oxidants and free radicals in inflammatory bowel disease.* *Lancet*, 344, 859-861.
- Gwee,K.A., Collins,S.M., Read,N.W., Rajnakova,A., Deng,Y., Graham,J.C., McKendrick,M.W. and Moochhala,S.M.** (2003) *Increased rectal mucosal expression of interleukin 1beta in recently acquired post-infectious irritable bowel syndrome.* *Gut*, 52, 523-526.
- Halliwell,B.** (1994) *Free radicals, antioxidants, and human disease: curiosity, cause, or consequence?* *Lancet*, 344, 721-724.
- Halliwell,B.** (1995) *Oxygen radicals, nitric oxide and human inflammatory joint disease.* *Ann. Rheum. Dis.*, 54, 505-510.
- Halliwell,B., Gutteridge,J.M. and Cross,C.E.** (1992) *Free radicals, antioxidants, and human disease: where are we now?* *J. Lab Clin. Med.*, 119, 598-620.
- Hartwich,A., Germann,I., Kelber,O., Weiser,D. and Heinle,H.** (2005) *Radikalabfangende Eigenschaften von antiinflammatorischen Phytotherapeutika.* *Abstract. Perfusion*, 18, 91.
- Heinle,H., Pascht,U., Kelber,O., Okpanyi,S.N. and Weiser,D.** (2004) *Untersuchungen zum Einfluss von STW 5 (Iberogast) und seinen Komponenten auf die Histamin-induzierte und spontane Kontraktilität des Meerschweinchen-Ileums in vitro.* Poster. Tagung der Deutschen Gesellschaft für Verdauungs- und Stoffwechselkrankheiten (DGVS) mit Sektion für Gastroenterologische Endoskopie, Leipzig, 1. -4. September 2004.
- Heldwein,W.** (2001) *Allgemeine und medikamentöse Behandlung des Reizdarmsyndroms.* *DBI Der Bayerische Internist* 21, 3, 152-159.
- Henrotin,Y.E., Bruckner,P. and Pujol,J.P.** (2003) *The role of reactive oxygen species in homeostasis and degradation of cartilage.* *Osteoarthritis. Cartilage.*, 11, 747-755.

- Hirano,R., Sasamoto,W., Matsumoto,A., Itakura,H., Igarashi,O. and Kondo,K.** (2001) *Antioxidant ability of various flavonoids against DPPH radicals and LDL oxidation.* J. Nutr. Sci. Vitaminol. (Tokyo), 47, 357-362.
- Hohenester,B., Rühl,A., Kelber,O. and Schemann,M.** (2004a) *Wirkungsweise von STW 5 (Iberogast) und die regionenspezifische Wirkung seiner Einzelkomponenten auf die Magenmotilität des Meerschweinchens.* Poster. Tagung der Deutschen Gesellschaft für Verdauungs- und Stoffwechselkrankheiten (DGVS) mit Sektion für Gastroenterologische Endoskopie, Leipzig, 1. -4. September 2004.
- Hohenester,B., Ruhl,A., Kelber,O. and Schemann,M.** (2004b) *The herbal preparation STW5 (Iberogast) has potent and region-specific effects on gastric motility.* Neurogastroenterol. Motil., 16, 765-773.
- Irani,K.** (2000) *Oxidant signaling in vascular cell growth, death, and survival : a review of the roles of reactive oxygen species in smooth muscle and endothelial cell mitogenic and apoptotic signaling.* Circ. Res., 87, 179-183.
- Jäggi,R., Büter,B., Grandjean,F., Berger-Büter,K., Kelber,O., Müller,J. and Weiser,D.** (2003) *Arthritis and inflammation: In vitro studies of multiple target inhibition with willow bark extract.* Poster. 8th World Congress of the OsteoArthritis Research Society International, Berlin, 12. -15 Oktober 2003.
- Jung,H.A., Park,J.C., Chung,H.Y., Kim,J. and Choi,J.S.** (1999) *Antioxidant flavonoids and chlorogenic acid from the leaves of Eriobotrya japonica.* Arch. Pharm. Res., 22, 213-218.
- Kahkonen,M.P. and Heinonen,M.** (2003) *Antioxidant activity of anthocyanins and their aglycons.* J. Agric. Food Chem., 51, 628-633.
- Khayyal,M.T., el Ghazaly,M.A., Kenawy,S.A., Seif-el-Nasr,M., Mahran,L.G., Kafafi,Y.A. and Okpanyi,S.N.** (2001) *Antiulcerogenic effect of some gastrointestinally acting plant extracts and their combination.* Arzneimittelforschung., 51, 545-553.
- Kohen,R. and Nyska,A.** (2002) *Oxidation of biological systems: oxidative stress phenomena, antioxidants, redox reactions, and methods for their quantification.* Toxicol. Pathol., 30, 620-650.
- Kountouras,J., Chatzopoulos,D. and Zavos,C.** (2001) *Reactive oxygen metabolites and upper gastrointestinal diseases.* Hepatogastroenterology, 48, 743-751.
- Kuhn,M.A.** (2003) *Oxygen free radicals and antioxidants.* Am. J. Nurs., 103, 58-62.
- Kuppusamy,P. and Zweier,J.L.** (1989) *Characterization of free radical generation by xanthine oxidase. Evidence for hydroxyl radical generation.* J. Biol. Chem., 264, 9880-9884.

Laufer,S. (2002) *Biochemie und Mediatoren der Entzündung*. In Laufer S. , Gay S. , Brune K. (Hrsg.): *Rheumatische Erkrankungen und Entzündung*. Georg Thieme Verlag, Stuttgart, 17-57.

Lissi,E., Pascual,C. and Del Castillo,M.D. (1992) *Luminol luminescence induced by 2,2'-Azo-bis(2-amidinopropane) thermolysis*. Free Radic. Res. Commun., 17, 299-311.

Liu,C.Y., Muller,M.H., Glatzle,J., Weiser,D., Kelber,O., Enck,P., Grundy,D. and Kreis,M.E. (2004) *The herbal preparation STW 5 (Iberogast) desensitizes intestinal afferents in the rat small intestine*. Neurogastroenterol. Motil., 16, 759-764.

Liu,R.H. (2003) *Health benefits of fruit and vegetables are from additive and synergistic combinations of phytochemicals*. Am. J. Clin. Nutr., 78, 517S-520S.

Liu,R.H. (2004) *Potential synergy of phytochemicals in cancer prevention: mechanism of action*. J. Nutr., 134, 3479S-3485S.

Maxwell,S.R. and Lip,G.Y. (1997) *Free radicals and antioxidants in cardiovascular disease*. Br. J. Clin. Pharmacol., 44, 307-317.

Meier,B. (2001) *Die Weidenrinde als Schmerz- und Rheumamittel vor einer Renaissance?* Phytotherapie - Schweizerische Medizinische Zeitschrift für Phytotherapie - für praktizierende Ärzte und Pharmazeuten, 4, 3-8.

Meier,B. (2004) *Salix*. In Blaschek W. , Ebel S. , Hackenthal E. , Holzgrabe U. , Keller K. , Reichling J. (Hrsg.): *Hager ROM 2004. Hagers Handbuch der Drogen und Arzneistoffe*. Springer, Heidelberg.

Meyer,B., Schneider,W. and Elstner,E.F. (1995) *Antioxidative properties of alcoholic extracts from Fraxinus excelsior, Populus tremula and Solidago virgaurea*. Arzneimittelforschung., 45, 174-176.

Milde,J. (2004) *Kooperative Wirkung pflanzlicher Antioxidantien in pathologisch relevanten Arteriosklerose- und Arthritismodellen*. Dissertation der Fakultät Wissenschaftszentrum Weihenstephan für Ernährung, Landnutzung und Umwelt der Technischen Universität München 2004.

Monographie der Kommission E Angelikawurzel (1990) *Monographie der Kommission E des BGA. Angelikawurzel*. Bundesanzeiger (1. 6. 1990).

Monographie der Kommission E Kamillenblüten (1990) *Monographie der Kommission E des BGA. Kamillenblüten*. Bundesanzeiger (13. 03. 1990).

Monographie der Kommission E Kümmel (1990) *Monographie der Kommission E des BGA. Kümmel*. Bundesanzeiger (1. 2. 1990).

Monographie der Kommission E Mariendistel Früchte (1986) *Monographie der Kommission E des BGA. Mariendistel Früchte*. Bundesanzeiger (13. 3. 1986).

Monographie der Kommission E Melissenblätter (1990) *Monographie der Kommission E des BGA. Melissenblätter.* Bundesanzeiger (13. 3. 1990).

Monographie der Kommission E Pfefferminzblätter (1990) *Monographie der Kommission E des BGA. Pfefferminzblätter.* Bundesanzeiger (13. 3. 1990).

Monographie der Kommission E Schöllkraut (1985) *Monographie der Kommission E des BGA. Schöllkraut.* Bundesanzeiger (15. 5. 1985).

Monographie der Kommission E Süßholzwurzel (1991) *Monographie der Kommission E des BGA. Süßholzwurzel.* Bundesanzeiger (21. 09. 1991).

Morton,L.W., Abu-Amsha,C.R., Puddey,I.B. and Croft,K.D. (2000) *Chemistry and biological effects of dietary phenolic compounds: relevance to cardiovascular disease.* Clin. Exp. Pharmacol. Physiol, 27, 152-159.

Muller-Peddinghaus,R. (1987) [*Pathophysiology and pharmacology of reactive oxygen species in inflammation*]. Arzneimittelforschung., 37, 589-600.

Nader-Djalal,N., Knight,P.R., III, Thusu,K., Davidson,B.A., Holm,B.A., Johnson,K.J. and Dandona,P. (1998) *Reactive oxygen species contribute to oxygen-related lung injury after acid aspiration.* Anesth. Analg., 87, 127-133.

Natella,F., Nardini,M., Di Felice,M. and Scaccini,C. (1999) *Benzoic and cinnamic acid derivatives as antioxidants: structure-activity relation.* J. Agric. Food Chem., 47, 1453-1459.

Nathan,C.F., Murray,H.W. and Cohn,Z.A. (1980) *The macrophage as an effector cell.* N. Engl. J. Med., 303, 622-626.

Nedeljkovic,Z.S., Gokce,N. and Loscalzo,J. (2003) *Mechanisms of oxidative stress and vascular dysfunction.* Postgrad. Med. J., 79, 195-199.

Okpanyi,S.N., Mark,M. and Wahl,M.A. (1993) *Gastrointestinal motility modulation with Iberogast.* Acta Horticulturae, 332, 227-235.

Okpanyi,S.N., Schirpke-von Paczensky,R. and Dickson,D. (1989) [*Anti-inflammatory, analgesic and antipyretic effect of various plant extracts and their combinations in an animal model*]. Arzneimittelforschung., 39, 698-703.

Piconi,L., Quagliario,L. and Ceriello,A. (2003) *Oxidative stress in diabetes.* Clin. Chem. Lab Med., 41, 1144-1149.

Pierce,J.D., Cackler,A.B. and Arnett,M.G. (2004) *Why should you care about free radicals?* RN., 67, 38-42.

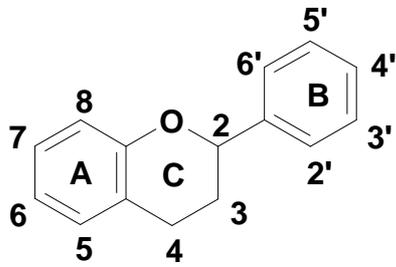
Pierer,M., Wagner,U., Häntzschel,H., Gay,R.E. and Gay,S. (2002) *Pathogenese entzündlich-rheumatischer Gelenkerkrankungen - eine aktuelle Bestandsaufnahme.* In Laufer S. , Gay S. , Brune K. (Hrsg.): Rheumatische Erkrankungen und Entzündung. Georg Thieme Verlag, Stuttgart, 1-15.

- Pietta,P.G.** (2000) *Flavonoids as antioxidants*. J. Nat. Prod., 63, 1035-1042.
- Raneva,V., Shimasaki,H., Ishida,Y., Ueta,N. and Niki,E.** (2001) *Antioxidative activity of 3,4-dihydroxyphenylacetic acid and caffeic acid in rat plasma*. Lipids, 36, 1111-1116.
- Reichling,J. and Saller,R.** (2002) *Iberis amara L. (bitter candytuft) - profile of a medical plant*. Forschende Komplementärmedizin und Klassische Naturheilkunde, 9 Suppl 1, 21-33.
- Renaud,S. and de Lorgeril,M.** (1992) *Wine, alcohol, platelets, and the French paradox for coronary heart disease*. Lancet, 339, 1523-1526.
- Rice-Evans,C.** (1995) *Plant polyphenols: free radical scavengers or chain-breaking antioxidants?* Biochem. Soc. Symp., 61, 103-116.
- Rice-Evans,C., Spencer,J.P., Schroeter,H. and Rechner,A.R.** (2000) *Bioavailability of flavonoids and potential bioactive forms in vivo*. Drug Metabol. Drug Interact., 17, 291-310.
- Roos,G., Roseler,C., Buter,K.B. and Simmen,U.** (2004) *Classification and correlation of St. John's wort extracts by nuclear magnetic resonance spectroscopy, multivariate data analysis and pharmacological activity*. Planta Med., 70, 771-777.
- Saller,R., Pfister-Hotz,G., Iten,F., Melzer,J. and Reichling,J.** (2002) *[Iberogast: a modern phytotherapeutic combined herbal drug for the treatment of functional disorders of the gastrointestinal tract (dyspepsia, irritable bowel syndrome)--from phytomedicine to "evidence based phytotherapy." A systematic review]*. Forsch. Komplementarmed. Klass. Naturheilkd., 9 Suppl 1, 1-20.
- Schempp,H., Hippeli,S., Weiser,D., Kelber,O. and Elstner,E.F.** (2004) *Comparison of the inhibition of myeloperoxidase-catalyzed hypochlorite formation in vitro and in whole blood by different plant extracts contained in a phytopharmakon treating functional dyspepsia*. Arzneimittelforschung., 54, 389-395.
- Schindelbeck,N.** (2001) *Definition, Epidemiologie, Pathogenese und Verlauf des Reizdarmsyndroms*. DBI Der Bayerische Internist 21, 3, 136-142.
- Schöpke,T.** (2003) *Glycyrrhiza*. In Blaschek W. , Ebel S. , Hackenthal E. , Holzgrabe U. , Keller K. , Reichling J. (Hrsg.): Hager ROM 2003. Hagers Handbuch der Drogen und Arzneistoffe. Springer, Heidelberg.
- Shobana,S. and Naidu,K.A.** (2000) *Antioxidant activity of selected Indian spices*. Prostaglandins Leukot. Essent. Fatty Acids, 62, 107-110.
- Siems,W., Krämer,K. and Grune,T.** (1996) *Zur Biochemie des Glutathionsystems: ein Überblick*. Pharmazeutische Zeitung, 45, 11-22.

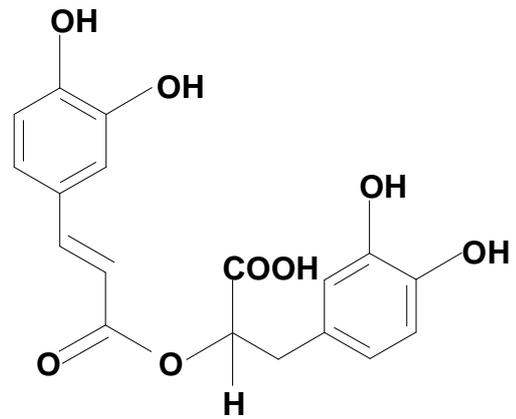
- Siems,W., Sommerburg,O., Mayer,H. and Grune,T.** (1998) *Die wichtigsten Radikalquellen im menschlichen Organismus*. Pharmazeutische Zeitung, 19, 11-25.
- Strehl,E., Schneider,W. and Elstner,E.F.** (1995) *Inhibition of dihydrofolate reductase activity by alcoholic extracts from Fraxinus excelsior, Populus tremula and Solidago virgaurea*. Arzneimittelforschung., 45, 172-173.
- Tieu,K., Ischiropoulos,H. and Przedborski,S.** (2003) *Nitric oxide and reactive oxygen species in Parkinson's disease*. IUBMB. Life, 55, 329-335.
- Toda,S.** (2002) *Inhibitory effects of phenylpropanoid metabolites on copper-induced protein oxidative modification of mice brain homogenate, in vitro*. Biol. Trace Elem. Res., 85, 183-188.
- Valenzuela,A., Guerra,R. and Videla,L.A.** (1986) *Antioxidant properties of the flavonoids silybin and (+)-cyanidanol-3: comparison with butylated hydroxyanisole and butylated hydroxytoluene*. Planta Med., 438-440.
- von Kruedener,S., Schneider,W. and Elstner,E.F.** (1995) *A combination of Populus tremula, Solidago virgaurea and Fraxinus excelsior as an anti-inflammatory and antirheumatic drug. A short review*. Arzneimittelforschung., 45, 169-171.
- Wagner,I., Biegert,C. and Heide,L.** (2003) *Phytoanalgetika - Aktuelle Forschungsergebnisse zur Weidenrinde*. Pharmazeutische Zeitung, 148, 21-32.
- Wichtl,M.** (2002) *Teedrogen und Phytopharmaka. Ein Handbuch für die Praxis auf wissenschaftlicher Grundlage*. 4. Auflage, Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft mbH, Stuttgart, 2002.
- Wong,I.Y., He,Z.D., Huang,Y. and Chen,Z.Y.** (2001) *Antioxidative activities of phenylethanoid glycosides from Ligustrum purpurascens*. J Agric. Food Chem., 49, 3113-3119.
- Wuthold,K.** (2004) *Multivariate Datenanalyse von Johanniskraut- und Weidenrindenextrakten: Chromatographische Verfahren in Korrelation zur Wirksamkeit*. Dissertation der Fakultät für Chemie und Pharmazie der Universität Tübingen 2004.
- Wuthold,K., Germann,I., Roos,G., Kelber,O., Weiser,D., Heinle,H. and Kovar,K.A.** (2004) *Thin-layer chromatography and multivariate data analysis of willow bark extracts*. J. Chromatogr. Sci., 42, 306-309.
- Yamamoto,N., Moon,J.H., Tsushida,T., Nagao,A. and Terao,J.** (1999) *Inhibitory effect of quercetin metabolites and their related derivatives on copper ion-induced lipid peroxidation in human low-density lipoprotein*. Arch. Biochem. Biophys., 372, 347-354.

Yoshida, Y. and Niki, E. (2003) *Antioxidant effects of phytosterol and its components*. J Nutr. Sci. Vitaminol. (Tokyo), 49, 277-280.

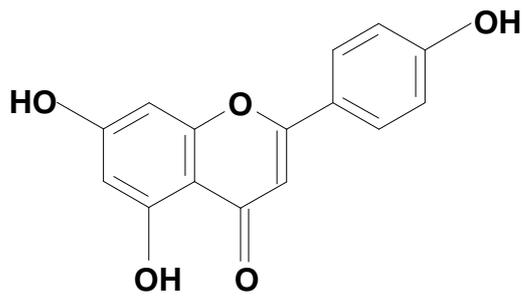
8 Anhang



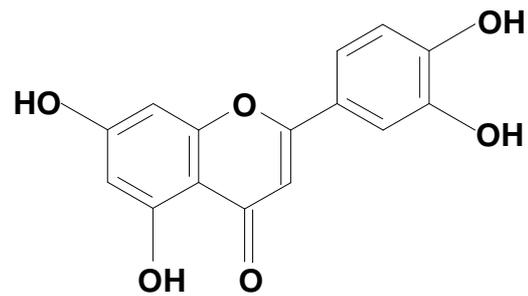
Flavan



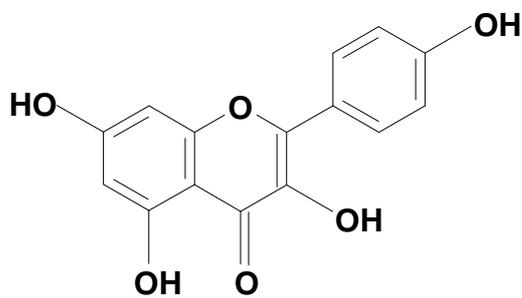
Rosmarinsäure



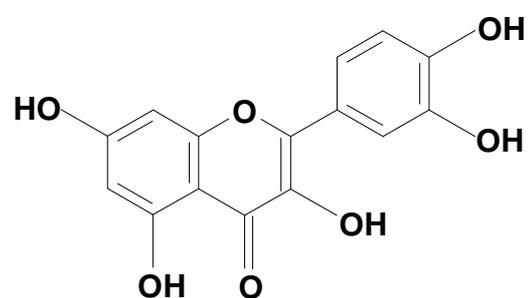
Apigenin



Luteolin



Kämpferol



Quercetin

9 Danksagung

Mein besonderer Dank gilt meinem Doktorvater Herrn Prof. Dr. Helmut Heinle für die Überlassung des interessanten Themas, die hervorragende Betreuung in allen Phasen der Arbeit, die günstigen Arbeitsbedingungen und die Möglichkeit der Teilnahme an Kongressen.

Herrn Prof. Dr. Stefan Laufer danke ich für die Betreuung der Arbeit in der Fakultät für Chemie und Pharmazie und die Übernahme des Referates.

Der Firma Steigerwald GmbH, Darmstadt, vor allem Herrn Dr. Dieter Weiser und Herrn Dr. Olaf Kelber, danke ich für die Unterstützung der Arbeit, die Überlassung der Extrakt-Proben, die Möglichkeit der Teilnahme an Kongressen und die gute Zusammenarbeit.

Ferner danke ich der Abteilung für Transfusionsmedizin in Tübingen für die Überlassung der Buffy Coats und der Metzgerei Kiesinger für die Überlassung der Schweinelungen.

Besonderer Dank gilt auch Frau Dr. Ute Brehme aus dem Institut für Arbeits- und Sozialmedizin für ihre hervorragende Unterstützung bei allen meinen Word- und Excelfragen, den Layoutproblemen und für ihre Hilfe bei der statistischen Auswertung.

Bei Frau Dr. Susanne Berchtold, Frau Dr. Angelika Lampert und Herrn Dr. Guido Henke bedanke ich mich ganz herzlich für die zahlreichen Blutabnahmen.

Frau Dr. Kim Wuthold danke ich für die gute Zusammenarbeit bei unserem Weidenprojekt.

Besonderer Dank gilt auch allen meinen sorgfältigen „Korrekturlesern“!

Ferner bedanke ich mich bei Herrn Uwe Schüler für die ausgezeichnete Hilfe bei Computerproblemen und beim gesamten Werkstattteam für die Unterstützung bei allen technischen Problemen.

Frau Inge Höltzel und allen meinen Kolleginnen und Kollegen in der Apotheke Rommelsbach danke ich ganz herzlich für die angenehme Zusammenarbeit und das Interesse am Fortgang meiner Arbeit.

Mein herzlicher Dank gilt allen meinen Kolleginnen und Kollegen für die angenehme Atmosphäre im Labor und die netten Gespräche in den Mess- und Mittagspausen und die Unterstützung beim Gelingen dieser Arbeit: Herrn Dr. Horst Apfel, Wolfram, Martin, Anneke, Felor, Uschi, Ninja, Daniela, Dayong, Reiner, Diana, Annette, Cristina, Philipp, Carolin.

Mein besonderer Dank gilt meinen Eltern für ihre rückhaltlose Unterstützung und ihren Beistand bei dieser Arbeit und darüber hinaus.

Meine akademischen Lehrer

Herr Prof. Dr. H.P.T. Ammon

Herr Dr. C. Beyer

Frau Prof. Dr. G. Drews

Herr Prof. Dr. G. Gauglitz

Herr Prof. Dr. P. Grabmayr

Herr Prof. Dr. L. Heide

Herr Prof. Dr. H. Heinle

Herr Prof. Dr. K.-A. Kovar

Herr Prof. Dr. S. Laufer

Herr Dr. E. Mechler

Herr PD Dr. H. Pommer

Herr PD Dr. H. Safayhi

Herr Prof. Dr. P.C. Schmidt

Herr Prof. Dr. J. Schulz

Herr Prof. Dr. M. Wahl

Herr Prof. Dr. A. Wankmüller

Herr Dr. W. Zimmermann

Lebenslauf

Persönliche Daten

Name	Ines Daniela Germann, Tochter von Gerwin Germann und Edda Germann, geb. Müller
Geburtstag	2.11.1975
Geburtsort	Reutlingen

Ausbildung

1982 - 1986	Grundschule Schillerschule, Reutlingen
1986 - 1995	Albert-Einstein-Gymnasium, Reutlingen
1995 - 2000	Studium der Pharmazie an der Eberhard-Karls-Universität, Tübingen
Mai - Okt. 2000	1. Praktikumshalbjahr in der Apotheke des Kreiskrankenhauses Reutlingen
Nov. 2000 - April 2001	2. Praktikumshalbjahr in der Rathausapotheke, Reutlingen
Juni 2001	Approbation als Apotheker

Berufliche Tätigkeit

Juli 2001 - Sept. 2002	Apotheke am Tübinger Tor, Reutlingen
Dezember 2002 -	Apotheke Rommelsbach, Reutlingen
Okt. 2002-	Anfertigung der Dissertation - Charakterisierung der radikalfangenden Eigenschaften pflanzlicher Entzündungshemmer - unter der Anleitung von Herrn Prof. Dr. Helmut Heinle im Physiologischen Institut der Eberhard-Karls-Universität, Tübingen