

**Zellbiologische und analytische Untersuchungen
zu Lektinen und Triterpenen der Mistel
(*Viscum album* L.)**

Dissertation zur Erlangung des akademischen Grades des
Doktors der Naturwissenschaften (Dr. rer. nat.)
eingereicht im Fachbereich Biologie, Chemie, Pharmazie
der Freien Universität Berlin

vorgelegt von
Dipl. Pharm. Katharina Mulsow
aus Schwerin
2016

Die vorliegende Arbeit wurde unter der Leitung von Herrn Prof. Dr. Matthias F. Melzig am Institut für Pharmazie der Freien Universität Berlin in der Zeit vom 01. 02. 2013 bis 10. 05. 2016 angefertigt.

Erster Gutachter: Prof. Dr. Matthias F. Melzig

Zweiter Gutachter: Prof. Dr. Hendrik Fuchs

Disputation am: 30.06.2016

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis	V
1 Einleitung	1
1.1 <i>Viscum album</i> L.	1
1.1.1 Inhaltsstoffe	2
1.1.1.1 Mistellektine	2
1.1.1.2 Viscotoxine	5
1.1.1.3 Triterpene	5
1.1.2 Pharmakologie	6
1.1.2.1 Mistellektine	7
1.1.2.2 Viscotoxine	8
1.1.2.3 Triterpensäuren	8
1.1.2.4 Therapie mit Fertigarzneimitteln	9
1.2 Zielsetzung	11
2 Materialien und Methoden	12
2.1 Geräte	12
2.1.1 Zellkultur	12
2.1.2 Zentrifugen	12
2.1.3 Waagen	12
2.1.4 GC / FID	13
2.1.5 Sonstige Geräte	13
2.1.6 Verbrauchsmaterialien	13
2.2 Chemikalien, Medien, Puffer und Extrakte	14
2.2.1 Zellkultur	14
2.2.2 ELISA-Quantifizierung	15
2.2.3 FACS-Analyse	16
2.2.4 GC / FID	16
2.2.5 HPLC	16
2.2.6 Fertigarzneimittel	16
2.2.7 Extrakte der Birken AG	17
2.3 Zelllinien	18
2.3.1 THP-1-Zelllinie	18
2.3.2 HL-60-Zelllinie	19
2.3.3 143B-Zelllinie	19
2.3.4 TC-71-Zelllinie	19
2.4 Methoden	20
2.4.1 Quantifizierung mittels ELISA	20
2.4.2 Mistellektin-Quantifizierung <i>ex vivo</i>	21

2.4.3	Liposomenherstellung	21
2.4.3.1	Filmethode	22
2.4.3.2	Extrusion mittels LiposoFast®	22
2.4.3.3	Charakterisierung der Liposomen	23
2.4.3.3.1	Photonenkorrelationspektroskopie	23
2.4.3.3.2	Zetapotential	24
2.4.3.3.3	Versuchsdurchführung	25
2.4.3.4	Verkapselungseffizienz	25
2.4.3.4.1	TT-Liposomen	25
2.4.3.4.2	ML-Liposomen	25
2.4.4	Zellbiologische Methoden	26
2.4.4.1	Kultivierung der Zellen	26
2.4.4.2	Durchflusszytometrie	27
2.4.4.2.1	Prinzip der Durchflusszytometrie	27
2.4.4.2.2	Untersuchung der Suspensionszelllinien	28
2.4.4.2.3	Untersuchung der adhärennten Zelllinien	28
2.4.4.3	Mistellektin-Aufnahme	29
2.4.4.3.1	Mistellektin-Standard, Viscum- und Triterpen-Extrakt-Chargen	29
2.4.4.3.2	Mistellektin- und Triterpen-Liposomen	32
2.4.4.4	iCelligence®-Messung – Impedanz-basierte Zellanalytik	32
2.4.4.5	MTT-Assay	34
2.4.4.6	Lebendzell-Mikroskopie (Live-cell-imaging)	35
2.4.4.6.1	Prinzip	35
2.4.4.6.2	Labeling	36
2.4.4.6.3	Durchführung der Lebendzell-Mikroskopie	36
2.4.5	GC / FID-Analytik	37
2.4.5.1	Probenvorbereitung	37
2.4.5.2	GC / FID-Methode	38
2.5	Statistische Methoden	39
3	Ergebnisse	40
3.1	Methodenkriterien ELISA	40
3.1.1	Interassay-Variabilität	40
3.1.2	Intraassay-Variabilität	40
3.1.3	Nachweis- und Bestimmungsgrenze	41
3.2	Mistellektin-Bestimmung	42
3.2.1	Bestimmung verschiedener Fertigarzneimittel	42
3.2.2	Bestimmung der Mistelextrakte der Birken AG	43
3.2.3	Mistellektin-Bestimmung <i>ex vivo</i>	43
3.2.4	Mistellektin-Quantifizierung <i>in vivo</i>	44
3.2.4.1	Mono-Versuch (Viscum-Extrakt)	44
3.2.4.2	Kombinationsversuch (ViscumTT-Extrakt)	46
3.3	Liposomenherstellung	48
3.3.1	Liposomengröße und Zetapotential	48
3.3.1.1	Triterpen-Liposomen	48
3.3.1.2	Mistellektin-Liposomen	49
3.3.2	Beladung und Verkapselungseffizienz	49
3.3.2.1	Triterpen-Liposomen	49
3.3.2.2	Mistellektin-Liposomen	51
3.4	Durchflusszytometrische Messungen	52

3.4.1	THP-1-Zelllinie	53
3.4.2	HL-60-Zelllinie	54
3.4.3	TC-71-Zelllinie	54
3.4.4	143B-Zelllinie	55
3.5	Mistellektinaufnahme	57
3.5.1	THP-1-Zelllinie	57
3.5.2	HL-60-Zelllinie	59
3.5.3	TC-71-Zelllinie	60
3.5.4	143B-Zelllinie	61
3.5.4.1	Einfluss von 2-Hydroxypropyl- β -Cyclodextrin auf die ML-Aufnahme	62
3.5.4.2	Mistellektinaufnahme aus den Liposomen	63
3.5.5	Vergleich der verschiedenen Zelllinien	65
3.6	Echtzeitanalyse der 143B-Zellen	67
3.6.1	Zugabe der Einzelkomponenten	67
3.6.1.1	Zugabe des Mistellektin-Standards	67
3.6.1.2	Zugabe der Viscum-Extrakt-Charge 155	69
3.6.1.3	Vergleich zwischen dem Mistellektin-Standard und der Viscum-Extrakt-Charge	71
3.6.1.4	Zugabe der Triterpen-Extrakt-Charge 155	72
3.6.2	Zugabe der Kombinationen	74
3.6.2.1	Kombination Mistellektin-Standard + Triterpen-Extrakt-Charge	74
3.6.2.1.1	Kombination Mistellektin-Standard + Triterpen-Extrakt-Charge mit konstanter Oleanolsäure-Konzentration	74
3.6.2.1.2	Kombination Mistellektin-Standard + Triterpen-Extrakt-Charge mit konstanter Mistellektin-Konzentration	77
3.6.2.2	Kombination Viscum- und Triterpen-Extrakt-Charge	79
3.6.2.3	Vergleich der Kombinationen Mistellektin-Standard + Triterpen-Extrakt-Charge und ViscumTriterpen-Extrakt-Charge	81
3.6.3	Zugabe der Liposomen	83
3.6.3.1	Zugabe der Mistellektin-Liposomen	83
3.6.3.2	Zugabe der Triterpen-Liposomen	84
3.6.3.3	Zugabe der Kombination aus Triterpen- und Mistellektin-Liposomen	86
3.7	Konfokale Mikroskopie	87
3.8	Oleanolsäure-Quantifizierung	95
3.8.1	Faktorbestimmung im organischen Lösungsmittel (Chloroform)	95
3.8.2	Faktorbestimmung in einer biologischen Matrix	96
3.8.3	Validierungsergebnisse im organischen Lösungsmittel	96
3.8.4	Validierungsergebnisse im Serum	99
3.8.5	Oleanolsäure-Quantifizierung <i>in vivo</i>	102
3.8.5.1	Mono-Versuch (TT-Extrakt)	103
3.8.5.2	Kombinationsversuch (ViscumTT-Extrakt)	104
4	Diskussion	106
4.1	Mistellektin-Quantifizierung mittels ELISA	106
4.1.1	Mistellektin-Gehalt verschiedener Fertigarzneimittel und Extrakte der Birken AG	107
4.1.2	Mistellektin-Quantifizierung <i>ex vivo</i>	109
4.1.3	Mistellektin-Quantifizierung <i>in vivo</i>	109

4.2	Liposomen	110
4.3	Mistellektinaufnahme	112
4.3.1	Mistellektin-Standard, Viscum-Extrakte mit und ohne Triterpen-Extrakte	112
4.3.2	Mistellektin-Liposomen mit und ohne Triterpen-Liposomen	114
4.4	Echtzeitanalyse	116
4.4.1	Einzelkomponenten Mistellektin-Standard, Viscum-Extrakt-Charge 155 und Triterpen-Extrakt-Charge 155	116
4.4.2	Kombinationen Mistellektin-Standard + Triterpen-Extrakt-Charge und Viscum- + Triterpen-Extrakt-Charge	117
4.4.3	Mistellektin- und Triterpen-Liposomen	118
4.5	Konfokale Mikroskopie	119
4.6	Oleanolsäure-Quantifizierung	120
5	Zusammenfassung	122
6	Summary	124
7	Literaturverzeichnis	125
8	Abbildungsverzeichnis	139
9	Tabellenverzeichnis	142
10	Publikationsverzeichnis	144
11	Lebenslauf	146
12	Danksagung	148
13	Eidesstattliche Erklärung	149

Abkürzungsverzeichnis

2-HP- β -CD	2-Hydroxypropyl- β -Cyclodextrin
APC	Allophycocyanin
ASF	Asialofetuin
ATCC	American Type Culture Collection
BA	Betulinsäure (betulinic acid)
DSMZ	Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH
ELISA	enzyme linked immunosorbent assay
EPO	Experimental Pharmacology & Oncology
FBS	Fötale Bovines Serum
FL	Fluoreszenzkanal
ML	Mistellektin
MW	Mittelwert
NSG	nod scid gamma
Lip.	Liposomen
LOD	limit of detection (Nachweisgrenze)
LOQ	limit of quantification (Bestimmungsgrenze)
OA	Oleanolsäure (Oleanolic acid)
PBS	Phosphat-Puffer (phosphate buffered saline)
PBST	Phosphat-Puffer mit 1 % Tween 20
PC	Phosphatidylcholin
PCS	Photonenkorrelationsspektroskopie
PDI	Polydispersitätsindex
PI	Propidiumiodid
RIP	Ribosomen-inaktivierende Proteine
rRNA	ribosomale Ribonukleinsäure (ribosomal ribonucleic acid)
Sdv	Standardabweichung (standard deviation)
TT	Triterpene
Viscum	wässriger Mistelextrakt
ZI	Zellindex

1 Einleitung

1.1 *Viscum album* L.

Die weißbeerige, europäische Mistel *Viscum album* L. ist eine immergrüne, zweihäusige und halbpasitäre Pflanze und gehört zur Familie der Santalaceen. Sie nutzt den Wasser- und Mineralsalzhaushalt einer Wirtspflanze, ist jedoch durch das Vorhandensein von Chlorophyll selbstständig zur Photosynthese befähigt. Diese halbpasitäre Lebensweise ist notwendig, da sie über kein Wurzelsystem verfügt und somit keinen Bodenkontakt aufweist. Als Wirtsbäume kommen vor allem Laub- und Nadelbäume der Gattungen *Malus*, *Abies*, *Fraxinus* und *Pinus* in Betracht. Die Mistel sitzt auf Baumästen und wächst über mehrere Jahre zu kugeligen Büschen mit einem Durchmesser von bis zu einem Meter heran (Abb. 1).

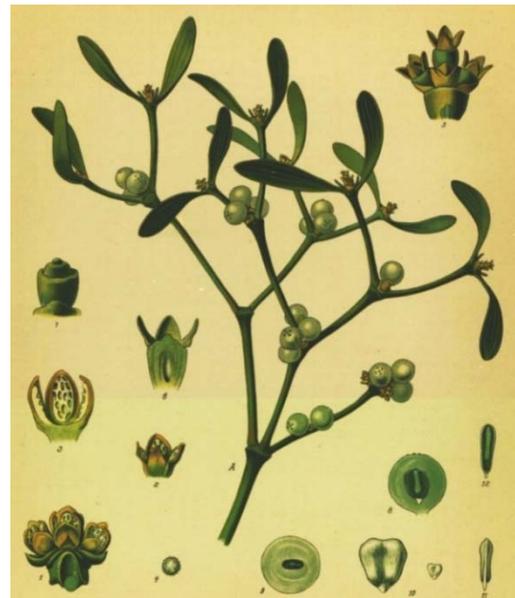


Abb. 1: *Viscum album* L.

Links: Fotoaufnahme von *Viscum album* L. (<https://pixabay.com/de/mistelzweig-schmarotzer-685881/>)

Rechts: Abbildung aus Köhler's Medizinal-Pflanzen, 1887.

Die Blütezeit ist im Winter und die anschließende Reifung der weißen Beeren erfolgt über einen Zeitraum von bis zu neun Monaten. Die Verbreitung der Mistel erfolgt ornithochor. Eine weitere Besonderheit der Mistel ist die Gleichheit der ledrigen Blattober- und unterseiten, die jeweils Spaltöffnungen aufweisen, um einen Gas- und Wasseraustausch zu ermöglichen.

Viscum album L. wurde als Arzneipflanze seit mehreren Jahrhunderten bei vielfältigen Leiden eingesetzt. Die traditionellen Anwendungsgebiete gelten jedoch teilweise als widersprüchlich (Buessing, 2000). Im Jahre 1920 wurde die Mistel erstmalig zur Behandlung von Krebs durch Rudolf

Steiner beschrieben und angewandt (Steiner, 1976). Eine ausführlichere Darstellung der onkologischen Pharmakologie und Anwendung der Mistel folgt im Kapitel 1.1.2.

1.1.1 Inhaltsstoffe

Viscum album L. besitzt ein breites Inhaltsstoffspektrum von sowohl hydrophilen als auch lipophilen Bestandteilen, dazu zählen Glykoproteine, Thionine, Flavonoide, Triterpensäuren, Alkaloide, Lignane, Lignine, biogene Amine und Polysaccharide (Franz et al., 1981, Jung et al., 1990, Orhan et al., 2006, Nhiem et al., 2013, Nazaruk et al., 2016). Zur Extraktgewinnung werden die Stängel, Blätter und Beeren genutzt. In den folgenden untergeordneten Kapiteln wird auf die für diese Arbeit relevanten Inhaltsstoffgruppen näher eingegangen.

1.1.1.1 Mistellektine

Die Mistellektine (ML) gehören zur Gruppe der Glykoproteine. Das Wort Lektin leitet sich vom lateinischen Verb „legere“ (deutsche Bedeutung unter anderem „auswählen“) ab und weist auf die besondere Eigenschaft dieser Glykoproteine hin, mittels ihrer Zuckerreste bestimmte andere Kohlenhydratstrukturen auf Zelloberflächen zu binden („auszuwählen“). In der Mistel wurden bisher drei ML (ML-I, -II, -III) und das chitinbindende ML mit über 20 Isolektinen identifiziert. Je nach Auswahl des Wirtsbaumes und des Erntezeitpunkts unterscheiden sich Art und Gehalt der ML, ein erhöhter Gehalt an ML-I konnte auf Laubbäumen bei Ernte in den Wintermonaten festgestellt werden (Schink et al., 1989, Schink et al., 1992, Scheffler et al., 1996, Schink et al., 1996). Die ML-I–III bestehen jeweils aus einer A- und einer B-Kette, die über eine Disulfidbrücke miteinander verbunden sind. Sie unterscheiden sich lediglich durch ihr Molekulargewicht und durch ihre Kohlenhydratspezifität. Das ML-I liegt in hoher Konzentration meist als Dimer (A–B)₂ vor (Olsnes et al., 1982, Lutsch et al., 1984, Niwa et al., 2003). In Tabelle 1 sind die Eigenschaften (molekulare Masse und Kohlenhydratspezifität) der drei ML zusammengefasst. Ein Unterschied in der Kohlenhydratspezifität bedeutet eine unterschiedliche Affinität zu Zuckermolekülen auf der Zellmembranoberfläche und kann eine entsprechende ML-Aufnahme steuern (Franz et al., 1981, Ziska et al., 1981, Franz, 1986, Mengs et al., 2002, Muething et al., 2002, Muething et al., 2004).

Tab. 1: Eigenschaften von ML-I–III

ML	Molekulare Masse [kDa]	Kohlenhydratspezifität
ML-I	62	D-Galaktose
ML-II	60	D-Galaktose, N-Acetyl-D-Galaktosamin
ML-III	50	N-Acetyl-D-Galaktosamin

Die B-Kette des Moleküls ist für die Bindung an der Zellmembranoberfläche zuständig und die A-Kette übt als Toxomer eine enzymatische Funktion aus: Die A-Kette ist aufgrund ihrer RNA-Glykosidase-Aktivität in der Lage, einen essentiellen Adenin-Rest (Adenin-4324) der 28 S rRNA abzuspalten. Die Proteinbiosynthese der Zelle kommt daraufhin zum Erliegen (Jung et al., 1990, Elsasser-Beile et al., 2000, Valentiner et al., 2002, Huber et al., 2005, Schrot et al., 2015). Der programmierte Zelltod (Apoptose) wird eingeleitet (Franz et al., 1981, Endo et al., 1988, Buessing et al., 1999, Krauspenhaar et al., 1999, Mikeska et al., 2005). Aufgrund von Funktion und Aufbau der ML werden diese den Ribosomen-inaktivierenden Proteinen (RIP) Typ-II zugeordnet (Olsnes et al., 1982, Schrot et al., 2015). Zu dieser Stoffklasse zählen die stärksten Pflanzengifte, wie zum Beispiel das Ricin aus *Ricinus communis* L. (Euphorbiaceae) und das Abrin aus *Abrus precatorius* L. (Fabaceae), die aufgrund ihrer B-Kette ihre Aufnahme in die Zelle triggern und durch die anschließende Freisetzung der A-Kette den Zelltod einleiten können, im Gegensatz zu den RIP Typ-I ohne B-Kette (Schrot et al., 2015).

Die Aufnahme mittels Endozytose und die anschließende Prozessierung der ML wurde erstmalig 1982 untersucht (Stirpe et al., 1982). Es wird angenommen, dass die Aufnahme der ML in gleicher Weise wie bei anderen RIPs Typ-II vollzogen wird (Sandvig et al., 1994, Pohl et al., 1998, Moisenovich et al., 2002, Tonevitsky et al., 2003). Die Aufnahme von Ricin, einem anderen Vertreter der RIP Typ-II, erfolgt über Endozytose, sowohl über den Clathrin-vermittelten als auch über den Clathrin-unabhängigen Weg (Llorente et al., 1998, Moisenovich et al., 2002). Genauere Untersuchungen bezüglich der ML stehen noch aus. Im Jahr 2002 wurde ein vergleichendes Experiment hinsichtlich der Aufnahme von ML und Ricin unternommen, bei dem festgestellt worden ist, dass die Endozytose beider Toxine an unterschiedliche Regionen der Zellmembran mit spezifischen zuckertragenden Rezeptoren beginnt (Moisenovich et al., 2002). ML bindet vor allem an Rezeptoren in der Zellperipherie, während Ricin sich an Zellmembranrezeptoren in der Nähe des Zellkerns anlagert. Beide Toxine werden endozytiert und nach 60 Minuten befinden sich die Substanzen in vesikulären und tubulären Strukturen der Endosomen (Moisenovich et al., 2002, Moisenovich et al., 2003).

Unter Endozytose versteht man die Aufnahme von Material in die Zellen mittels Bewegungsprozessen der Plasmamembran (Ammon et al., 2004). Durch Abschnürung des entsprechenden Membranabschnitts entstehen in der Folge Vesikel, die ins Zytoplasma transportiert werden. Es werden verschiedene endozytotische Prinzipien unterschieden, und zwar die Phagozytose, Makropinozytose, die Clathrin- und Caveolae-vermittelte und die Clathrin-unabhängige Endozytose.

Die Phagozytose erfolgt z. B. von den Makrophagen, die durch Ausstülpungen Partikeln oder Bakterien umschließen. Bei der Makropinozytose wird extrazelluläre Flüssigkeit ebenfalls durch Ausstülpungen aufgenommen und in die Zelle transportiert.

Bei der Caveolae-vermittelten Endozytose erfolgt die Aufnahme durch Membraneinstülpungen (Caveolae), die durch das Binden des Proteins Caveolin an Cholesterol entstehen und durch Caveolin stabilisiert werden (Parton et al., 1994, Mundy et al., 2002). Bei der Clathrin-vermittelten Aufnahme handelt es sich um eine rezeptorgetriggerte Aufnahme durch Einstülpungen von Membranabschnitten mit hohem Clathrin-Vorkommen, die als *coated vesicles* unter ATP-Verbrauch abgeschnürt werden. Das eingeschnürte Material wird in frühe Endosomen abgegeben. Membranbestandteile und Rezeptoren können anschließend wieder zur Membran transportiert werden oder werden in multivesikuläre Körperchen und schließlich in späte Endosomen transportiert (Weng, 2009). Durch Fusion der späten Endosomen mit Lysosomen kommt es zum lysosomalen Abbau des endozytierten Inhalts. Die Aufnahme von LDL erfolgt beispielsweise ebenfalls über eine Clathrin-vermittelte Endozytose (Allayee et al., 2000).

Bei der Clathrin- und Caveolae-unabhängigen Endozytose handelt es sich um einen Mechanismus in neuroendokrinen Zellen und in Neuronen, bei dem ebenfalls Einstülpungen der Membran erfolgen. Der genaue Mechanismus ist bisher noch nicht aufgeklärt (Sandvig et al., 2008).

Nachdem die Aufnahme des MLs in die Zelle erfolgt ist, wird es über endosomale Strukturen über den Golgi-Apparat bis zum Endoplasmatischen Retikulum transportiert, analog zum intrazellulären Transport des Ricins (Jonas et al., 1991, Sandvig et al., 1999). Im Endoplasmatischen Retikulum erfolgt schließlich die Kettentrennung und die Ausschleusung der A-Kette in das Zytoplasma. Bezüglich der Freisetzung der A-Kette werden verschiedene Annahmen diskutiert, die Abgabe soll durch eine Miss- oder Entfaltung der A-Kette (Agapov et al., 1999, Simpson et al., 1999, Deeks et al., 2002, Tonevitsky et al., 2003) oder durch eine Protein-Lipid-Wechselwirkung entstandene Destabilisierung der Membran des Endoplasmatischen Retikulums ausgelöst werden (Agapov et al., 1997, Pohl et al., 1998, Pohl et al., 1998, Agapov et al., 1999, Wesche et al., 1999). Die unterschiedliche Toxizität, der beiden RIP Typ-II Ricin und ML (Barbieri et al., 1993, Eck et al., 1999), die sich in ihrem Aufbau nahezu gleichen, ist ausschließlich durch alternative zelluläre Transportwege und durch eine unterschiedliche Freisetzung der A-Kette erklärbar (Barbieri et al., 1993, Eck et al., 1999). Durch die unterschiedliche Bindung an der Zellmembranoberfläche könnte eine verschiedenartige intrazelluläre Sortierung der Endosomen eine Folge sein, die gegebenenfalls den retrograden Transport und somit die Wirksamkeit als RIP Typ-II im Bereich der Translokation verändert. Eine unterschiedliche Bindung an intrazelluläre Kompartimente, die die Freisetzung steuern, könnte ebenfalls für die unterschiedliche Toxizität der nahezu identischen Glykoproteine Ricin und ML verantwortlich sein (Alami et al., 1997, Day et al., 2001, Moisenovich et al., 2003).

1.1.1.2 Viscotoxine

Bei den Viscotoxinen handelt es sich um ein Gemisch basischer Cystein-reicher Polypeptide (α - und β -Thionine), die jeweils aus 46 Aminosäuren bestehen (Ammon et al., 2004) und durch drei bis vier Disulfidbrücken stabilisiert werden (Florack et al., 1994). Bisher konnten sechs Formen (A1, A2, A3, B, 1-PS, U-PS) isoliert werden (Urech et al., 2006, Nazaruk et al., 2016), die alle eine ungefähre molekulare Masse von 5 kDa besitzen. Aufgrund ihrer ausgeprägten Hydrophilie sind sie Bestandteil der derzeit kommerziell verfügbaren Viscum-Extrakte und tragen ebenfalls zur Gesamtwirkung im Organismus bei (siehe ebenfalls Kapitel 1.1.2.2).

1.1.1.3 Triterpene

Zu den lipophilen Bestandteilen von *Viscum album* L. zählen die pentazyklischen Triterpene (TT) vom Oleanen-, Lupen- und Ursentyp (Abb. 2, Abb. 3, Abb. 4). Als Hauptbestandteil der Mistel ist die Oleanolsäure (OA) mit dem Oleanengrundkörper zu benennen (Wollenweber et al., 2000). Weitere TT der Mistel β -Amyrin, β -Amyrinacetat, Betulinsäure (BA), Lupeol, Lupeolacetat und Ursolsäure sind in den Tabellen 2, 3 und 4 dargestellt (Fukunaga et al., 1987, Teuscher, 1994).

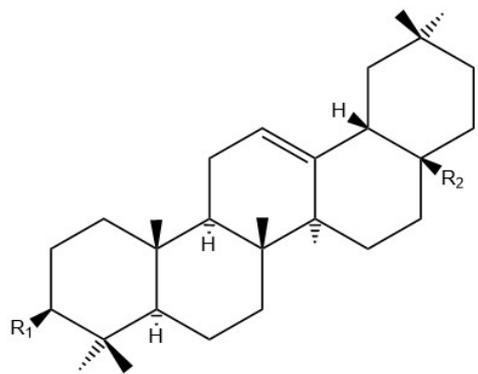


Abb. 2: Oleanen-Grundkörper

Tab. 2: TT der Mistel mit dem Oleanen-Grundkörper

Substanz	R1	R2
Oleanolsäure	OH	COOH
β -Amyrin	OH	CH ₃
β -Amyrinacetat	CH ₃ COO	CH ₃

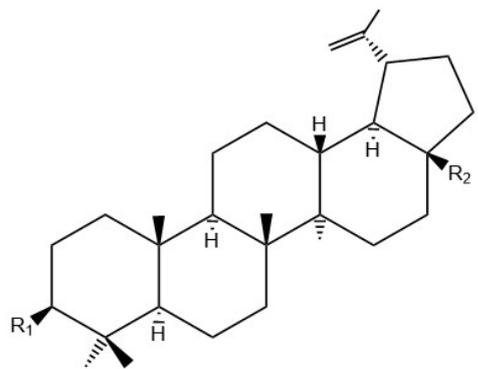


Abb. 3: Lupan-Grundkörper

Tab. 3: TT der Mistel mit dem Lupan-Grundkörper

Substanz	R1	R2
Betulinsäure	OH	COOH
Lupeol	OH	CH ₃
Lupeolacetat	CH ₃ COO	CH ₃

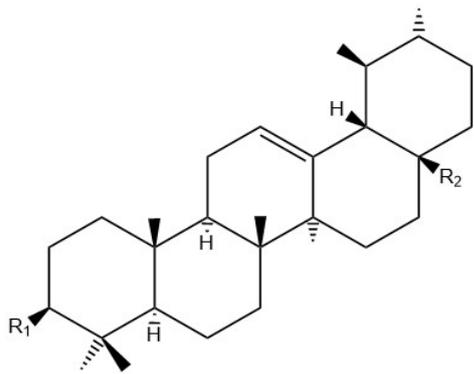


Abb. 4: Ursen-Grundkörper

Tab. 4: TT der Mistel mit dem Ursen-Grundkörper

Substanz	R1	R2
Ursolsäure	OH	COOH

Aufgrund ihres C₃₀-Grundkörpers ist ihre Lipophilie stark ausgeprägt, was eine erschöpfende Extraktion im wässrigen Medium unmöglich macht. Ein größeres Vorkommen in den kommerziell erhältlichen wässrigen Mistelextrakten kann somit ausgeschlossen werden (Jaeger et al., 2007). Im Jahr 2009 konnte eine Extraktionsmethode für die TT-Säuren mit einer OA-Ausbeute von ca. 80 % im Trockenextrakt entwickelt werden (Jaeger et al., 2009). Die Triebe wurden mit einer Schermühle auf eine Größe von ca. zwei Millimeter zerkleinert und anschließend unter Druck bei 120 °C mit n-Heptan extrahiert. Die TT-Säuren befinden sich in der heißen Lösung, die aus den Extraktionszellen herausfließt. Erkalte die Lösung, kristallisieren die TT-Säuren aus und werden anschließend filtriert. Dieser hergestellte Trockenextrakt wurde anschließend mit 2-Hydroxypropyl-β-Cyclodextrin (2-HP-β-CD) und einem Phosphatpuffer pH 7,5 versetzt, um die vorhandenen TT-Säuren (OA und BA) zu solubilisieren (Strueh et al., 2012). Die anderen TT-Säuren der Mistel spielen in diesem Extrakt keine Rolle, da sie darin nur in sehr geringen Mengen (unter der Bestimmungsgrenze) vorliegen. Durch die Solubilisierung der TT-Säuren wird eine gemeinsame Anwendung mit den ML im wässrigen Medium ermöglicht.

1.1.2 Pharmakologie

Eine Krebserkrankung ist nach den Erkrankungen des Herz-Kreislauf-Systems die zweithäufigste Todesursache in der Bundesrepublik Deutschland (Robert Koch Institute, 2015). Basierend auf dem heutigen Wissensstand ist die konventionelle Krebstherapie (operative Entfernung, Bestrahlung und Chemotherapie) die effektivste Behandlung von Krebserkrankungen. Sie ist jedoch auch durch das Auftreten zahlreicher schwerwiegender und die Lebensqualität stark beeinträchtigender Nebenwirkungen gekennzeichnet. Die Nachfrage nach komplementären, alternativen (Bausell et al., 2001) und tumorspezifischen Behandlungsmöglichkeiten wächst stetig (Kienle et al., 2010). In Europa ist die Anwendung von *Viscum album* L. (Santalaceae) in der komplementären Onkologie, vor allem zur Reduzierung der therapiebedingten Nebenwirkungen (Lenartz et al., 2000, Lange-

Lindberg et al., 2006, Horneber et al., 2008, Kienle et al., 2009, Kienle et al., 2010, Marvibaigi et al., 2014), bereits verbreitet, jedoch ist die wissenschaftliche Studienlage bezüglich der Wirkung im Menschen noch unbefriedigend. Es gibt zahlreiche Einzelfallstudien am Menschen, die einen antitumoralen Effekt der Mistel bestätigen (Nabrotzki et al., 2001, Legnani, 2008, Orange et al., 2012), jedoch zeigen größer angelegte Studien nur einen schwachen Effekt (Horneber et al., 2008, Kienle et al., 2009). Bei anderen *In-vivo*-Versuchen konnte ein antitumoraler Effekt nachgewiesen werden (Rostock et al., 2005, Seifert et al., 2008, Thies et al., 2008, Strueh et al., 2012, Delebinski et al., 2015). In *In-vitro*-Experimenten wurde die antitumorale Wirksamkeit der Mistel ebenfalls bestätigt (Urech et al., 1995, Buessing, 1996, Ribereau-Gayon et al., 1996, Schaller et al., 1996, Buessing et al., 1997). Untersucht wurden jeweils die wässrigen Extrakte mit den hydrophilen Bestandteilen der Mistel, unter anderem mit den zytotoxischen und immunmodulierenden Proteinen ML-I–III und den Viscotoxinen (Jung et al., 1990, Schaller et al., 1996, Buessing, 2000, Hajto et al., 2005, Urech et al., 2006, Hajto et al., 2012).

Durch die Anwendung eines Mistelgesamtextraktes konnte noch keine Zuordnung des Wirkeffektes zu einer bestimmten Inhaltsstoffgruppe getroffen werden, da es sich um ein großes Inhaltsstoffspektrum handelt und es zum Synergismus der Einzelsubstanzen kommen könnte (Scheffler et al., 1995, Edlund et al., 2000, Fischer et al., 2002, Rostock et al., 2005, Winkler et al., 2008). Eine Beurteilung der Gesamtwirkung über eine formelle Addition der Einzelwirkungen ist nicht möglich und benötigt eine Betrachtung des gesamten Extraktes, diese Aussage wurde auch bei der Betrachtung anderer Naturstoffextrakte, z. B. von *Valeriana officinalis* L. (Caprifoliaceae), *Hypericum perforatum* L. (Hypericaceae) und *Ginkgo biloba* L. (Ginkgoaceae) bereits beobachtet (Williamson, 2001, Wagner et al., 2009, Rather et al., 2013).

In den nächsten drei untergeordneten Kapiteln sind weitere Details bezüglich der Pharmakologie der Einzelsubstanzen dargestellt.

1.1.2.1 Mistellektine

Die Effekte der ML-I–III sind bisher am stärksten untersucht worden. Sie wirken *in vitro* und *in vivo* sowohl apoptotisch als auch immunstimulierend (Hajto et al., 1989, Ribereau-Gayon et al., 1996, Elsasser-Beile et al., 2000, Elluru et al., 2006, Lee et al., 2007, Lyu et al., 2007, Gardin, 2009, Lee et al., 2009). Die apoptotische Wirkweise der ML ist durch ihre Aktivität als RIP Typ-II erklärbar (Olsnes et al., 1982). Die A-Kette inhibiert die Proteinbiosynthese und treibt dadurch die Zelle in den programmierten Zelltod (Van Damme et al., 2001, Polito et al., 2009, de Virgilio et al., 2010). Die Stimulation des Immunsystems wird durch eine gesteigerte Zytokinfreisetzung (z. B. Tumornekrose-Faktor α , Interleukine) über eine mögliche vorangegangene Aktivierung von Leukozyten

(z. B. T-Helferzellen) hervorgerufen (Hajto et al., 1990, Fischer, 1996, Hajto et al., 1997, Stein et al., 2000, Fischer et al., 2002).

1.1.2.2 Viscotoxine

Der Wirkmechanismus der Viscotoxine wurde bisher weniger intensiv untersucht. Basierend auf dem bisherigen Wissensstand wirken die Viscotoxine zytotoxisch aufgrund ihrer Fähigkeit, mit den Zellmembranen zu interagieren. Dadurch kann es zur Destabilisierung der Membranen und zur Porenbildung kommen (Schaller et al., 1996, Caaveiro et al., 1998, Hughes et al., 2000, Winkler et al., 2008). Die Zelle wird permeabel und es kommt zum Zusammenbruch der Zellaktivität (Coulon et al., 2002, Coulon et al., 2003, Giudici et al., 2003). Weiterhin wirken sie nekrotisch auf Tumorzellen (Franz et al., 1983, Ribéreau-Gayon et al., 1989, Buessing et al., 1998, Mengers et al., 2002, Kienle et al., 2003) und stimulieren das angeborene Immunsystem, indem sie die Aktivität der natürlichen Killerzellen und der Granulozyten steigern (Stein et al., 1999).

1.1.2.3 Triterpensäuren

Die TT-Säuren wurden bereits mehrfach experimentell betrachtet und es wurden antiinflammatorische, antivirale und antitumorale Effekte nachgewiesen (Assefa et al., 1999, Fulda et al., 2000, Zuco et al., 2002, Urech et al., 2005, Laszczyk, 2009, Zhang et al., 2014). OA kann Apoptose in verschiedenen Tumorzellen auslösen, jedoch ist der auslösende Weg zum programmierten Zelltod bisher nicht eindeutig geklärt und differiert je nach Zelltyp (Martin et al., 2007, Zhang et al., 2007, Yan et al., 2010, Strueh et al., 2012, Strueh et al., 2013). BA wirkt ebenfalls antitumoral und ist mit dem Wirkspektrum von OA zu vergleichen (Gheorgheosu et al., 2014, Soica et al., 2014).

Der Transport der TT-Säuren im Blut und die Aufnahme ins Gewebe kann durch das Vorhandensein von Albumin verbessert werden, da OA und BA in der Lage sind, einen Komplex mit Albumin zu bilden (Ying et al., 1991, Udeani et al., 1999). Eine schnelle Elimination der freien TT-Säuren aus dem Blut ist die Folge. Durch ihre leicht amphiphile Struktur ist auch eine Mizellbildung und Interaktionen mit den Zellmembranen möglich (Han et al., 1997, Sairafianpour et al., 2003, Prades et al., 2011, Broniatowski et al., 2014, Tsuchiya, 2015).

1.1.2.4 Therapie mit Fertigarzneimitteln

Auf dem deutschen Arzneimittelmarkt befinden sich zurzeit fünf Mistelpräparate: AbnobaViscum®, Helixor®, Iscador®, Iscucin® und Lektinol®, die von zwei Drittel der Krebspatienten bereits zusätzlich zur Standardtherapie angewendet werden (Bopp et al., 2015). Lektinol ist ein Phytotherapeutikum, während die anderen Präparate in der anthroposophischen Medizin genutzt werden. Alle Präparate befinden sich auf dem Markt trotz nicht umfassend belegter Wirksamkeit (Kienle et al., 2003, Horneber et al., 2008, Kienle et al., 2009). Die Zulassung beruht auf der Zuordnung zu den besonderen Therapierichtungen bzw. zu traditionellen Arzneimitteln und findet vor allem breite Anwendung und Empfehlung durch anthroposophisch und naturheilkundlich orientierte Ärzte (GAÄD – Gesellschaft anthroposophischer Ärzte in Deutschland) (Bopp et al., 2015).

Zur Herstellung des Präparates Lektinol® wird ein wässriger Extrakt aus den unverholzten Mistelzweigen und Blättern verwendet, der ML-Gehalt wird auf 15 ng je Ampulle (0,5 mL) normiert und dabei als ML-I bestimmt (Fachinformationsverzeichnis, 2016).

Bei den anderen vier Präparaten werden ebenfalls wässrige Mistelauszüge gewonnen, jedoch wird anders als bei Lektinol® zusätzlich nach dem Wirtsbaumvorkommen und dem Zeitraum der Ernte (Sommer und Winter) unterschieden. Es gibt dadurch verschiedene Präparatsorten mit den Kürzeln M, F, A, und P, je nach Art des Wirtes (Malus – Apfelbaum, Fraxinus – Esche, Abies – Tanne, Pinus – Kiefer) (Fachinformationsverzeichnis, 2016).

Die AbnobaViscum®-Arzneimittel werden durch ein patentiertes Pressverfahren hergestellt, das eine hohe Extraktausbeute ermöglicht (AbnobaGmbH, 2008). Die Extraktion der Sommer- und Wintermistel erfolgt jeweils getrennt mit einer wässrigen Ascorbat-Phosphat-Pufferlösung. Anschließend werden beide Presssäfte durch ein Strömungsverfahren vermischt und mit der Pufferlösung verdünnt. Die fertigen Präparate werden aus dieser Mischung entsprechend dem Homöopathischen Arzneibuch hergestellt, abschließend sterilfiltriert und in Ampullen abgefüllt. Je nachdem, wieviel Presssaft verwendet wird, erfolgt die Einteilung der Stärke des Präparates (0,02, 0,2, 2 und 20 mg) (Fachinformationsverzeichnis, 2016).

Bei den Helixor®-Produkten handelt es sich um wässrige Extrakte der frischen, jungen Misteltriebe, die im Frühling, Sommer, Herbst und Winter geerntet werden (Helixor-HeilmittelGmbH&Co.KG, 2016). Die Triebe vom Sommer und Herbst bzw. Winter und Frühling werden getrennt extrahiert und abschließend in einem Verhältnis von eins zu drei mittels eines Strömungsverfahrens vermischt. Der gewonnene Extrakt wird anschließend mit isotonischer Kochsalzlösung auf den Gehalt pro Ampulle eingestellt. Die Stärkenangabe 0,01 bis 50 mg bezieht sich auf die verwendete Extraktmenge (Fachinformationsverzeichnis, 2016).

Iscucin®-Präparate stellen ebenfalls wässrige Extrakte aus der Mistelpflanze samt Blättern, Stängeln, Senkern und Beeren dar. Die Extraktion der Sommer- und Winterernte erfolgt ebenfalls

separat, die Extrakte werden anschließend mittels Strömungsverfahren gemischt. Die Stärke der Arzneimittel wird durch Verdünnungen in 1:20-Schritten erreicht, wobei die Stärke A die am stärksten verdünnte Lösung darstellt und die Stärke H die konzentrierteste Lösung (Bopp et al., 2015).

Bei den Iscador®-Arzneimitteln handelt es sich um wässrige, fermentierte Mistelauszüge. Verwendet werden die Blätter, Stängel und Beeren. Während der Herstellung wird der Extrakt mit misteleigenen, für die Herstellung speziell kultivierten Milchsäurebakterien versetzt. Die dadurch gebildete Milchsäure ermöglicht die Stabilisierung der ML. Die einzelnen Sommer- und Winterextrakte werden im Verhältnis eins zu eins gemischt. Die Angabe der Stärke auf den Fertigarzneimitteln bezieht sich auf die zuvor eingesetzte Pflanzenmenge in mg (0,0001 bis 20 mg) (Fachinformationsverzeichnis, 2016).

Je nach Art und Lokalisation des Tumors wird ein Präparat eines bestimmten Wirtsbaumes ausgewählt. Die Dosierung der Mistelpräparate erfolgt stets einschleichend, um die individuelle effektive Dosierung für den Patienten zu ermitteln. Die Dosissteigerung und die zunehmende Applikationshäufigkeit wird anhand von Patientenreaktionen auf das Arzneimittel ermittelt, die sich in einem Temperaturanstieg, in lokalen Entzündungs- und immunologischen Reaktionen oder in einer Änderung des Wohlbefindens äußern können (AbnobaGmbH, 2008). Die häufigste Applikationsform ist die subkutane Injektion, off-label-Anwendungen sind ebenfalls Injektionen in die Vene, in Körperhöhlen und in den Tumor (Bopp et al., 2015).

Die Misteltherapie wird von den meisten Patienten gut vertragen, zu den häufigsten Nebenwirkungen zählen starke Rötungen an der Einstichstelle (> 5 cm), Juckreiz, Fieber über 38 °C, Abgeschlagenheit, Frösteln, Kopfschmerzen und Müdigkeit. In sehr seltenen Fällen kann es zu systemischen Allergien kommen, die zu Atemnot und Bronchospasmen führen können (Fachinformationsverzeichnis, 2016).

1.2 Zielsetzung

Ziel dieser Arbeit war einerseits die Etablierung einer analytischen Bestimmungsmethode sowohl für die ML als auch für die TT-Säuren in Mistelextrakten. Es sollte damit der ML-Gehalt von verschiedenen Fertigarzneimitteln und von wässrigen Mistelextrakten der Firma Birken AG bestimmt werden. Weiterhin sollten diese etablierten Methoden in der Folge für die Analyse von Serumproben adaptiert werden und somit eine Quantifizierung beider Komponenten in einer biologischen Matrix ermöglichen.

Andererseits sollte die ML-Aufnahme des ML-Standards (isoliertes ML-I) und die Aufnahme aus den wässrigen Extrakten (Viscum) einzeln und in Kombination mit einem TT-reichen Extrakt (ML+TT und ViscumTT) durch verschiedene Zelltypen *in vitro* untersucht werden. So sollte eine mögliche Zellspezifität bezüglich des Ansprechens auf die Einzelsubstanzen und auf die Kombinationen identifiziert werden.

Das Wachstum der 143B-Zelllinie sollte in Echtzeit über einen längeren Zeitraum nach erfolgter Inkubation mit den hydrophilen Mistelkomponenten und in Kombination mit dem TT-Extrakt sowohl mikroskopisch als auch zellphysiologisch untersucht werden.

Da die Anwendung der TT-Säuren bisher durch den Zusatz von 2-HP- β -CD ermöglicht wurde, sollte der Einfluss dieser Substanz ebenfalls analysiert werden und eine andere Solubilisationsmöglichkeit in Form von Liposomen entwickelt werden.

2 Materialien und Methoden

2.1 Geräte

2.1.1 Zellkultur

Autoklav Varioklav®, H+P Labortechnik, Hackermoos

Brutschrank Mini Galaxy A RS Biotech®, C&M Scientific, West Lothian, UK

CASY®1 – Cellcounter und Analysesystem, Kapillare 150 µm, Schärfe System GmbH, Reutlingen

FACSCalibur®, Gerätenummer E512, Becton Dickinson, Heidelberg

iCELLigence®, OLS OMNI Life Science GmbH & Co. KG, Bremen

Konfokales Laser Scanning Mikroskop LSM 710®, Axio Observer Z1, Planapochromat 63×/1.4 Öl-Objektiv, Microimaging, Carl Zeiss, Jena

Maxipette, Greiner bio-one, Frickenhausen

Präzisionsheizplatte PZ 28-2, Harry Gestigkeit, Düsseldorf

Sicherheitswerkbank Herasafe HS 12, Heraeus Instruments, Hanau

Zählkammer nach Neubauer, Brand, Wertheim

2.1.2 Zentrifugen

Kühlzentrifuge Mikro200R®, Hettich Zentrifugen, Tuttlingen

Rotanta 460R®, Hettich Zentrifugen, Tuttlingen

Zentrifuge Megafuge 1.0®, Heraeus Instruments, Hanau

Zentrifuge Z233M-2®, Hermle-Labortechnik, Wehingen

2.1.3 Waagen

Analysenwaage Sartorius analytic AC210P®, Sartorius, Göttingen

Analysenwaage Sartorius BP211D®, Sartorius, Göttingen

Waage Sartorius portable PT1200®, Sartorius, Göttingen

2.1.4 GC / FID

GC-2010 Plus® mit GC-Solution-Software, Serien-Nr. C118051, Shimadzu Europa GmbH, Duisburg

AutoInjektor AOC-20i®, Shimadzu Europa GmbH, Duisburg

Gefriertrocknungsanlage Alpha 2-4®, Martin Christ Gefriertrocknungsanlagen GmbH, Osterode

Säule ZB-35®, 30 m, 250 µm ID, 0,25 µm Schichtdicke, Phenomenex, Aschaffenburg

2.1.5 Sonstige Geräte

DC-Doppelentwicklungskammer (6 x 13 cm), Camag AG, Berlin

div. Kolbenhubpipetten, Eppendorf, Hamburg

HPLC Knauer Platin Blue® mit der Säule Kinetex XB-C18, 5 µm Partikelgröße, 250 x 4,6 mm, Phenomenex, Aschaffenburg

LiposoFast®, Avestin Europe GmbH, Mannheim

Magnetrührer IKA Combimag RCH®, IKA Labortechnik, Staufen

Mehrkanalpipette Transferpette S-8®, Brand, Wertheim

Microplattenreader Tecan Infinite F200®, Tecan, Berlin

pH-Meter SympHony SP70P, VWR, Darmstadt

pH-Meter Calimatic 766, Knick Elektronische Messgeräte, Berlin

Reagenzglaszerstäuber, Duran Group GmbH, Wertheim / Main

Reinstwasseranlage Labostar UV 2 Reinstwassersystem®, Siemens, Barsbüttel

Repetierpipette Multipette M4, Eppendorf, Hamburg

Schüttler VWR® Microplate Shaker, VWR, Darmstadt

Schüttler PMS-1000i®, Grant Instruments, Cambridgeshire, UK

Tischmikroskop TMS-F® No. 301454, Nikon Instruments, Düsseldorf

Trockenschranke, Heraeus Holding GmbH, Hanau

Vortexer RS-VA 10®, Phoenix Instrument, Garbsen

Vortexer Vortex-Genie 2®, Scientific Industries, Bohemia, NY, USA

Wasser- / Ultraschallbad Sonorex RK 100 H®, Bandelin electronic, Berlin

2.1.6 Verbrauchsmaterialien

DC-Fertigplatten ADAMANT UV254 (0,25 mm Kieselgel 60), Macherey-Nagel GmbH & Co. KG, Düren

Flüssigkeitsreservoirs (12 Kanal), VWR, Darmstadt

Einmalkanülen (steril, 40 mm, ø 0,8 mm), B. Braun, Melsungen
Einmalspritzen (steril, 2 mL; 5 mL; 10 mL), B. Braun, Melsungen
E-Plate L8® (steril), OLS OMNI Life Science GmbH & Co. KG, Bremen
Falcons (14 mL, 50 mL), Greiner bio-one, Frickenhausen
Kryoröhrchen (2 mL, steril), Greiner bio-one, Frickenhausen
Kurzgewindeflaschen, klarglas, Th. Geyer GmbH & Co. KG, Renningen
Kurzgewindeflaschen (silinasiert), Th. Geyer GmbH & Co. KG, Renningen
µ-Dish^{35mm, high}®, Ibidi GmbH, Martinsried
Mikroeinsätze, silysiert, Th. Geyer GmbH & Co. KG, Renningen
Multiwellplatten 12-Well (transparent, steril), Greiner bio-one, Frickenhausen
Multiwellplatten 24-Well (transparent, steril), Greiner bio-one, Frickenhausen
Multiwellplatten 96-Well (transparent, NuncImmuno Maxisorp), Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
Pipettenspitzen (10 µL, 100 µL, 200 µL, 1000 µL, 5000 µL), Greiner bio-one, Carl Roth, VWR, Sigma-Adrich Chemie, Frickenhausen, Karlsruhe, München
PS-Röhrchen (75 mm Länge), VWR, Darmstadt
Reaktionsgefäße (PP, 1,5 mL; 2 mL), Carl Roth, Karlsruhe
Reaktionsgefäße (Protein LoBind, 1,5 mL; 0,5 mL), Eppendorf, Hamburg
Repetierspitzen Combitips plus (1 mL; 5 mL), Eppendorf, Hamburg
Sterile Einmalpipetten (5 mL, 10 mL, 25 mL), Greiner bio-one, Frickenhausen
Spritzenvorsatzfilter (steril, 0,22 µm, ø 33 mm, PVDF-Membran), Sigma-Aldrich Chemie, München
Suspensionskulturflaschen (Gasaustauschfilter, 25 cm²; 75 cm²), Greiner bio-one, Frickenhausen
Zellkulturflaschen (Gasaustauschfilter, 25 cm²; 75 cm²), Greiner bio-one, Frickenhausen
Zentrifugenröhrchen (steril, PP, 15 mL; 50 mL), Greiner bio-one, Frickenhausen

2.2 Chemikalien, Medien, Puffer und Extrakte

2.2.1 Zellkultur

Alexa-Fluor® 488 5-TFP, Molecular Probes, Eugene, USA
CellMask® Deep Red Plasma Membrane Stain, Molecular Probes, Eugene, USA
CuSO₄, Carl Roth, Karlsruhe
DMEM, Biochrom KG, Berlin
DMSO, Carl Roth, Karlsruhe
FBS Superior, Biochrom KG, Berlin
Glucose, Sigma-Aldrich, Steinheim

Hoechst 33342, Molecular Probes, Eugene, USA
 IMDM with HEPES and L-Gln, Lonza Köln GmbH, Köln
 L-Alanyl-L-Glutamin-Lösung (200 mM), Biochrom KG, Berlin
 Live-Cell-Imaging Solution, Molecular Probes, Eugene, USA
 MTT, Carl Roth, Karlsruhe
 PBS-Lösung ohne Ca^{2+} , Mg^{2+} , steril, Biochrom KG, Berlin
 pHrodo® Red Dextran, Molecular Probes, Eugene, USA
 RPMI-1640 cell culture medium with 2.0 g/l NaHCO_3 , without phenol red; Biochrom KG, Berlin, Germany.
 Triton-X 100, Carl Roth, Karlsruhe
 Trypsin / EDTA-Lösung (0,05 % / 0,02 %) in PBS, ohne Ca^{2+} , Mg^{2+} , Biochrom KG, Berlin
 Lysepuffer: NaCl (150 mM) 4,383 g
 Tris (50 mM) 3,0285 g Sigma-Aldrich, Steinheim
 1 % Triton X-100 5 mL
 pH 8 (NaOH oder HCl)
 H₂O ad 500 mL

2.2.2 ELISA-Quantifizierung

Asialofetuin from fetal calf serum Typ 1, Sigma-Aldrich, Steinheim
 BSA, Carl Roth, Karlsruhe
 Isoliertes ML-I, Prof. Dr. U. Pfüller, Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf
 ML-Antikörper: Anti-ML-A-Kette-5F5, SIFIN diagnostics GmbH, Berlin
 ML-Antikörper: Anti-ML-A-Kette-5H8, POD markiert, SIFIN diagnostics GmbH, Berlin
 PBS, unsteril, Biochrom KG, Berlin
 PBS mit 1 % Tween 20
 Schwefelsäure, Sigma-Aldrich, Steinheim
 StabilZyme®, Diarect AG, Freiburg
 TMB, eBioscience, Frankfurt am Main
 Tween 20, AppliChem, Darmstadt
 Bicarbonatpuffer pH 9,6 (Natriumcarbonat, Natriumhydrogencarbonat)

Na_2CO_3	0,84792g / 200mL
NaHCO_3	1,00812g / 200mL

2.2.3 FACS-Analyse

Annexin-V-Binding-Puffer, BD Pharmingen, Heidelberg

BD FACSTTM Sheath Fluid, BD Pharmingen, Heidelberg

BD FACSTTM Clean Solution, BD Pharmingen, Heidelberg

BD FACSTTM Rinse Solution, BD Pharmingen, Heidelberg

BD Pharmingen[®] APC / Annexin V, BD Pharmingen, Heidelberg

BD Pharmingen[®] Propidium Iodide Staining Solution, BD Pharmingen, Heidelberg

Casy Clean Lösung, Schärfe System GmbH, Reutlingen

Casy Isoton-Lösung II, BD Pharmingen, Heidelberg

2.2.4 GC / FID

Betulinsäure, Carl Roth, Karlsruhe

Chloroform, Sigma-Aldrich, Steinheim

Cholesterol, Carl Roth, Karlsruhe

Erythrodiol, Sigma-Aldrich, Steinheim

Ethylacetat, Sigma-Aldrich, Steinheim

Oleanolsäure, Sigma-Aldrich, Steinheim

Silylating Mixture Fluka III, Sigma-Aldrich, Steinheim

2.2.5 HPLC

Acetonitril (ACN), Carl Roth, Karlsruhe

Methanol (MeOH), Carl Roth, Karlsruhe

2.2.6 Fertigarzneimittel

Mehrere Fertigarzneimittel von vier verschiedenen Herstellern wurden analysiert (Tab. 5).

Tab. 5: Untersuchte Fertigarzneimittel

Fertigarzneimittel	Charge	Firma
AbnobaViscum [®] Abietis 20 mg	406C32	Abnoba GmbH
AbnobaViscum [®] Fraxini 20 mg	401A17	Abnoba GmbH
AbnobaViscum [®] Mali 20 mg	412A18	Abnoba GmbH
AbnobaViscum [®] Pini 20 mg	304A22	Abnoba GmbH
Helixor [®] A 10 mg	4124104	Helixor Heilmittel GmbH & Co.KG

Fertigarzneimittel	Charge	Firma
Helixor® A 50 mg	4146109	Helixor Heilmittel GmbH & Co.KG
Helixor® M 50 mg	4146107	Helixor Heilmittel GmbH & Co.KG
Helixor® P 50 mg	4134710; 4146006	Helixor Heilmittel GmbH & Co.KG
Iscador® A 20 mg	5111 / 02	Iscador AG
Iscador® M 20 mg	5187 / 02	Iscador AG
Iscador® P 20 mg	5163 / 02	Iscador AG
Iscucin® Abietis, Stärke H	A124640B	WALA Heilmittel GmbH
Iscucin® Mali, Stärke H	A124166B	WALA Heilmittel GmbH
Iscucin® Pini, Stärke H	A134017B	WALA Heilmittel GmbH

Von vier Herstellern wurden verschiedene Extrakt-Fertigarzneimittel mit entsprechender Chargenbezeichnung untersucht.

2.2.7 Extrakte der Birken AG

Die untersuchten Extrakte wurden von der Firma Birken AG (Niefern-Öschelbronn) hergestellt. Geerntet wurden einjährige Triebe der Apfelmistel (*Malus domestica* BORKH., Rosaceae), die von Herrn Dr. S. Jäger (Leiter der Qualitätskontrolle der Birken AG) identifiziert wurden. Die Zerkleinerung der Triebe erfolgte durch eine Kryomühle der Firma Retsch (Deutschland) unter Flüssigstickstoff. Anschließend wurde mit einem Phosphat-Ascorbinsäure-Puffer extrahiert (Delebinski et al., 2012). Mit dieser Vorgehensweise konnte ein ML-reicher Extrakt hergestellt werden (Tab. 6).

Bei der Herstellung des TT-Extraktes wurde dasselbe Pflanzenmaterial als Ausgangsmaterial verwendet. Die Extraktion erfolgte mit n-Heptan, eine Solubilisation der TT mit 2-HP- β -CD schloss sich daran an (Tab. 6) (Delebinski et al., 2015).

Nach jeweils erfolgter Extraktion schloss sich eine Lyophilisation an und die Extrakte wurden als Lyophilisat bei 4 °C gelagert.

Tab. 6: Extrakte der Birken AG

Charge	Beschreibung	Pflanzenmaterial	Wässriger Pflanzenextrakt [mg Mistel / g Extrakt]	Puffer	2-HP- β -CD [mg/mL]	OA [mg/mL]	ML [μ g/mL]
Viscum 155	Wässriger Mistel-extrakt	1-jährige Triebe der Apfelmistel Ernte: 03.06.2009	3 mg/g	30 mM Phosphat pH 7,6 mit Ascorbin- säure und Saccha- rose	-	-	1,17 \pm 0,17
TT 155	Solubili-sierte Triterpe-noide	1-jährige Triebe der Apfelmistel Ernte: 09.05.2011	-	60 mM Phosphat pH 7,6 mit Saccha- rose	250	3,31 \pm 0,08	-

Charge	Beschreibung	Pflanzenmaterial	Wässriger Pflanzenextrakt [mg Mistel / g Extrakt]	Puffer	2-HP- β -CD [mg/mL]	OA [mg/mL]	ML [μ g/mL]
Viscum 157	Wässriger Mistel-extrakt	1-jährige Triebe der Apfelmistel Ernte: 03.06.2009	4 mg/g	30 mM Phosphat pH 7,5 mit Ascorbin-säure	-	-	1,67 \pm 0,32
TT 157	Solubili-sierte Triterpe-noide	1-jährige Triebe der Apfelmistel Ernte: 09.05.2011	-	60 mM Phosphat pH 7,5	230	2,90 \pm 0,09	-
Viscum 161	Wässriger Mistel-extrakt	1-jährige Triebe der Apfelmistel Ernte: 03.07.2009	3 mg/g	30 mM Phosphat pH 7,5 mit Ascorbin-säure und Saccha-rose	-	-	2,19 \pm 0,11
TT 161	Solubili-sierte Triterpe-noide	1-jährige Triebe der Apfelmistel Ernte: 23.05.2013	-	60 mM Phosphat pH 7,5 mit Saccha-rose	240	3,60 \pm 0,06	-

2-HP- β -CD wurde dem Extrakt zugesetzt. Die ML-Konzentrationen wurden mittels A-Ketten-ELISA ($n \geq 3$) bestimmt. OA wurde mithilfe einer GC / FID-Methode und einer externen Kalibrierung mit OA als Referenzsubstanz quantifiziert ($n \geq 3$). Der Mittelwert \pm Standardabweichung wird angegeben.

2.3 Zelllinien

2.3.1 THP-1-Zelllinie

Die THP-1-Zellen (ACC 16) wurden aus dem Blut eines einjährigen Jungen, der an einer akuten, monozytären Leukämie erkrankt ist, isoliert. Es handelt sich um Monozyten, die in einer Suspension proliferieren und teilweise leichte Anhäufungen bilden können. Sie besitzen eine Verdopplungszeit von ca. 35 - 40 h. Die Zellen besitzen die Fähigkeit zur Phagozytose (Differenzierung in Makrophagen durch Zugabe von Phorbolestern) und produzieren Lysozyme. Da in den folgenden Experimenten die Aufnahme von ML durch verschiedene Zellen nach Zugabe betrachtet werden soll, wurden die Zellen undifferenziert belassen, um die Eigenschaften von Monozyten im zirkulierenden Blut beizubehalten. Die Zellen wurden vom DSMZ bezogen und gemäß deren Empfehlungen alle drei bis vier Tage kultiviert.

2.3.2 HL-60-Zelllinie

Bei den HL-60-Zellen (ACC 3) handelt es sich um eine promyeloische leukämische Zellkultur, die von dem Blut einer an akuter myeloischer Leukämie erkrankten 35-jährigen Frau stammt. Die Zellen proliferieren in einer Suspension und haben eine Verdopplungszeit von ca. 40 h. Für die nachfolgenden Untersuchungen wurden die Zellen undifferenziert, in Suspension lebend, verwendet. Die Zellen wurden vom DSMZ bezogen und gemäß deren Empfehlungen alle zwei bis drei Tage kultiviert.

2.3.3 143B-Zelllinie

Bei den 143B-Zellen (CRL-8303) handelt es sich um eine Osteosarkom-Zelllinie, die aus dem Knochen eines 13-jährigen, an einem Osteosarkom erkrankten Mädchens stammt. Die Zellen wachsen adhärent und haben eine Verdopplungszeit von ca. 24 Stunden (Shapovalov et al., 2010). Die Zelllinie wurde von Dr. Catharina Delebinski, Arbeitsgruppe Integrative Medizin in der Pädiatrischen Onkologie, Charité, Universitätsmedizin Berlin, zur Verfügung gestellt und ursprünglich von ATCC bezogen. Die Kultivierung erfolgte gemäß deren Empfehlungen alle zwei bis drei Tage.

2.3.4 TC-71-Zelllinie

Die TC-71-Zellen (ACC 516) wurden 1981 durch Biopsie eines rezidiven Tumors des Oberarmknochens eines 22-jährigen Mannes gewonnen. Der Tumor stammte aus einem metastasierenden Ewing-Sarkom. Diese progressive Erkrankung wurde mittels Chemotherapie behandelt. Die Zellen wachsen adhärent in Monoschichten, haften jedoch nur lose an der Zellkulturflasche. Ein Ablösen der Zellen erfolgte durch leichtes Klopfen an der Flasche. Die Verdopplungszeit beträgt ca. 24 Stunden. Die Zelllinie wurde ebenfalls von Dr. Catharina Delebinski, Arbeitsgruppe Integrative Medizin in der Pädiatrischen Onkologie, Charité, Universitätsmedizin Berlin zur Verfügung gestellt und ursprünglich vom DSMZ bezogen. Die Kultivierung erfolgte gemäß deren Empfehlungen alle zwei bis drei Tage.

2.4 Methoden

2.4.1 Quantifizierung mittels ELISA

Um ML zu quantifizieren, wurden zwei enzyme linked immunosorbent assays (ELISAs) (Jaeggy et al., 1995, Musielski et al., 1996, Manojlovic et al., 2008) etabliert und verwendet, die eine Bestimmung von Proteinen ermöglichen. Diese Methode nutzt als Grundprinzip die Reaktion eines Antikörpers mit dem entsprechenden Antigen. Das ML dient als Antigen und wird mithilfe eines Antikörpers Anti-ML 5H8 markiert. Die eine Variante, der A-Ketten-ELISA, bestimmte die A-Kette des MLs (Mulsow et al., 2016), und die zweite Variante, A-B-Ketten-ELISA (Delebinski et al., 2015), das gesamte Hololectin (Bestimmung der $(A-S-S-B)_n$ -Struktur). Die erste Methode nutzte den Antikörper ML 5F5, der mit seinem variablen und hypervariablen Teil die A-Kette des MLs erkannte und anschließend gebunden hatte. In der zweiten Bestimmungsmethode wurde das Glykoprotein Asialofetuin (ASF) verwendet, an das ML durch seine Affinität zu N-Acetylglucosamin band. Beide ELISA-Varianten nutzten zur Quantifizierung des MLs einen Zwei-Seiten-Bindungstest, den Sandwich-Komplex. Der POD-markierte monoklonale Antikörper ML 5H8 sorgte bei beiden Varianten für die zweite Bindung (Sandwich-Komplex geschlossen). In Abbildung 5 ist der Methodenverlauf dargestellt.

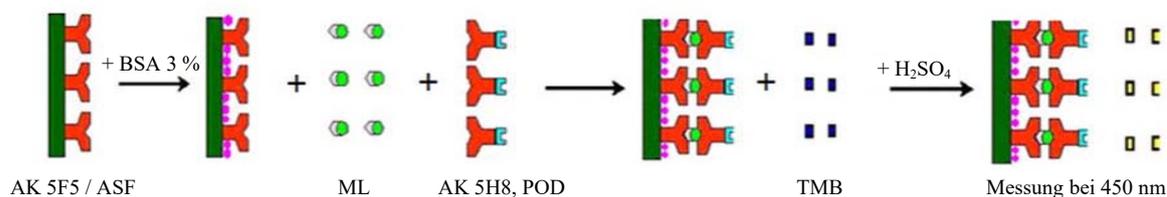


Abb. 5: ELISA-Schema (nach (Rentzsch, 2007), modifiziert)

Als erstes wurde der Fang-Antikörper ML 5F5 (0,9 μg / 1 mL Bicarbonatpuffer) oder das Glykoprotein ASF (0,1 mg ASF-I / 1 mL PBS) mit 100 μL pro Well aufgetragen und für 30 Minuten bei 200 rpm und bei Raumtemperatur geschüttelt. Anschließend erfolgte ein Ausschlagen der verbliebenen Lösungen und ein dreimaliger Waschprozess mit 250 μL PBST pro Well. Zum Entfernen unspezifischer Bindungstaschen wurde die MaxiSorp®-Platte mit 200 μL einer 3%igen BSA / PBST-Lösung für 60 Minuten bei Raumtemperatur und bei 200 rpm inkubiert. Nach dem Waschvorgang wurden die zu vermessenden Proben und die ML-Standard-Konzentrationen aufgetragen (je 100 μL / Well). Pro ELISA-Form war eine separate Eichgerade notwendig. Für den A-Ketten-ELISA wurden ML-Konzentrationen zwischen 2,5 ng/mL und 40 ng/mL und für den A-B-Ketten-ELISA ML-Konzentrationen zwischen 5 ng/mL und 80 ng/mL verwendet. Alle Proben wurden ebenfalls bei Raumtemperatur und für eine Stunde bei 200 rpm geschüttelt. Im Anschluss an

den Waschprozess wurde der Detektionsantikörper ML 5H8, der mit dem Enzym Peroxidase gekoppelt ist, auf die Platte (100 μL / Well) aufgetragen. Der lyophilisierte Antikörper wurde mit StabilZyme® 1:10 gelöst, aliquotiert und bei $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ gelagert (Stabilität für ca. 3–4 Monate). Im ELISA wurde er in einer Endverdünnung von 1:4000 in einer 1%igen BSA / PBST-Lösung verwendet. Zur vollständigen Ausbildung des Sandwich-Komplexes wurde bei Raumtemperatur für eine Stunde bei 200 rpm inkubiert. Anschließend wurde die Platte erneut gewaschen, um nicht gebundenen Detektionsantikörper zu entfernen. Für die Quantifizierung von ML wurde die Umsetzung von Tetramethylbenzidin durch das Enzym Peroxidase genutzt. Die Inkubation mit dem Substrat (50 μL / Well) erfolgte bei Raumtemperatur, 200 rpm und im Dunkeln für 20 Minuten, darauffolgend wurde die Reaktion mit einer einmolaren Schwefelsäure-Lösung (50 μL / Well) gestoppt. Die Absorptionen wurden bei einer Messwellenlänge von 450 nm und einer Referenzwellenlänge von 620 nm bestimmt.

2.4.2 Mistellektin-Quantifizierung *ex vivo*

Die etablierte Methode des A-Ketten-ELISAs zur Quantifizierung des MLs wurde ebenfalls für die Bestimmung in Blutproben von Schweinen angewendet, dabei wurden Serumproben untersucht. Das Vollblut von Schlachtschweinen wurde von der Lehr- und Versuchsanstalt für Tierzucht und Tierhaltung e. V. (LVAT), Teltow-Ruhlsdorf, zur Verfügung gestellt. Nach einer Stunde wurden die Proben bei $2500 \times g$ zentrifugiert, um die Blutzellen abzutrennen. Für die ML-Bestimmung im Blutserum wurde der ML-Standard entweder dem Vollblut oder dem abgetrennten Serum zugesetzt.

2.4.3 Liposomenherstellung

Als eine weitere Applikationsform beider Inhaltsstoffgruppen wurden Liposomen hergestellt, die TT-Liposomen enthalten in ihrer Membranhülle die lipophilen TT-Säuren und die ML-Liposomen in ihrem Kern das hydrophile ML. Ein Vorteil dieser Zubereitung sollte der Verzicht auf 2-HP- β -CD sein, das kein üblicher Hilfsstoff in Arzneimitteln ist (Strickley, 2004). Für die Herstellung von Liposomen gibt es verschiedene Verfahren, unter anderem die Filmmethode, die Detergensdialyse und die Extrusion. In dieser Arbeit wurde zuerst die Filmmethode angewendet, um multilamellare Liposomen zu erzeugen. Um eine enge, ausreichend kleine Partikelgrößenverteilung zu erzielen, wurden die multilamellaren Liposomen anschließend mit dem LiposoFast® extrudiert. Im Rahmen dieser Arbeit wurden drei verschiedene Liposomengruppen hergestellt, und zwar leere, mit TT-Säuren und mit ML beladene Liposomen.

2.4.3.1 Filmethode

Die Filmmethode gehört zu den häufig verwendeten Verfahren für die Herstellung von multilamellaren Liposomen (Bangham et al., 1965).

Als membranbildende Grundsubstanz für die Liposomen wurde Phosphatidylcholin (PC) (1 mg / 10 μ L) verwendet. 20 μ L der PC-Lösung wurden zusammen mit 2,5 mL Chloroform in einem 10 mL-Rundkolben vorgelegt. Bei der Integration der TT-Säuren wurde eine 2,5 mg/mL methanolische TT-Lösung hinzugefügt. Es wurden Liposomen mit einer OA-Beladung von 5, 10, 20, 40, 80, 160, 320 und 640 μ g jeweils zweifach hergestellt.

Anschließend wurde bei allen Proben mit und ohne TT-Zusatz das Lösungsmittel bei Unterdruck auf dem Wasserbad (40 °C) innerhalb von 30 Minuten abrotiert, sodass ein gleichmäßiger Lipidfilm entstand. Nachdem das Lösungsmittel komplett entfernt war, wurde weitere drei Stunden im Grobvakuum bei Raumtemperatur nachgetrocknet.

Der entstandene Film wurde mit jeweils 1 mL PBS- oder ML-PBS-Lösung resuspendiert und anschließend bei Raumtemperatur, Normaldruck und 225 rpm am Rotationsverdampfer rotiert. Für die ML-Liposomen wurde eine ML-Konzentration von 65, 130, 260 und 520 μ g/mL verwendet. Jede Konzentration wurde ebenfalls zweifach hergestellt.

Die Rotation erfolgte vier Stunden lang, bis sich der Lipidfilm komplett von der Gefäßwand abgelöst hatte. Die gewonnenen Liposomenlösungen wurden über Nacht bei 4 °C gelagert.

Am darauffolgenden Tag wurden die Proben zwei Stunden ins Ultraschallbad gestellt und die trüben Lösungen klärten sich auf. Bevor die Extrusion mittels LiposoFast® erfolgte, wurden alle Lösungen filtriert.

2.4.3.2 Extrusion mittels LiposoFast®

Bei der Extrusion handelt es sich um eine mechanische Herstellungsmethode, um unilamellare Liposomen zu gewinnen. Dabei wurde die Probe mittels zweier Hochdruckspritzen unter Druck durch zwei Polycarbonatmembranen mit 200 nm großen Poren (LiposoFast®) extrudiert. Durch die Verwendung dieser zwei hintereinander angeordneten Membranen konnte eine durchschnittliche Liposomengröße von unter 200 nm erreicht werden. Die Extrusion erfolgte 21-mal und gewährleistete den Durchgang jedes Liposomens durch die Membran.

Reine TT-Liposomen wurden nach der Extrusion durch eine 1 kDa-Filtermembran 24 Stunden gegen PBS dialysiert, um frei vorliegende TT-Säuren zu entfernen. Die mit ML befüllten Liposomen wurden über eine Größenausschlusschromatographie mit einem D-Galaktose-Agarose-Gel aufgereinigt, um nicht verkapseltes ML zu eliminieren. Die Säule wurde mit 0,5 mL eines D-Galaktose-Agarose-Gels gefüllt, nach dem Absinken des Gels wurde die überstehende Flüssigkeit

abgelassen und mit 5 mL PBS-Puffer kalibriert. Anschließend wurde die Probe hinzugefügt und die ML-Liposomen, die nicht in das Gel diffundierten, aufgefangen. Es wurde solange aufgefangen bis keine Flüssigkeit mehr austrat (fünf Minuten Wartezeit nach dem letzten Tropfen). Anschließend erfolgte ein Spülen der Säule mit 5 mL PBS-Puffer, um den Verlust von ML-Liposomen gering zu halten. Nicht gebundenes ML wurde darauffolgend zweimal mit 5 mL Lösungspuffer (0,1 M D-Galaktose in PBS-Puffer) von der Säule eluiert. Für jede ML-Liposomen-Probe wurde eine neue Säule erstellt, um freies ML nicht in die darauffolgende Probe zu verschleppen.

2.4.3.3 Charakterisierung der Liposomen

Die Charakterisierung der Liposomen erfolgte mit dem Zetasizer Nano ZS.

2.4.3.3.1 Photonenkorrelationsspektroskopie

Mithilfe der Photonenkorrelationsspektroskopie (PCS) wurde die Größe der hergestellten Liposomen ermittelt. Es handelt sich dabei um ein Verfahren der dynamischen Lichtstreuung, anhand derer die Größe der Partikel, die das eingestrahlte Laserlicht passieren und dabei Streulicht erzeugen, ermittelt werden kann. Die Intensitätsänderung des Streulichts kommt zustande, weil die Partikel sich aufgrund ihrer Brown'schen Molekularbewegung im Medium bewegen. Die Schwankungsgeschwindigkeit der Streulichtintensität ändert sich umso schneller, je kleiner der Partikel ist (Abb. 6).

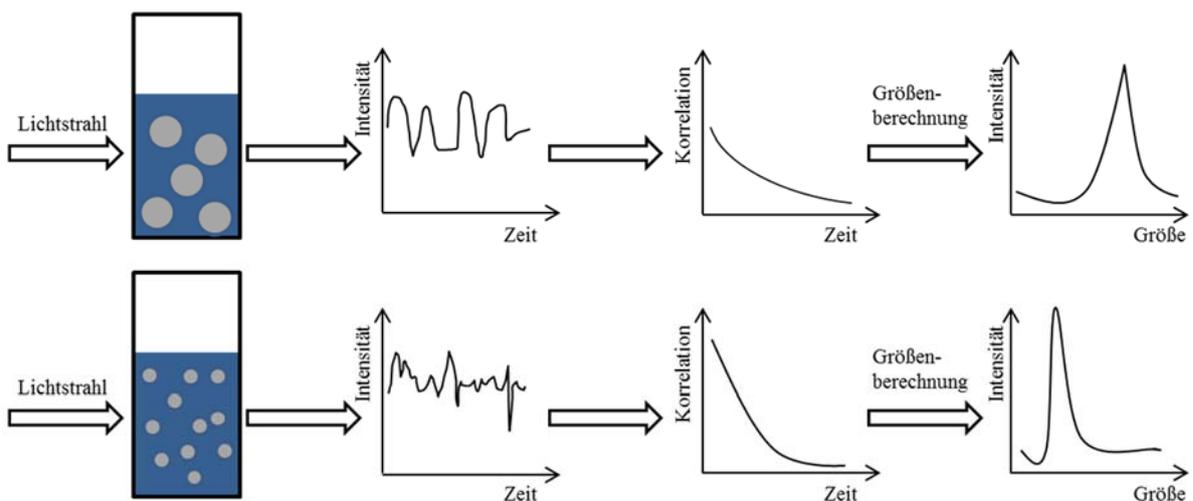


Abb. 6: Schematische Darstellung der Partikelgrößenbestimmung durch die PCS

Die Partikelgröße wird somit indirekt über die Messung der Partikelgeschwindigkeit im Medium mithilfe der Stokes-Einstein-Gleichung ermittelt:

$$D_0 = \frac{k_B \times T}{3\pi\eta_F d_h}$$

D_0	wahrer Diffusionskoeffizient	$[m^2/s]$
k_B	Boltzmannkonstante	$[J/K]$
T	Temperatur	$[K]$
η_F	dynamische Viskosität des Mediums	$[Pas]$
d_h	hydrodynamischer Durchmesser	$[m]$

Da nur die Diffusion der Partikel betrachtet wird, darf keine Sedimentation oder Flockung in der gemessenen Probe auftreten. Die Messung des Streulichts erfolgt mit einem Photodiodenarray-Detektor, der im 90°-Winkel zum einfallenden Lichtstrahl angeordnet ist. Das Messsignal wird an einen Korrelator weitergeleitet und schließlich am Computer ausgewertet. Die Größe der Partikel und der Polydispersitätsindex (PDI) werden angegeben. Der PDI ist ein Maß für die Breite der Verteilung und sollte für eine möglichst gleichförmige Liposomengröße unter 0,3 liegen.

2.4.3.3.2 Zetapotential

Zur weiteren Charakterisierung der Liposomen wurde das Zetapotential bestimmt, um die Stabilität der hergestellten Partikel zu beurteilen. Das Zetapotential befindet sich an der Scherebene des Partikels, die durch die Bewegung dieses Partikels in einer Suspension zustande kommt. Elektrisch geladene Partikel besitzen eine Oberflächenladung im Suspensionsmedium, die von entgegengesetzt geladenen Ionen des Mediums umgeben ist. An diese feste Schicht von Ionen (Sternschicht) schließt sich ein größerer Bereich eingeschränkt beweglicher positiv und negativ geladener Ionen des Mediums an (diffuse Schicht). Es entsteht eine elektrische Doppelschicht, die den Partikeldurchmesser scheinbar, von außen betrachtet, vergrößert. Das Potential der diffusen Schicht nimmt mit der Entfernung vom Partikel ab, bis der Wert null erreicht wird. Es wird von elektrostatischen Kräften und der thermischen Bewegung beeinflusst. Bewegt sich der Partikel im Suspensionsmedium (Brown'sche Bewegung, Anlegung eines elektrischen Feldes), wird ein Teil der diffusen Schicht durch Reibung abgetragen und der reale Durchmesser wird annähernd erreicht. Die Ladung des Partikels, die dann gemessen wird, ist das Zetapotential und ist dementsprechend eine relative Messgröße für das Oberflächenpotential und für die Ladung des Partikels. Dieses Potential charakterisiert die Abstoßungsenergie zwischen den Partikeln, da sie sich bei gleichsinniger Ladung

abstoßen. Eine Erhöhung des Zetapotentials verringert dementsprechend das Aggregieren von Partikeln.

2.4.3.3.3 Versuchsdurchführung

Die leeren, die TT- und die ML-Liposomen wurden im Verhältnis 1:10 mit PBS verdünnt und luftblasenfrei in die Messzelle des Zetasizers eingefüllt. Die Messung der Partikelgröße und des Zetapotentials erfolgte voll automatisch und wurde jeweils dreifach durchgeführt.

2.4.3.4 Verkapselungseffizienz

2.4.3.4.1 TT-Liposomen

Um die Menge an OA zu bestimmen, die in den Liposomen verkapselt wurde, wurde eine HPLC-Methode mit einem UV / Vis-Detektor angewendet.

Bevor die Analyse an einer RP-Säule von Phenomenex (Kinetex 5 µm XB-C18) erfolgen konnte, wurden die Liposomen zuerst zerstört. Von jeder hergestellten Liposomenlösung wurden 50 µL mit 50 µL MeOH gevortext und anschließend bei 40 °C und 650 rpm für 90 Minuten inkubiert. Alle zehn Minuten wurde jede Probe zusätzlich gevortext. Für die Quantifizierung der OA wurde eine Standardgerade aus verschiedenen OA-Konzentrationen (2,5–250 µg/mL) in MeOH verwendet. Von den Standardlösungen wurden jeweils 10 µL sechsfach eingespritzt und eine konstante Flow-Rate von 0,8 mL/min wurde angelegt. Die vorbehandelten Proben wurden aufgrund der geringen Menge mindestens zweifach vermessen. Ein Lauf dauerte 40 Minuten und verwendet wurde der folgende Fließmittelgradient (Tab. 7). Die Detektion erfolgte mithilfe eines UV-Detektors bei 210 nm.

Tab. 7: Fließmittelgradient der HPLC-Methode

Zeit [min]	Acetonitril [%]	Wasser [%]
0–10	75	25
10–30	100	0
30–35	100	0
35–40	75	25
40	75	25

2.4.3.4.2 ML-Liposomen

Für die Bestimmung der Verkapselungseffizienz des MLs wurde der A-Ketten-ELISA, wie unter 2.4.1 beschrieben, verwendet. Bei der Durchführung dieses Assays wurde jedoch auf den Zusatz von

Tween 20 sowohl bei den Waschschrritten als auch bei den Inkubationsschritten verzichtet, um ein vorzeitiges Zerstören der Liposomen zu verhindern.

Die ML-Liposomen mit einer Soll-Konzentration von 65 und 130 $\mu\text{g}/\text{mL}$ wurden mit PBS 1:5 verdünnt, die ML-Liposomen mit einer Soll-Konzentration von 260 und 520 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 1:10. Es wurden zwei unterschiedliche Probenreihen hergestellt, einmal mit noch intakten und einmal mit lysierten Liposomen. Dies war nötig, um das unverkapselte, lediglich adhärierende ML herausrechnen zu können. Die intakten Liposomen wurden mit PBS im Verhältnis 1:10 versetzt. Für die Lyse der Liposomen wurden die Liposomen (1:5- oder 1:10-Verdünnung) mit Tween 20 in PBS (1:450 V/V) ebenfalls in einem 1:10-Verhältnis gemischt. Anschließend wurden sowohl die intakten als auch die zu zerstörenden Proben für 90 Minuten bei 650 rpm geschüttelt. Die intakten und zerstörten ML-Liposomen wurden vermessen und daraus wurde die Verkapselungseffizienz bestimmt.

Die Verkapselungseffizienz wurde bestimmt, indem die Differenz aus Gesamtlektin (Liposomen nach der Lyse – zerstörte Liposomen) und adsorbiertem Lektin (Liposomen vor der Lyse – intakte Liposomen) zur eingesetzten ML-Sollkonzentration ins Verhältnis gesetzt wurde.

2.4.4 Zellbiologische Methoden

2.4.4.1 Kultivierung der Zellen

Die Suspensionszellen (THP-1, HL-60) wurden in 75 cm^2 -Suspensionskulturflaschen im Brutschrank bei 37 °C in gesättigter Wasserdampfatosphäre mit 5 % CO_2 kultiviert. Alle drei bis vier Tage wurde die THP-1-Kultur gedrittelt oder geviertelt. Die HL-60-Zelllinie wurde alle zwei bis drei Tage auf eine Zellzahl von $1\text{--}0,8 \times 10^6$ Zellen/mL ausgesät. Das Kulturmedium bestand bei beiden Suspensionszelllinien aus RPMI-Medium mit 10 % FBS und 1 % L-Alanyl-L-Glutamin und wurde ebenfalls für die Versuche verwendet.

Die adhärennten Zellen (143B, TC-71) wurden in 75 cm^2 -Zellkulturflaschen im Brutschrank bei 37 °C in gesättigter Wasserdampfatosphäre mit 5 % CO_2 kultiviert. Alle zwei bis drei Tage wurde die 143B- und die TC-71-Kultur auf eine Zellzahl von $15,625\text{--}6,25 \times 10^4$ Zellen/mL ausgesät. Um die Zellen abzulösen, wurde 1 mL Trypsin / EDTA-Lösung pro Flasche verwendet. Das Kulturmedium für die 143B-Zellen bestand aus DMEM-Medium mit 10 % FBS und 1 % L-Alanyl-L-Glutamin und wurde ebenfalls für die Versuche verwendet. Bei den TC-71-Zellen wurde IMDM-Medium mit einem 10%igen FBS-Anteil als Kultur- und Versuchsmedium gewählt.

Um die Zellzahl jeweils zu ermitteln, wurde die Neubauer-Zählkammer verwendet.

2.4.4.2 Durchflusszytometrie

2.4.4.2.1 Prinzip der Durchflusszytometrie

Die Durchflusszytometrie wurde genutzt, um die Viabilität der Zellen nach erfolgter Inkubation mit den verschiedenen Substanzen zu ermitteln. Mithilfe der Durchflusszytometrie ist es möglich, Zellen aus Suspensionen zu vermessen und entsprechend ihrer Größe, Komplexität und gegebenenfalls ihrer Fluoreszenz zu sortieren. Die Zellen werden einzeln hintereinander in einer schmalen Kammer im rechten Winkel an einem Laserstrahl vorbeigeführt. Je nach Aussehen der Zellen hinsichtlich auf Größe und Granularität wird ein unterschiedliches Spektrum an Streulicht erzeugt, das Rückschlüsse auf die Zellviabilität ermöglicht. Weiterhin ist es bei der Durchflusszytometrie möglich, durch zellzustandsspezifische Fluorochrome zwischen vitalen, früh- und spätapoptotischen Zellen zu unterscheiden.

In dieser Arbeit wurde der FACS Calibur[®] von der Firma Becton Dickinson verwendet, der in der Lage ist bei einer Wellenlänge von 488 und 635 nm anzuregen. Für die Anregung bei 488 nm wurde ein Argonionenlaser und für 635 nm ein roter Diodenlaser verwendet. Des Weiteren verfügt das Gerät über vier Detektoren (Photomultiplier), um die Fluoreszenz in den unterschiedlichen Wellenbereichen zu vermessen.

Die Auswertung erfolgte mithilfe der Cell Quest[®] und der FlowJo-Software. Um eine Einschätzung über die Zellviabilität zu erhalten, wurde der Fluoreszenzkanal 2 gegen den Fluoreszenzkanal 4 aufgetragen. Im Fluoreszenzkanal zwei erscheinen die Zellen, die Propidiumiodid (PI) gebunden haben, währenddessen im Kanal vier Zellen mit gebundenem Allophycocyanin (APC) Annexin V detektiert werden.

PI ist in der Lage, in spätapoptotische sowie nekrotische Zellen einzudringen, lagert sich dort in die DNA ein und führt zu einer Anfärbung der Zelle. Der Farbstoff kann aufgrund einer porösen Zellmembran, die nur im nekrotischen und spätapoptotischen Zustand vorhanden ist, in die Zelle gelangen. Für die Detektion von frühapoptotischen Zellen wird das Protein Annexin V, das mit dem Fluoreszenzfarbstoff APC gekoppelt ist, verwendet. Annexin V bindet spezifisch an Phosphatidylserin an der Zellmembran, das im frühen apoptotischen Stadium nach außen transloziert wird. Durch die kombinierte Verwendung von PI und APC / Annexin V kann eine Differenzierung zwischen frühapoptotischen und nekrotischen Zellen erfolgen. Im unteren linken Quadranten (Abb. 7) befinden sich die lebenden Zellen, bei denen es zu keiner oder einer minimalen Bindung mit PI und mit APC / Annexin V kommt (PI und APC / Annexin negativ).

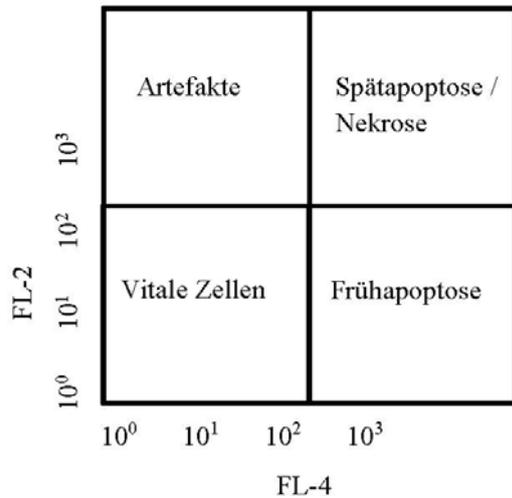


Abb. 7: Schematische Darstellung der FL-2 / FL-4-Kanal-Auswertung

Wenn es zu einer ausschließlichen Bindung mit PI (PI positiv) kommt, befinden sich die Zellen im oberen linken Quadranten und werden als Artefakte deklariert. Bei einer Doppelfärbung (PI und APC / Annexin positiv) sind die Zellen nekrotisch oder im spätapoptotischen Stadium und befinden sich im oberen rechten Quadranten. Im früh apoptotischen Stadium, nach bereits erfolgter Translokation von Phosphatidylserin, befinden sich die Zellen bei ausschließlicher APC / Annexin-Bindung (APC / Annexin positiv) im unteren rechten Quadranten.

2.4.4.2.2 Untersuchung der Suspensionszelllinien

Um die Viabilität zu bestimmen, wurde jeweils 1 mL der Zellsuspension (6×10^5 Zellen/mL) in 12-Well-Platten ausgesät und im Brutschrank bei 37 °C in gesättigter Wasserdampf-atmosphäre mit 5 % CO₂ kultiviert. Nach 24 Stunden erfolgte die Zugabe der verschiedenen ML- und TT-Proben in gleicher Konzentration und mit gleicher Inkubationszeit entsprechend der detaillierten Beschreibung im Kapitel 2.4.4.3. Zwei Kontrollproben wurden pro Zeit ebenfalls mitgeführt. Anschließend wurden die Zellen zweimal mit je 3 mL PBS versetzt und für fünf Minuten bei $1250 \times g$ zentrifugiert. Das entstandene Zellpellet wurde in 100 µL Annexin-V-Binding-Puffer resuspendiert und mit 3 µL Annexin-Farbstoff für 20 Minuten bei 4 °C im Dunkeln inkubiert. Das Abstoppen der Reaktion erfolgte mit 100 µL Annexinpuffer. Direkt vor der durchflusszytometrischen Messung wurde 1 µL PI-Färbelösung zugegeben.

2.4.4.2.3 Untersuchung der adhärenenten Zelllinien

Eine Beladung der 12-Well-Platten erfolgte mit jeweils 1 mL Zellsuspension (3×10^5 Zellen/mL), und eine Inkubation über 24 Stunden im Brutschrank bei 37 °C in gesättigter

Wasserdampf-atmosphäre mit 5 % CO₂ schloss sich an. Danach erfolgte die gleiche Probenzugabe und Inkubation entsprechend den Untersuchungen der ML-Aufnahme (siehe Kapitel 2.4.4.3). Für die Bestimmung der Viabilität wurden die Zellen mittels 100 µL Trypsin / EDTA-Lösung abgelöst und im Weiteren wie die Suspensionszellen behandelt (Kapitel 2.4.4.2).

2.4.4.3 Mistellektin-Aufnahme

2.4.4.3.1 Mistellektin-Standard, Viscum- und Triterpen-Extrakt-Chargen

Um die zeitabhängige Aufnahme des MLs aus dem ML-Standard und den Viscum-Extrakten durch die kultivierten Tumorzellen zu ermitteln, wurden 24-Well-Platten vorbereitet. Es wurden für die Suspensionszelllinien THP-1 und HL-60 240 000 Zellen pro Well und für die adhären Zellen 143B und TC-71 120 000 Zellen pro Well ausgesät. Diese Platten wurden über 24 Stunden bei 37 °C und bei 5%igem CO₂-Gehalt inkubiert. Anschließend wurde auf jeder Platte eine Standardreihe mit dem ML-Standard (20–340 ng/mL) im vorgelegten Kulturmedium ohne Zellen erstellt (Adler et al., 2009). Zu den ausgesäten Zellen wurden jeweils die entsprechende ML-Standard- oder Extrakt-Konzentration (Tab. 8, Tab. 9, Tab. 10, Tab. 11) ergänzt. Jede verwendete Konzentration wurde pro Platte dreifach aufgetragen. Zusätzlich wurde für jede untersuchte Konzentration pro Platte eine Kontrolle ohne Zellen erstellt.

Es wurde der ML-Standard und die Viscum-Extrakt-Chargen sowohl einzeln als auch in Kombination mit den entsprechenden TT-Extrakt-Chargen (Konzentration berechnet als OA) verwendet. Die Konzentrationseinstellung erfolgte jeweils vor dem Versuchsbeginn mit dem gleichen Kulturmedium, das zur Kultivierung der Zellen benötigt wurde. Jedes Experiment und dementsprechend jede untersuchte Konzentration wurde an mindestens drei verschiedenen Tagen durchgeführt.

Tab. 8: Verwendete ML- und OA-Konzentrationen im THP-1-Zellmodell

Probe	ML [ng/mL]	OA [µg/mL]
ML-Standard	88	
	66	-
	44	
	22	
Viscum 155	29	-
	21	
Viscum 157	42	-
	32	
Viscum 161.1	55	-
	41	
ViscumTT 161.1	55	25
	55	35

Probe	ML [ng/mL]	OA [μg/mL]
ViscumTT 161.1	41	25
	41	35
Viscum 161.2	59	-
	44	-
ViscumTT 161.2	59	25
	59	35
	44	25
	44	35

Der ML-Standard und die verwendeten Viscum- und TT-Extrakt-Chargen wurden mit dem THP-1-Zellmedium (RPMI 89 %, FBS 10 %, L-Alanyl-L-Glutamin 1 %) auf die jeweilige Konzentration eingestellt und den Zellen mit jeweils 100 μ L / Well zugesetzt. Die ML-Konzentrationen wurden mittels A-Ketten-ELISA ($n \geq 3$) bestimmt. OA wurde mithilfe einer GC / FID-Methode und einer externen Kalibrierung mit OA als Referenzsubstanz quantifiziert ($n \geq 3$).

Tab. 9: Verwendete ML- und OA-Konzentrationen im HL-60-Zellmodell

Probe	ML [ng/mL]	OA [μg/mL]
ML-Standard	66	-
	44	-
Viscum 155	29	-
	21	-
ViscumTT 155	29	20
	29	29
	21	20
	21	29
Viscum 157	42	-
	32	-
ViscumTT 157	42	18
	42	25
	32	18
	32	25
Viscum 161	55	-
	41	-
ViscumTT 161	55	25
	55	35
	41	25
	41	35

Der ML-Standard und die verwendeten Viscum- und TT-Extrakt-Chargen wurden mit dem HL-60-Zellmedium (RPMI 89 %, FBS 10 %, L-Alanyl-L-Glutamin 1 %) auf die jeweilige Konzentration eingestellt und den Zellen mit jeweils 100 μ L / Well zugesetzt. Die ML-Konzentrationen wurden mittels A-Ketten-ELISA ($n \geq 3$) bestimmt. OA wurde mithilfe einer GC / FID-Methode und einer externen Kalibrierung mit OA als Referenzsubstanz quantifiziert ($n \geq 3$).

Bei den adhären Zellen wurde die Aufnahme des MLs aus der Kombination der TT-Extrakt-Charge 155 mit dem ML-Standard untersucht (Tab. 10). Die ML-Aufnahme durch 143B-Zellen nach Zusatz einer methanolischen TT-Extrakt-Lösung und der Einfluss einer 2-HP- β -CD-Lösung auf die Aufnahme durch diese Zellen wurde zusätzlich analysiert (Tab. 11).

Tab. 10: Verwendete ML- und OA-Extrakt-Konzentrationen im TC-71- und 143B-Zellmodell

Probe	ML [ng/mL]	OA [μg/mL]
ML-Standard	66	-
	44	-
ML-Standard + TT 155	44	20
	44	29

Probe	ML [ng/mL]	OA [μg/mL]
ML-Standard + TT 155	33	20
	33	29
Viscum 155	29	-
	21	-
ViscumTT 155	29	20
	29	29
	21	20
	21	29
Viscum 157	42	-
	32	-
ViscumTT 157	42	18
	42	25
	32	18
	32	25
Viscum 161	55	-
	41	-
ViscumTT 161	55	25
	55	35
	41	25
	41	35

Der ML-Standard und die verwendeten Viscum- und TT-Extrakt-Chargen wurden mit dem TC-71-Zellmedium (IMDM 90 %, FBS 10 %) oder dem 143B-Zellmedium (DMEM 89 %, FBS 10 %, L-Alanyl-L-Glutamin 1 %) auf die jeweilige Konzentration eingestellt und den Zellen mit jeweils 100 μ L / Well zugesetzt. Die ML-Konzentrationen wurden mittels A-Ketten-ELISA ($n \geq 3$) bestimmt. OA wurde mithilfe einer GC / FID-Methode und einer externen Kalibrierung mit OA als Referenzsubstanz quantifiziert ($n \geq 3$).

Tab. 11: Verwendete OA- und 2-HP- β -CD-Konzentrationen im 143B-Zellmodell

Probe	OA [μg/mL]	2-HP-β-CD [mg/mL]
TT in MeOH	20	-
	35	-
2-HP-β-CD	-	240

Der verwendete TT-Extrakt in MeOH und die 2-HP- β -CD-Lösung wurde mit dem 143B-Zellmedium (DMEM 89 %, FBS 10 %, L-Alanyl-L-Glutamin 1 %) auf die jeweilige Konzentration eingestellt und den Zellen mit jeweils 100 μ L / Well zugesetzt. OA wurde mithilfe einer GC / FID-Methode und einer externen Kalibrierung mit OA als Referenzsubstanz quantifiziert ($n \geq 3$) und bei der 2-HP- β -CD-Lösung handelte es sich um einen Standard von Sigma Aldrich.

Die Inkubation mit den verschiedenen Zusätzen erfolgte 30, 60 und 120 Minuten lang im Brutschrank bei 37 °C in gesättigter Wasserdampfatosphäre mit 5 % CO₂.

Nach erfolgter Inkubation wurden sowohl die Überstände als auch die Zellen hinsichtlich des ML-Gehaltes mithilfe des etablierten A-Ketten-ELISAs untersucht. Dabei wurden jeweils 100 μ L der Überstände der Suspensions- und der adhärenen Zellen direkt vermessen.

Um die Konzentration des ML innerhalb der Zellen zu ermöglichen, erfolgte eine entsprechende Aufarbeitung. Die Suspensionzellen wurden abzentrifugiert, mit je 200 μ L PBS gewaschen, anschließend mit 500 μ L Lysepuffer versetzt und bei 500 rpm für 30 Minuten bei 4 °C geschüttelt. Daraufhin wurden die Proben für 20 Minuten bei 4 °C und 11200 \times g zentrifugiert.

Für die Bestimmung der ML-Konzentration in den adhärenen Zellen wurden sie mit je 200 μ L PBS gewaschen und anschließend mit 100 μ L Trypsin / EDTA-Lösung abgelöst. Daraufhin wurden sie

mit 400 μL Lysepuffer versetzt, bei 4 °C für 30 Minuten bei 500 rpm geschüttelt und anschließend für 20 Minuten bei 4 °C und $11200 \times g$ zentrifugiert. Die jeweils erhaltenen Überstände wurden ebenfalls mittels A-Ketten-ELISA mit je 100 μL pro Well direkt vermessen.

2.4.4.3.2 Mistellektin- und Triterpen-Liposomen

Die Untersuchung der ML-Aufnahme aus den hergestellten ML-Liposomen einzeln und in Kombination mit den hergestellten TT-Liposomen erfolgte analog zur bereits beschriebenen Versuchsdurchführung. Aufgrund der geringen Ausbeute bei der Liposomenherstellung wurde die Untersuchung auf die Inkubationszeiten von 30 und 120 Minuten beschränkt. Des Weiteren wurde die ML-Aufnahme aus den ML-Liposomen bei Einzelgabe und in Kombination mit den hergestellten TT-Liposomen bei jeweils einer gewählten Konzentration betrachtet (Tab. 12) und je Probe vierfach wiederholt. Für diese Untersuchungen wurden die Monozytenzelllinie THP-1 und die Osteosarkom-Zelllinie 143B ausgewählt.

Tab. 12: Verwendete ML- und OA-Konzentrationen der ML- und der TT-Liposomen im THP-1- und 143B-Zellmodell

Probe	ML [ng/mL]	ML [nM]	OA [$\mu\text{g/mL}$]	OA [μM]
ML-Liposomen	66	1,06	-	-
ML-Liposomen + TT-Liposomen	66	1,06	20	43,79

Die ML-Liposomen und die TT-Liposomen wurden mit dem THP-1-Zellmedium (RPMI 89 %, FBS 10 %, L-Alanyl-L-Glutamin 1 %) oder dem 143B-Zellmedium (DMEM 89 %, FBS 10 %, L-Alanyl-L-Glutamin 1 %) auf die jeweilige Konzentration eingestellt und den Zellen mit jeweils 100 μL / Well zugesetzt. Die ML-Konzentration wurde mittels A-Ketten-ELISA ($n \geq 3$) bestimmt. OA wurde mithilfe einer HPLC-Methode und einer externen Kalibrierung mit OA als Referenzsubstanz quantifiziert ($n \geq 2$).

2.4.4.4 iCelligence[®]-Messung – Impedanz-basierte Zellanalytik

Bei der iCelligence[®]-Messung handelt es sich um eine nicht-invasive Zellanalytik, die als Messprinzip die Ermittlung der Impedanz von adhärennten Zellen nutzt. Die Impedanz, auch als Wechselstromwiderstand bezeichnet, beschreibt das Verhältnis zwischen einer elektrischen Spannung und dem vorab aufgenommenen Strom.

Um den Wechselstromwiderstand, der durch das Anwachsen der Zellen entsteht, zu bestimmen, werden zur Kultivierung E-Plates L8[®] verwendet, die mit Mikroelektroden (Goldpartikeln)

ausgestattet sind. Mithilfe von Sensoren wird in einem schwachen elektrischen Feld die Impedanz zwischen dem Medium und den Mikroelektroden bestimmt (Abb. 8).

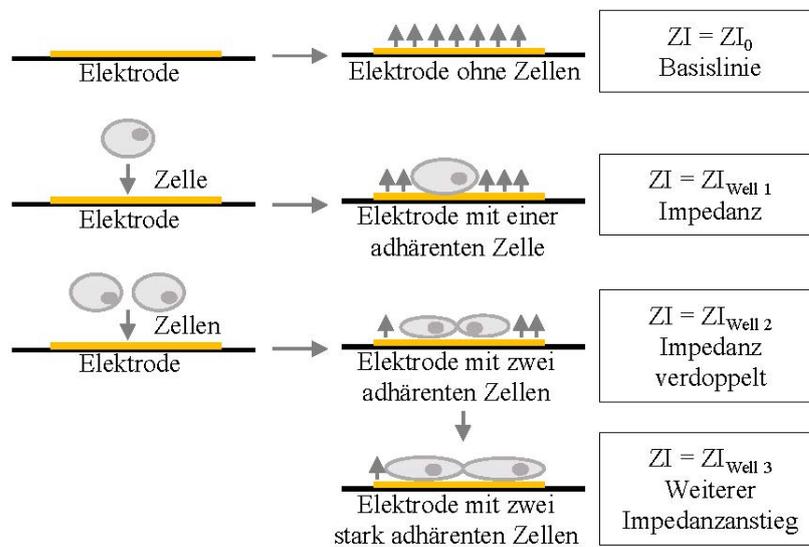


Abb. 8: Schematische Darstellung der Impedanzmodifikationen (nach ACEA Biosciences, 2013, modifiziert)
 ZI steht für Zellindex.

Der biologische Status der zu untersuchenden Zellen beeinflusst den gemessenen Wechselstromwiderstand. Auftretende Störungen oder Änderungen in der Zellkultur durch z. B. einen durchgeführten Mediumswechsel oder durch eine Toxinzugabe lassen sich anschließend in Echtzeit analysieren. Diese Impedanzänderungen werden mit dem dimensionslosen Parameter Zellindex (ZI) ausgedrückt. Der Zellindex zu einem bestimmten Zeitpunkt ($ZI(t)$) wird wie folgt berechnet:

$$ZI(t) = \frac{R(f_n, t) - R(f_n, t_0)}{Z_n}$$

f_n	gewählte Frequenz bei der Messung (10 kHz, 25 kHz oder 50 kHz)
$R(f_n, t)$	gemessene Impedanz bei entsprechender Frequenz und Zeit
$R(f_n, t_0)$	gemessene Impedanz bei entsprechender Frequenz zum Startzeitpunkt
Z_n	Frequenzfaktor für die gewählte Frequenz (15 Ω , 12 Ω oder 10 Ω)

Die Impedanz ist abhängig von den Zelleigenschaften, von möglichen Zell–Zell-Interaktionen und von der Beschaffenheit der Mikroelektroden. Unter gleichen experimentellen Bedingungen korreliert die Zunahme der Impedanz mit der erhöhten Adhärenz der Zellen.

Die Echtzeitanalysen wurden mit der adhären Osteosarkom-Zelllinie 143B durchgeführt, sowohl die Kultivierung als auch die Experimente verliefen im Brutschrank bei 37 °C in gesättigter Wasserdampf-atmosphäre mit 5 % CO₂, um die physiologischen Bedingungen über mehrere Stunden und Tage zu gewährleisten.

Es wurden pro Well 15 000 Zellen ausgesät, unter den genannten Bedingungen kultiviert und die ermittelten Impedanzwerte wurden während des kompletten Experiments in den ersten zwei Stunden minütlich, danach alle drei Minuten dokumentiert. Der ML-Standard wurde in Konzentrationen von 2,75–44 ng/mL verwendet. Die wässrige *Viscum*-Extrakt-Charge 155 wurde im gleichen Konzentrationsbereich, bezogen auf den ML-Gehalt, eingesetzt. Die TT-Extrakt-Charge 155 wurde in einem Konzentrationsbereich von 14–110 µg/mL, berechnet auf die OA, eingesetzt. Die Zugabe der Substanzen erfolgte in der exponentiellen Wachstumsphase der Zellen (bei 70- bis 80%iger Konfluenz). Wenn bei den Kontrollzellen eine 100%ige Konfluenz erreicht wurde (ca. 24 Stunden nach der Substanzzugabe), wurde der Versuch beendet und die Zytotoxizität abschließend mit einem MTT-Endpunktassay bestimmt.

Alle Versuchsansätze im Echtzeitmodus konnten aufgrund der geringen Probenaufgabemöglichkeiten des Gerätes (2 × 8-Well-Platte) pro Versuchstag und Platte nur einmalig aufgeführt werden (Ausnahme: Kontrollzellen wurden zweifach aufgetragen), jeder Versuch wurde insgesamt an drei verschiedenen Tagen durchgeführt. Die erhaltenen Zellindizes wurden jeweils auf den Zeitpunkt der Probenzugabe normalisiert, d.h. ein fester Zellindex von eins wurde für jedes Well bestimmt (normalisierter Zellindex), um somit den weiteren Verlauf untereinander mit einem gemeinsamen Startpunkt vergleichbar zu machen.

Der Einfluss der ML- und TT-Liposomen konnte aufgrund der geringen Liposomenausbeute lediglich an zwei Versuchstagen mit jedoch zweimaligem Auftragen (zwei Wells) untersucht werden.

2.4.4.5 MTT-Assay

Bei dem MTT-Assay handelt es sich um ein kolorimetrisches Testverfahren, um viable Zellen zu bestimmen. Bei diesem Experiment wird das gelbe, wasserlösliche Tetrazoliumsalz 3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazoliumbromid (MTT) durch stoffwechselaktive, lebende Zellen zu einem wasserunlöslichen, violetten Formazan reduziert (Abb. 9).

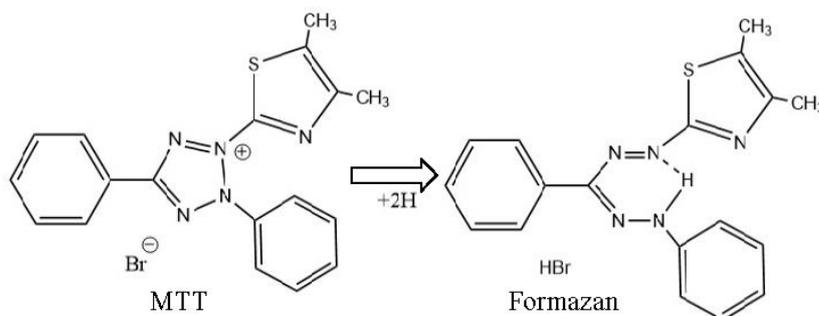


Abb. 9: Strukturformeln von MTT und Formazan (nach Stockert et al., 2012)

Diese Reduktion wird unter anderem von NADH- und NADPH-abhängigen Enzymen des Endoplasmatischen Retikulums (Mosmann, 1983, Berridge et al., 2005) katalysiert. Nach dem Zelltod verlieren diese Enzyme rasch ihre Aktivität, sodass die Bildung des Formazans im direkt proportionalen Verhältnis zur Anzahl der lebenden Zellen steht. Der genaue Wirkmechanismus ist jedoch bis heute nicht eindeutig geklärt. Dieser farbgebende Assay kann zur Zytotoxizitätsmessung herangezogen werden und wurde vor allem für die Endpunktanalyse verwendet.

Nachdem die iCelligence®-Messung beendet wurde, wurde nach ca. eintägiger Probeninkubation ein MTT-Assay durchgeführt. Dabei wurde das komplette Medium inklusive der gelösten Substanzen entfernt und jeweils 180 μL MTT-Lösung (0,5 mg/mL im Wachstumsmedium DMEM) pro Well zugesetzt. Die Inkubation erfolgte für 20 Minuten bei 37 °C in gesättigter Wasserdampfathmosphäre mit 5 % CO_2 . Das Medium und nicht umgesetztes MTT wurden entfernt und das gebildete unlösliche Formazan wurde mit 100 μL DMSO pro Well gelöst. Um die Messung im Microplattenreader zu ermöglichen, wurden die Lösungen jeweils durch mehrmaliges Aufziehen in eine 96 Well-Platte überführt. Diese Platte wurde für weitere fünf Minuten geschüttelt und anschließend bei einer Absorptionswellenlänge von 580 nm und bei einer Referenzwellenlänge von 620 nm vermessen. Um die Zytotoxizität der Substanzen zu ermitteln, wurden die erhaltenen Absorptionen der behandelten Zellen zu den Absorptionen der unbehandelten Kontrollzellen ins Verhältnis gesetzt. Da es sich um die Weiterführung der Echtzeitanalyse handelt, konnte für jede untersuchte Probe pro Versuchstag nur ein Absorptionswert zur Zytotoxizitätsmessung herangezogen werden, nach dreimaliger Durchführung jedes Versuches wurde der Mittelwert berechnet.

2.4.4.6 Lebendzell-Mikroskopie (Live-cell-imaging)

2.4.4.6.1 Prinzip

Die Lebendzell-Mikroskopie ermöglicht die Analyse von lebenden Zellen über einen längeren Zeitraum ohne jegliche Vorbehandlung und in Echtzeit. Statt einer Momentaufnahme wie bei fixierten Zellen kann durch dieses Verfahren die Dynamik und die Interaktionen von Proteinen, Organellen und Zellen untersucht werden, was ein besseres Verständnis der zellulären Vorgänge ermöglicht.

Durch die Verwendung eines konfokalen Laser-Scanning-Mikroskops kann eine detailgetreue Aufnahme der Zellen mit hohem Kontrast erzielt werden, dabei wird der Laser punktförmig auf das Präparat geleitet und das davon ausgehende Licht wird ebenfalls punktförmig auf einer Lochblende vor dem Detektor abgebildet. Die Lochblende verhindert somit das Durchdringen der Lichtstrahlen aus anderen Ebenen als der stark fokussierten Ebene, der Kontrast der Aufnahmen wird deutlich

gesteigert. Der Beleuchtungs- und Beobachtungsgang besitzen dadurch den gleichen Brennpunkt, sie sind konfokal. Um ein komplettes Bild zu konstruieren, muss das ganze Präparat Punkt für Punkt abgerastert und am Computer zusammengesetzt werden. Durch den Laser erfolgt eine intensive Anregung des Präparates und anschließend wird in den meisten Fällen die Fluoreszenz von speziellen Markern nachgewiesen. Um die Beobachtung der Zellen über einen längeren Zeitraum zu ermöglichen, müssen die Zellen bei optimaler Temperatur und pH-Wert gehalten werden und mit Mineralien und Nährstoffen versorgt werden. Um die Phototoxizität des Laserlichts zu minimieren, kann zusätzlich die Bestrahlungsdauer und -intensität des Präparates optimiert werden.

2.4.4.6.2 Labeling

ML-Standard-Ammoniumsulfatlösung wurde bei $12\,000 \times g$ für fünf Minuten zentrifugiert und der Überstand wurde komplett verworfen, um eine ammoniumfreie Proteinlösung zu erhalten. Das erhaltene Pellet wurde in einem Milliliter Natriumhydrogencarbonat-Puffer (0,1 M, pH 9) gelöst. 1 mg des Alexa-Fluor® 488 5-TFP-Farbstoffes wurde in 100 μL DMF gelöst und 50 μL wurden anschließend unter Schütteln zur ML-Lösung gegeben. Die Inkubation erfolgte über eine Stunde unter konstantem Schütteln bei 350 rpm. Um nicht gebundenen Farbstoff zu eliminieren, wurde zwei Tage gegen PBS mit mehrfachem Mediumswechsel dialysiert. Nach Abschluss der Aufreinigung wurde die Lösung zentrifugiert und der Überstand aliquotiert und tiefgefroren.

2.4.4.6.3 Durchführung der Lebendzell-Mikroskopie

Im Rahmen dieser Arbeit wurde die Osteosarkom-Zelllinie 143B ausgewählt, um die Zellvorgänge während der ML-Aufnahme über einen längeren Zeitraum detaillierter zu beobachten.

Zuerst wurde eine absolute Zellzahl von 24 000 Zellen in die Wachstumszone der speziell dafür vorgesehenen Zellschälchen Ibidi GmbH eingesät und für 30 Minuten bei $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ in gesättigter Wasserdampf Atmosphäre mit 5%igem CO_2 -Gehalt inkubiert, um die Zelladhäsion einzuleiten. Anschließend wurde 1,6 mL Zellmedium ergänzt und über mindestens 24 Stunden kultiviert. Nach 24 Stunden erfolgte die erste Zugabe von fluoreszenzmarkiertem ML-Standard. Es wurden mehrere Zellschälchen mit unterschiedlicher ML-Konzentration und mit unterschiedlichen Inkubationszeiten verwendet (Tab. 13). Für die Anfärbung von Endosomen wurde der Farbstoff pHrodo® Red Dextran verwendet, der mindestens 24 Stunden vor dem Beginn der Untersuchung in einer Arbeitskonzentration von 40 $\mu\text{g}/\text{mL}$ zu der Zellprobe gegeben wurde.

Tab. 13: Verwendete ML-Standard-Konzentrationen und die dazugehörigen Inkubationszeiten

ML [$\mu\text{g/mL}$]	ML [μM]	Zeit [h]
0,2	0,003	16
100	1,61	4,5
100	1,61	7,5
100	1,61	22
100	1,61	24
150	2,42	24
200	3,23	0,75

Jede verwendete Kombination wurde mindestens zweifach hergestellt und sowohl ohne als auch mit dem Zusatz von TT mikroskopisch untersucht.

Die anschließenden Untersuchungen wurden in Berlin-Buch am Leibniz-Institut für molekulare Pharmakologie (FMP) in der Arbeitsgruppe von Herrn Dr. Wiesner durchgeführt.

Vor dem Beginn der Untersuchung wurde das Medium und der nicht aufgenommene ML-Standard entfernt und die Zellen zweimal mit PBS gewaschen. Es wurde 2 mL Medium ergänzt und mit dem Farbstoff Hoechst 33343 in einer Arbeitskonzentration von 1 $\mu\text{g/mL}$ versetzt. Die Färbung fand 20 Minuten unter Lichtausschluss bei 37 °C in gesättigter Wasserdampfatosphäre mit 5%igem CO₂-Gehalt statt. Darauffolgend wurde zweimal mit PBS gewaschen. Abschließend wurde entweder, bei einer vorangegangenen Färbung der Endosomen 2 mL der „Live-Cell-Imaging“-Lösung mit 2 mM Glucose hinzugefügt oder es erfolgte eine Anfärbung der Zellmembranen mit CellMask®. Der Farbstoff wurde im Verhältnis 1:1000 mit der „Live-Cell-Imaging“-Lösung verdünnt und den Zellen für ca. zehn Minuten zugesetzt. Es wurde anschließend zweimal gewaschen und zum Abschluss wurde ebenfalls 2 mL von der „Live-Cell-Imaging“-Lösung mit 2 mM Glucose hinzugefügt. Die Beobachtung der Zellen erfolgte sowohl mit dem TT-Extrakt-Zusatz als auch ohne. Es wurde die TT-Extrakt-Charge 155 oder eine methanolische TT-Extrakt-Lösung hinzugefügt, die Zugabe erfolgte bei Beginn der Aufnahmen mit einer OA-Endkonzentration von 10 $\mu\text{g/mL}$ und wurde während des Versuchs auf eine maximale Endkonzentration von 60 $\mu\text{g/mL}$ gesteigert.

Die mikroskopische Betrachtung der Zellen erfolgte in der „Live-Cell-Imaging“-Lösung mit dem Zusatz von 2 mM Glucose und bei 37 °C mit dem konfokalen Laser-Scanning-Mikroskop über maximal zwei Stunden, alle 20 Sekunden wurde ein Scan der Zellen durchgeführt.

2.4.5 GC / FID-Analytik

2.4.5.1 Probenvorbereitung

Die GC / FID-Analytik diente der Bestimmung der lipophilen Mistel-TT-Säuren, vor allem OA. Die TT-Säuren wurden mittels Gaschromatographie getrennt und anschließend mit einem Flammenionisationsdetektor (FID) registriert. Eine Analyse mithilfe dieses instrumentellen

Verfahrens setzt eine leichte Verflüchtigung der Analyten voraus, mithilfe des Silylierungsreagenzes (Silylating Mixture Fluka III) konnten die schwerflüchtigen TT-Säuren derivatisiert und anschließend mittels GC / FID-Kopplung vermessen werden.

Für die Quantifizierung von unbekanntem Proben wurde jeweils der interne Standard Erythrodiol mit einer festen Konzentration mitgeführt. Die nicht-wässrigen Proben und die Standardlösungen wurden mit dem Silylierungsreagenz im Verhältnis von 5:1 versetzt und für 30 Minuten bei 70 °C im Trockenschrank erhitzt. Bei der Analyse der TT-Säuren aus einer biologischen Matrix wurden die Proben (0,5 mL) mit 2 mL Chloroform, das den internen Standard enthält, ausgeschüttelt. Die anschließend gewonnene lipophile Phase wurde ebenfalls im Verhältnis von 5:1 mit dem Silylierungsreagenz versetzt und für 30 Minuten bei 70 °C erhitzt.

Die Methode wurde sowohl für die Bestimmung in organischen Lösungsmitteln als auch im Serum mittels eines OA-Standards validiert. Für die Validierung im Serum wurde das Serum vor dem Ausschütteln mit dem OA-Standard versetzt.

2.4.5.2 GC / FID-Methode

Für die TT-Säuren-Bestimmung wurde die GC / FID-Anlage GC-2010 Plus von Shimadzu verwendet. Die gaschromatographische Trennung erfolgte an einer 30 m langen Phenomenex Zebron-35-Säule, die sich aus einem 35%igen Phenyl- und einem 65%igen Dimethylpolysiloxananteil zusammensetzt und besonders für die Analyse von Substanzen mit hohem Molekulargewicht und bei hohen Temperaturen geeignet ist. Als Trägergas wurde Stickstoff mit einer konstanten Flussrate von 0,66 mL/min verwendet. Die Probe (5 µL) wurde mittels einer Split-Ratio 20:1 bei 320 °C eingespritzt und die Trennung der Analyten erfolgte anschließend mit dem angegebenen Temperaturofenprogramm (Tab. 14). Als Detektor diente ein Flammenionisationsdetektor bei einer Temperatur von 335 °C. Als Makeup-Gas wurde Stickstoff mit 25 mL/min und als Brenngase Wasserstoff mit 50 mL/min und Luft mit 400 mL/min verwendet.

Tab. 14: Temperaturgradient des Säulenofens (Methodensequenz)

	Temperatur [°C]	Rate [°C/min]	Isotherme [min]	Temperatur
Starttemperatur	130	-	-	
Temperaturrampe 1	240	30	0	
Temperaturrampe 2	285	1	0	
Temperaturrampe 3	330	20	16	

Nach jeder vermessenen Probe wurde eine Spülsequenz mit purem Silylierungsreagenz durchlaufen. Als Trägergas wurde ebenfalls Stickstoff mit einer konstanten Flussrate von 1 mL/min verwendet. Die Silylierungsreagenz-Probe (1 µL) wurde mittels einer Split-Ratio 30:1 bei 330 °C eingespritzt

und folgendes Temperaturofenprogramm wurde durchlaufen (Tab. 15). Die anderen Einstellungen wurden analog zur Methodensequenz verwendet.

Tab. 15: Temperaturgradient des Säulenofens (Spülsequenz)

	Temperatur [°C]	Rate [°C/min]	Isotherme [min]	Temperatur
Starttemperatur	130	-	-	
Temperaturrampe 1	330	20	8	

2.5 Statistische Methoden

Als Ausreißertests wurden Dean-Dixon und Nalimov verwendet, zuvor wurde mithilfe des David-Tests auf Normalverteilung geprüft. Zur Bestimmung des signifikanten Unterschieds wurde der Wilcoxon-Mann-Whitney-Test bei einer Stichprobe ab drei Messwerten durchgeführt. Das Signifikanzniveau von $\alpha \leq 0,05$ wurde für alle Versuche gewählt. Bei den geringeren Stichprobenverhältnissen wurde die Signifikanz mittels zweiseitigem t-Test (Niveau von $\alpha \leq 0,05$) untersucht.

3 Ergebnisse

3.1 Methodenkriterien ELISA

Beide ELISA-Methoden wurden mithilfe der Viscum-Extrakt-Charge 155 in PBST und dem ML-Standard validiert.

3.1.1 Interassay-Variabilität

Für die Bestimmung der Interassay-Variabilität wurde die gleiche Charge mehrfach an verschiedenen Tagen und auf verschiedenen Platten gemessen und der Variationskoeffizient (*CV*), der prozentuale Anteil der Standardabweichung (*sdv*) am arithmetischen Mittelwert (*MW*), bestimmt. So wird die Präzision des Testverfahrens gekennzeichnet.

$$CV [\%] = \frac{sdv}{MW} \times 100 \%$$

$$CV (\text{A-Ketten-ELISA}) = 8,39 \%$$

$$CV (\text{A-B-Ketten-ELISA}) = 16,28 \%$$

3.1.2 Intraassay-Variabilität

Die Intraassay-Variabilität bezieht sich auf den Variationskoeffizienten für Wiederholungsmessungen innerhalb eines Versuchsansatzes, d.h. an einem Tag auf einer Maxisorp-Platte. Die Viscum-Extrakt-Charge 155 wurde in zwei verschiedenen Verdünnungen und jeweils dreifach vermessen. Die Berechnung erfolgte analog zur Interassay-Variabilität.

$$CV (\text{A-Ketten-ELISA}) = 3,42 \%$$

$$CV (\text{A-B-Ketten-ELISA}) = 16,09 \%$$

3.1.3 Nachweis- und Bestimmungsgrenze

Die Nachweis- (*LOD*) und Bestimmungsgrenze (*LOQ*) wurde wie folgt ermittelt:

$$\text{LOD} = A (\text{BW}) + 3 \times \text{sdv}$$

$$\text{LOQ} = A (\text{BW}) + 10 \times \text{sdv}$$

Die Absorptionen der Blindwerte wurden an zehn verschiedenen Tagen ermittelt. Durch Messung von ML-Standard-Proben in PBST-Puffer mithilfe beider Methoden ($n = 5$) konnten folgende Grenzen ermittelt werden (Tab. 16).

Tab. 16: Nachweis- und Bestimmungsgrenze der ELISA-Methoden in PBST

	LOD [ng/mL]	LOQ [ng/mL]
A-Ketten-ELISA	0,9	1,5
A-B-Ketten-ELISA	2,4	3,5

Die Nachweis- und Bestimmungsgrenze wurde durch die Messung verschiedener ML-Standard-Proben im A- und A-B-Ketten-ELISA bestimmt ($n = 5$).

Für die Bestimmung der intrazellulären ML-Konzentration wurde FBS-haltiges Medium als Grundlage für die ML-Standardgerade verwendet. Die Bestimmungsgrenze des A-Ketten-ELISAs im FBS-haltigem Medium wurde rechnerisch aus den Blindwerten mit FBS-haltigem Medium und der zehnfachen Standardabweichung für jede Messung ermittelt. Im Durchschnitt ergaben sich folgende Bestimmungs- und Nachweisgrenzen (Tab. 17).

Tab. 17: Nachweis- und Bestimmungsgrenze des A-Ketten-ELISAs im FBS-haltigem Medium

	LOD [ng/mL]	LOQ [ng/mL]
A-Ketten-ELISA	15	22

Die mittlere Nachweis- und Bestimmungsgrenze wurde rechnerisch pro Einzelmessung ermittelt.

Bei den durchgeführten Messungen der Tierseren (Kapitel 3.2.4) wurde gepooltes Serum von NSG-Mäusen als Grundlage für die ML-Standardgerade verwendet. Die Bestimmungsgrenze wurde aus den Serum-Blindwerten und der zehnfachen Standardabweichung rechnerisch für jede Messung ermittelt. Im vorliegenden NSG-Serum-Pool konnte eine geringere LOD und LOQ (Tab. 18) bestimmt werden als in der FBS- oder PBST-haltigen Grundlage.

Tab. 18: Nachweis- und Bestimmungsgrenze des A-Ketten-ELISAs im Tiermodell

	LOD [ng/mL]	LOQ [ng/mL]
A-Ketten-ELISA	0,4	0,5

Die mittlere Nachweis- und Bestimmungsgrenze wurde rechnerisch pro Einzelmessung ermittelt.

3.2 Mistellektin-Bestimmung

3.2.1 Bestimmung verschiedener Fertigarzneimittel

14 verschiedene Fertigarzneimittel wurden mittels A- und A–B-Ketten-ELISA im Rahmen dieser Arbeit quantifiziert. Im Folgenden sind die ermittelten ML-Konzentrationen angegeben (Tab. 19).

Tab. 19: Quantifizierung der Fertigarzneimittel

Fertigarzneimittel	Charge	Verwendbar bis	A-Ketten-ELISA ML [$\mu\text{g/ml}$]	A–B-Ketten-ELISA ML [$\mu\text{g/ml}$]	Verhältnis der Konzentrationen (A–B- zu A-Ketten-ELISA)
AbnobaViscum® Abietis 20 mg	406C32	Nov 17	$1,09 \pm 0,14$	$0,73 \pm 0,11$	0,67
AbnobaViscum® Fraxini 20 mg	401A17	Dez 16	$15,29 \pm 2,61$	$12,98 \pm 1,52$	0,85
AbnobaViscum® Mali 20 mg	412A18	Nov 17	$7,06 \pm 1,88$	$4,19 \pm 0,19$	0,59
AbnobaViscum® Pini 20 mg	304A22	Dez 16	$0,19 \pm 0,03$	$0,07 \pm 0,01$	0,37
Helixor® Abietis 10 mg	4124104	Apr 14	$0,03 \pm 0,01$	< LOQ	-
Helixor® Abietis 50 mg	4146109	Mrz 16	$0,34 \pm 0,05$	$0,12 \pm 0,01$	0,35
Helixor® Mali 50 mg	4146107	Mrz 16	$0,83 \pm 0,19$	$0,56 \pm 0,08$	0,67
Helixor® Pini 50 mg	4146006	Feb 16	$1,89 \pm 0,45$	$0,87 \pm 0,11$	0,46
	4134710	Dez 14	$2,14 \pm 0,22$	$2,18 \pm 0,34$	1,02
Iscador® Abietis 20 mg	5111 / 02	Apr 17	$0,01 \pm 0,003$	$0,01 \pm 0,003$	1
Iscador® Mali 20 mg	5187 / 02	Jun 17	$0,46 \pm 0,06$	$0,34 \pm 0,05$	0,74
Iscador® Pini 20 mg	5163 / 02	Mai 17	$0,003 \pm 0,0$	< LOQ	-
Iscucin® Abietis, Stärke H	A124640B	Nov 16	$1,96 \pm 0,35$	$1,6 \pm 0,22$	0,82
Iscucin® Mali, Stärke H	A124166B	Dez 16	$8,08 \pm 2,72$	$7,94 \pm 1,41$	0,98
Iscucin® Pini, Stärke H	A134017B	Mrz 17	$0,94 \pm 0,16$	$0,78 \pm 0,09$	0,83

Die ML-Quantifizierung erfolgte durch Messung der puren oder verdünnten Fertigarzneimittel. Jede Probe wurde dreifach je Platte und an mindestens vier verschiedenen Tagen je ELISA-Methode vermessen ($n \geq 4$). Der Mittelwert \pm Standardabweichung ist angegeben.

Bei der AbnobaViscum®-Fraxini-Ampulle konnte die höchste Konzentration an ML von $15,29 \pm 2,61 \mu\text{g/mL}$ ermittelt werden. Bei der Verwendung der Kiefer als Wirtsbaum zeigte sich ein sehr großer Konzentrationsunterschied zwischen den Präparaten der pharmazeutischen Unternehmer Helixor Heilmittel GmbH & Co. KG und Abnoba GmbH. Bei dem Tannenmistelauszug (Abietis)

konnte je nach Hersteller eine Konzentrationsspanne von $0,01 \pm 0,003 \mu\text{g/mL}$ bis $1,96 \pm 0,35 \mu\text{g/mL}$ festgestellt werden. Bei dem Präparat Iscador® Pini 20 mg konnte keine Konzentration der A–B-Kette ermittelt werden, da sie unter der Bestimmungsgrenze lag, ML konnte jedoch nachgewiesen werden. Die ermittelten Werte durch den A–B-Ketten-ELISA waren tendenziell geringer im Vergleich zur Methode des A-Ketten-ELISAs. Die Ausnahmen bildeten die Präparate Helixor® Pini 50 mg, Iscador® Abietis 20 mg und Iscucin® Mali, Stärke H, die ermittelte Konzentration lag hier im Verhältnis 1:1 vor.

3.2.2 Bestimmung der Mistelextrakte der Birken AG

Mit den entwickelten ELISA-Methoden wurden verschiedene Chargen von wässrigen Mistelextraktpräparationen der Firma Birken AG analysiert. Folgende Konzentrationen wurden ermittelt (Tab. 20).

Tab. 20: Quantifizierung der Viscum-Extrakt-Chargen

Charge	A-Ketten-ELISA ML [$\mu\text{g/mL}$]	A–B-Ketten-ELISA ML [$\mu\text{g/mL}$]	Verhältnis der Konzentrationen (A–B zu A- Ketten-ELISA)
142.L	$2,50 \pm 0,10$	$1,63 \pm 0,09$	0,65
154 L	$0,62 \pm 0,05$	$0,38 \pm 0,06$	0,62
155	$1,17 \pm 0,17$	$0,70 \pm 0,10$	0,60
157	$1,67 \pm 0,32$	$1,18 \pm 0,18$	0,71
161.1	$2,19 \pm 0,11$	$1,27 \pm 0,05$	0,58
161.2	$2,36 \pm 0,12$	$1,41 \pm 0,06$	0,60

Die ML-Quantifizierung erfolgte durch Messung der verdünnten Viscum-Extrakt-Chargen. Jede Probe wurde dreifach je Platte und an mindestens vier verschiedenen Tagen je ELISA-Methode vermessen ($n \geq 4$). Der Mittelwert \pm Standardabweichung ist angegeben.

3.2.3 Mistellektin-Bestimmung *ex vivo*

Die Bestimmung des MLs erfolgte im Blutserum von Schweinen, dabei wurde der ML-Standard entweder dem Vollblut oder dem abgetrennten Serum zugesetzt. Die Inkubationsdauer betrug jeweils 15 Minuten.

Im Vergleich der Zeitpunkte der ML-Zugabe (Zugabe zum Vollblut vs. Zugabe zum Serum) zeigte sich eine signifikant erhöhte Wiederfindungsrate bei den Proben, bei denen der ML-Standard dem Serum zugesetzt worden war (Abb. 10).

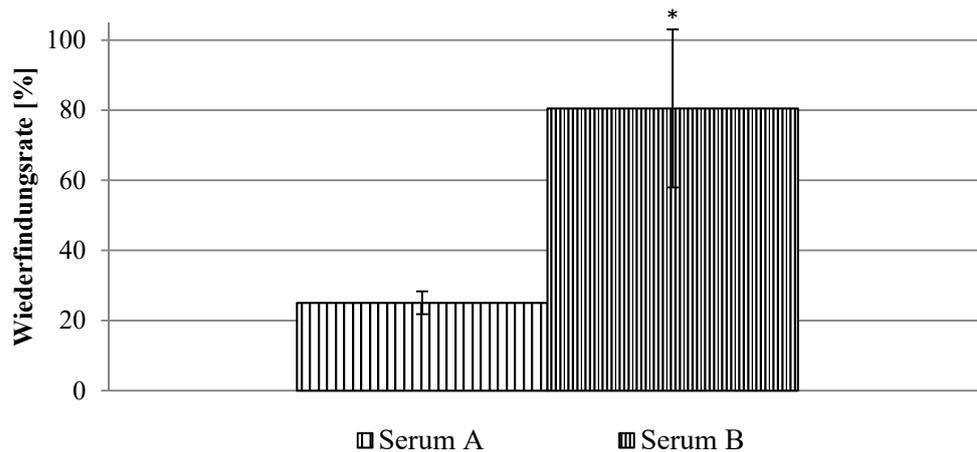


Abb. 10: Wiederfindungsrate des MLs im Blutserum

Serum A zeigt die Wiederfindungsrate des MLs nach Zugabe des MLs ins Vollblut und anschließende Abtrennung der zellulären Bestandteile. Serum B zeigt die Wiederfindungsrate des MLs nach Zugabe des MLs in das bereits gewonnene Serum (nach vorheriger Abtrennung der zellulären Bestandteile). Die Inkubation dauerte jeweils 15 Minuten. Der jeweilige Mittelwert ist angegeben und die Fehlerbalken stellen die Standardabweichungen dar (n = 6).

* signifikanter Unterschied zum Serum A, U-Test nach Wilcoxon-Mann-Whitney, $\alpha \leq 0,05$.

In einem weiteren Versuchsansatz wurden Blutseren von drei verschiedenen Schlachtschweinen verwendet, die jeweils mit ML-Standard für 30, 60 und 120 Minuten inkubiert wurden. Über diesen beobachteten Zeitraum zeigte sich für alle Seren im Durchschnitt die Wiederfindungsrate von $79,2 \pm 6,9$ % (Tab. 21).

Tab. 21: Wiederfindungsrate des MLs im Schweineserum

Zeit [min]	ML-Wiederfindungsrate [%]		
	Serum 1	Serum 2	Serum 3
30	$79,8 \pm 0,8$	$75,9 \pm 17,4$	$98,7 \pm 1,0$
60	$72,2 \pm 13,6$	$74,5 \pm 14,4$	$89,6 \pm 0,7$
120	$71,2 \pm 13,7$	$84,4 \pm 1,3$	$86,3 \pm 6,1$

Die jeweiligen Seren wurden von drei verschiedenen Schlachtschweinen gewonnen und anschließend mit dem ML-Standard (80 ng/mL) für 30, 60 und 120 Minuten inkubiert. Der jeweilige Mittelwert \pm Standardabweichung ist angegeben (n = 3).

3.2.4 Mistellektin-Quantifizierung *in vivo*

3.2.4.1 Mono-Versuch (Viscum-Extrakt)

Die etablierte Methode des A-Ketten-ELISAs zur Quantifizierung des MLs (2.4.1) wurde ebenfalls für die *In-vivo*-Bestimmung angewendet. Ein zeitlich begrenzter Viscum-Versuch wurde mit NSG (nod scid gamma)-Mäusen auf Veranlassung durch die Firma EPO (Experimental Pharmacology & Oncology) Berlin-Buch GmbH durchgeführt.

Bei den Tieren handelte es sich um völlig unbehandelte NSG-Mäuse, von denen jeweils drei Tiere eine Verumgruppe bildeten ($n = 3$). Bei der Kontrollgruppe (A) handelte es sich um NSG-Mäuse, die mit 2-HP- β -CD behandelt wurden. Den Tieren der Experimentalgruppen B, C und D wurde jeweils 6 μ g ML je kg Körpergewicht einmalig intravenös verabreicht, die Viscum-Extrakt-Charge 161 wurde verwendet. Die Inkubationszeit des MLs betrug für die Gruppe B 30, für die Gruppe C 60 und für die Gruppe D 120 Minuten. Nach der entsprechenden Inkubationszeit wurde der Versuch beendet und das vollständige Mausserum gewonnen. Für die Kalibrierung wurde gepooltes Serum von verschiedenen unbehandelten NSG-Mäusen verwendet. In Tabelle 22 sind alle Ausgangsdaten für den Tierversuch zusammengestellt. Für die Berechnung der initialen ML-Konzentration im Blut wurde ein mittleres Blutvolumen von 67,5 mL pro kg Körpergewicht zugrunde gelegt.

Tab. 22: Daten des In-vivo-Modells (Mono-Versuch mit der Viscum-Extrakt-Charge 161)

Gruppe	Tier	m [g]	ML [ng]	ML (initial) [ng/ml]
Kontrolle (A)	A1	22,50	0,00	0,00
	A2	21,81	0,00	
	A3	21,06	0,00	
30 min (B)	B1	18,64	111,84	88,9
	B2	19,25	115,50	
	B3	19,80	118,80	
60 min (C)	C1	21,85	131,10	88,9
	C2	22,44	134,64	
	C3	19,36	116,16	
120 min (D)	D1	19,61	117,66	88,9
	D2	20,50	123,00	
	D3	21,55	129,30	

Die NSG-Mäuse der Verumgruppen erhielten eine einmalige intravenöse Injektion von 6 ng ML je g Körpergewicht, dabei wurde die Viscum-Extrakt-Charge 161 verwendet. Die Kontrollmäuse erhielten 2-HP- β -CD einmalig. Die Dosierung wurde dem Gewicht des Tieres angepasst. Bei einem durchschnittlichen Blutvolumen von 67,5 mL je kg Körpergewicht ergaben sich folgende initial berechnete ML-Konzentrationen im Blut. Die Inkubation erfolgte 30, 60 und 120 Minuten ($n = 3$).

Die Bestimmung der durchschnittlichen *In-vivo*-Konzentration beim Mono-Versuch erfolgte durch Dreifachmessung der jeweiligen Seren im A-Ketten-ELISA (Tab. 23).

Im Mausversuch mit der ML-Gabe konnte sowohl für die Kontrollgruppe als auch für die 120-Minuten-Gruppe keine Konzentration ermittelt werden, die erhaltene Konzentration lag unter der Bestimmungsgrenze. Für die Gruppe D (120 Minuten) konnte jedoch ein geringer Anteil an ML bestimmt werden. Bei der Gruppe B (30 Minuten) konnte ein Wert von $1,6 \pm 0,5$ % bestimmt werden und bei der Gruppe C (60 Minuten) lediglich $0,9 \pm 0,2$ %. Interessanterweise war die bestimmte ML-Konzentration im Serum im Vergleich zur injizierten Konzentration sehr gering. Bereits nach zwei Stunden konnte im Serum kein ML mehr quantifiziert werden.

Tab. 23: Ermittelte ML-Konzentration im *In-vivo*-Modell (Mono-Versuch)

Gruppe	Tier	ML (initial) [ng/mL]	ML (Serum) [ng/mL]	Serum-ML-Anteil [%]	Serum-ML-Anteil pro Gruppe [%]
Kontrolle (A)	A1		< LOQ	-	
	A2	0,0	< LOQ	-	-
	A3		< LOQ	-	
30 min (B)	B1		1,9 ± 0,1	2,1 ± 0,1	
	B2	88,9	1,4 ± 0,3	1,5 ± 0,3	1,6 ± 0,5
	B3		1,1 ± 0,2	1,2 ± 0,3	
60 min (C)	C1		1,0 ± 0,2	1,1 ± 0,2	
	C2	88,9	0,7 ± 0,2	0,8 ± 0,2	0,9 ± 0,2
	C3		0,8 ± 0,4	0,9 ± 0,4	
120 min (D)	D1		< LOQ	-	
	D2	88,9	< LOQ	-	-
	D3		< LOQ	-	

Den NSG-Mäusen wurde 6 µg ML je kg Körpergewicht in Form der Viscum-Extrakt-Charge 161 gespritzt, die Kontrollmäuse erhielten 2-HP-β-CD und nach 30, 60 und 120 Minuten wurde das Serum von allen Tieren gewonnen (n = 3). Die initiale ML-Konzentration wurde rechnerisch bei einem mittleren Blutvolumen von 67,5 mL je kg Körpergewicht ermittelt. Die ML-Serum-Konzentration ± Standardabweichung wurde über eine Dreifachmessung mittels A-Ketten-ELISA im Serum bestimmt. Die Werte der Kontrolle und der 120-Minuten-Gruppe waren unter der Bestimmungsgrenze.

3.2.4.2 Kombinationsversuch (ViscumTT-Extrakt)

Weiterhin wurde ein Tierversuch mit der Kombination ViscumTT durchgeführt, dazu wurde sowohl eine ML- als auch eine OA-Dosis verabreicht. Die Versuchsdurchführung und die Dosierungen waren identisch zum Mono-Versuch, zusätzlich wurde eine OA-Konzentration von 80 mg je kg Körpergewicht einmalig intravenös verabreicht, die Viscum- und die TT-Extrakt-Charge 161 wurde verwendet. In Tabelle 24 sind die relevanten Daten des Versuchs für die ML-Quantifizierung zusammengefasst. Die weiteren Daten der fehlenden Versuchsgruppen (B, C, D – alleinige TT-Extrakt-Gabe) befinden sich in der Tabelle 44 im Kapitel 3.8.5 im Bereich der GC / FID-Analytik. Für die Berechnung der initialen ML- und OA-Konzentration im Blut wurde ebenfalls ein mittleres Blutvolumen von 67,5 mL pro kg Körpergewicht verwendet.

Tab. 24: Daten des *In-vivo*-Modells (Kombinationsversuch mit der Viscum- und der TT-Extrakt-Charge 161)

Gruppe	Tier	m [g]	ML [ng]	ML (initial) [ng/ml]	OA [mg]	OA (initial) [mg/ml]
Kontrolle (H)	H1	24,10	-		-	
	H2	25,42	-	-	-	-
	H3	25,96	-		-	
30 min (E)	E1	22,69	136,14		1,82	
	E2	25,52	153,12	88,9	2,04	1,2
	E3	25,70	154,2		2,06	
60 min (F)	F1	25,73	154,38		2,06	
	F2	21,75	130,5	88,9	1,74	1,2
	F3	24,20	145,2		1,94	

Gruppe	Tier	m [g]	ML [ng]	ML (initial) [ng/ml]	OA [mg]	OA (initial) [mg/ml]
120 min (G)	G1	24,70	148,2	88,9	1,98	1,2
	G2	24,46	146,76		1,96	
	G3	23,43	140,58		1,87	

Die NSG-Mäuse der Verumgruppen erhielten eine intravenöse Injektion von 6 µg ML und von 80 mg OA je kg Körpergewicht, dabei wurde die ViscumTT-Extrakt-Charge 161 verwendet. Die Kontrollmäuse (Gruppe H) erhielten 2-HP-β-CD einmalig. Die ML- und TT-Dosierung wurde entsprechend dem Gewicht des Tieres angepasst. Bei einem durchschnittlichen Blutvolumen von 67,5 mL je kg Körpergewicht ergaben sich folgende initial berechnete ML- und OA-Konzentrationen im Blut. Die Inkubation erfolgte 30, 60 und 120 Minuten (n = 3).

Beim Mausversuch mit der kombinierten Gabe der Viscum- und TT-Extrakt-Charge 161 konnte die ML-Konzentration pro Tier im Serum zweifach mit dem A-Ketten-ELISA bestimmt werden (Tab. 25). Für die Kontrollgruppe konnte keine ML-Konzentration detektiert werden. In den Untersuchungsgruppen konnte ein im Vergleich zum Mono-Versuch geringerer Abfall der ML-Serum-Konzentration über 120 Minuten beobachtet werden.

Tab. 25: Ermittelte ML-Konzentration im *In-vivo*-Modell (Kombinationsversuch)

Gruppe	Tier	ML (initial) [ng/mL]	ML (Serum) [ng/mL]	Serum-ML- Anteil [%]	Serum-ML- Anteil pro Gruppe [%]
Kontrolle (H)	H1	0,0	< LOQ	-	-
	H2		< LOQ	-	
	H3		< LOQ	-	
30 min (E)	B1	88,9	2,5 ± 0,1	2,8 ± 0,1	3,1 ± 0,4
	B2		3,1 ± 0,2	3,5 ± 0,2	
	B3		2,5 ± 0,2	2,9 ± 0,2	
60 min (F)	C1	88,9	2,8 ± 0,2	3,1 ± 0,2	2,6 ± 0,5
	C2		2,3 ± 0,3	2,6 ± 0,4	
	C3		1,9 ± 0,0	2,1 ± 0,0	
120 min (G)	D1	88,9	1,7 ± 0,1	1,9 ± 0,1	1,8 ± 0,2
	D2		1,7 ± 0,2	1,9 ± 0,2	
	D3		1,5 ± 0,1	1,7 ± 0,1	

Den NSG-Mäusen wurde 6 µg ML je kg Körpergewicht und 80 mg OA je kg Körpergewicht in Form der ViscumTT-Extrakt-Charge 161 gespritzt. Die Kontrollmäuse erhielten 2-HP-β-CD. Nach 30, 60 und 120 Minuten wurde das Serum gewonnen (n = 3). Die initiale ML-Konzentration wurde rechnerisch ermittelt. Die ML-Serum-Konzentration ± Standardabweichung wurde über eine Dreifachmessung mittels A-Ketten-ELISA im Serum bestimmt. Die Werte der Kontrollen waren unter der Bestimmungsgrenze.

3.3 Liposomenherstellung

3.3.1 Liposomengröße und Zetapotential

3.3.1.1 Triterpen-Liposomen

Alle hergestellten leeren und TT-Liposomen wurden mittels Zetasizer Nano ZS charakterisiert. Durch Dreifachmessung wurden die jeweiligen Partikelgrößen und die jeweiligen Zetapotentiale bestimmt.

In folgender Tabelle 26 sind die Werte für die verschiedenen Liposomen zusammengefasst.

Tab. 26: Partikelgröße, Polydispersitätsindex und Zetapotential der leeren und der TT-Liposomen (1)

Probe	Partikelgröße [nm]	PDI	Zetapotential [mV]
Liposomen leer (1)	132,30 ± 0,35	0,21 ± 0,01	-3,06 ± 0,80
Liposomen leer (2)	95,6 ± 1,04	0,25 ± 0,01	-4,94 ± 0,96
TT-Liposomen 5 µg/mL OA	147,53 ± 0,29	0,16 ± 0,01	-3,41 ± 0,34
TT-Liposomen 10 µg/mL OA	154,00 ± 2,39	0,14 ± 0,00	-4,06 ± 0,22
TT-Liposomen 20 µg/mL OA	136,87 ± 1,47	0,15 ± 0,00	-3,09 ± 0,16
TT-Liposomen 40 µg/mL OA	118,57 ± 2,17	0,24 ± 0,00	-3,74 ± 0,06
TT-Liposomen 80 µg/mL OA	139,37 ± 2,71	0,17 ± 0,02	-2,94 ± 0,52
TT-Liposomen 160 µg/mL OA	93,08 ± 1,55	0,25 ± 0,00	-3,29 ± 0,38
TT-Liposomen 320 µg/mL OA	76,11 ± 0,36	0,26 ± 0,01	-3,59 ± 0,48
TT-Liposomen 640 µg/mL OA	202,57 ± 5,64	0,37 ± 0,02	-7,88 ± 6,67

Die Bestimmung der Partikelgröße, des Polydispersitätsindex und des Zetapotentials erfolgte mittels Dreifachbestimmung durch den Zetasizer Nano ZS. Der Mittelwert ± Standardabweichung wird angegeben.

Bei den TT-Liposomen 640 µg/mL OA konnte kein stabiles Zetapotential ermittelt werden, was an einem Variationskoeffizienten von 84,6 % deutlich erkennbar ist. Des Weiteren war die ermittelte Partikelgröße von $202,57 \pm 5,64$ nm und der PDI von $0,37 \pm 0,02$ deutlich erhöht. Diese Eigenschaften zeigen eine unregelmäßige Größenverteilung und eine lediglich schwach ausgeprägte Liposomenstabilität. Die anderen hergestellten Liposomen zeigten einen guten PDI ($< 0,3$) und dementsprechend eine enge Größenverteilung. Ein durchschnittliches Zetapotential von $-3,40 \pm 0,38$ mV zeigt eine relativ stabile Liposomenbildung an, die unabhängig von der zugesetzten OA-Konzentration war.

Für anschließende Zellversuche wurden weitere fünf Liposomen-Proben mit einer OA-Soll-Konzentration von 160 µg/mL hergestellt. Aufgrund des hohen Verbrauchs der Hüllsubstanz PC wurde die gleiche Substanz erneut bestellt und weitere zehn Proben mit neuem PC angefertigt.

Bei der Vermessung dieser Liposomen konnte ein signifikanter Unterschied bezüglich der Partikelgröße, des PDI und des Zetapotentials ermittelt werden (Tab. 27).

Tab. 27: Partikelgröße, Polydispersitätsindex und Zetapotential der TT-Liposomen (2)

Probe	Partikelgröße [nm]	PDI	Zetapotential [mV]
TT-Liposomen 160 µg/mL OA – altes PC	128,73 ± 5,92	0,25 ± 0,03	-3,01 ± 1,34
TT-Liposomen 160 µg/mL OA – neues PC	91,15 ± 19,54	0,52 ± 0,17	-11,22 ± 0,40

Die Bestimmung der Partikelgröße, des Polydispersitätsindex und des Zetapotentials erfolgte mittels Dreifachbestimmung durch den Zetasizer Nano ZS. Der Mittelwert ± Standardabweichung wird angegeben.

3.3.1.2 Mistellektin-Liposomen

Die hergestellten ML-Liposomen wurden ebenfalls mittels Zetasizer Nano ZS charakterisiert. Durch Dreifachmessung wurden die jeweiligen Partikelgrößen und die jeweiligen Zetapotentiale bestimmt (Tab. 28).

Tab. 28: Partikelgröße, Polydispersitätsindex und Zetapotential der ML-Liposomen

Probe	Partikelgröße [nm]	PDI	Zetapotential [mV]
ML-Liposomen 65 µg/mL	106,87 ± 0,71	0,27 ± 0,00	-4,56 ± 0,97
ML-Liposomen 130 µg/mL	89,80 ± 2,25	0,37 ± 0,01	-2,52 ± 0,56
ML-Liposomen 260 µg/mL	92,80 ± 0,73	0,40 ± 0,01	-1,79 ± 0,12
ML-Liposomen 520 µg/mL	112,10 ± 1,84	0,26 ± 0,00	-2,16 ± 0,48

Die Bestimmung der Partikelgröße, des Polydispersitätsindex und des Zetapotentials erfolgte mittels Dreifachbestimmung durch den Zetasizer Nano ZS. Der Mittelwert ± Standardabweichung wird angegeben.

Bei der Charakterisierung der ML-Liposomen konnte im Vergleich zu den TT-Liposomen zum Teil geringere Partikelgrößen ermittelt werden, jedoch war der PDI erhöht. Die Zetapotentiale befanden sich ebenfalls im schwach negativen Bereich. Die Herstellung von weiteren ML-Liposomen mit neuem PC war aufgrund der begrenzten Menge an verfügbarem ML-Standard nicht möglich gewesen.

3.3.2 Beladung und Verkapselungseffizienz

3.3.2.1 Triterpen-Liposomen

Mithilfe der im Kapitel 2.4.3.4 beschriebenen HPLC-Methode konnte der OA-Gehalt in den Liposomen bestimmt werden. In Abbildung 11 ist exemplarisch das Chromatogramm für den OA-Standard in einer Konzentration von 50 µg/mL dargestellt.

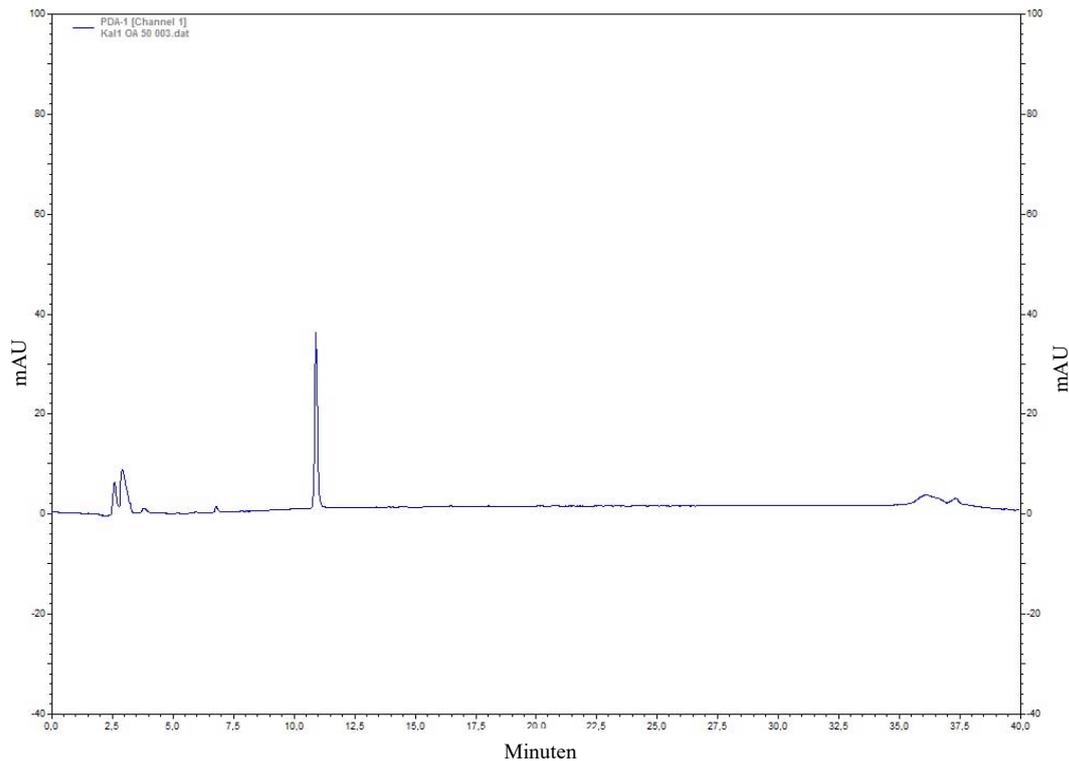


Abb. 11: HPLC-Chromatogramm von OA mit einer Konzentration von 50 µg/mL
50 µg/mL OA wurde in Methanol gelöst und 10 µL dieser Lösung wurden gespritzt.

Um die optimale TT-Konzentration zu ermitteln, wurden zuerst acht verschiedene Liposomen (5, 10, 20, 40, 80, 160, 320 und 640 µg/mL) jeweils zweifach hergestellt und die Beladung und daraus resultierend die Verkapselungseffizienz der Liposomen bestimmt (Tab. 29).

Tab. 29: OA-Gehalt und Verkapselungseffizienz der TT-Liposomen (1)

Probe	OA [µg/mL]	Verkapselungseffizienz [%]
Liposomen leer	-	-
TT-Liposomen 5 µg/mL OA	-	-
TT-Liposomen 10 µg/mL OA	-	-
TT-Liposomen 20 µg/mL OA	-	-
TT-Liposomen 40 µg/mL OA	29,0 ± 9,7	72,5 ± 24,3
TT-Liposomen 80 µg/mL OA	8,3 ± 3,3	10,4 ± 4,1
TT-Liposomen 160 µg/mL OA	51,2 ± 4,2	32,0 ± 2,6
TT-Liposomen 320 µg/mL OA	10,5 ± 3,3	3,3 ± 1,0
TT-Liposomen 640 µg/mL OA	-	-

Die Bestimmung der OA-Konzentration erfolgte mittels HPLC-Methode und einer externen Kalibrierung mit OA als Referenzsubstanz ($n \geq 2$). Der Mittelwert \pm Standardabweichung wird angegeben. Die Verkapselungseffizienz wurde rechnerisch aus der eingesetzten OA-Soll-Konzentration ermittelt.

Damit für die anschließenden Zellversuche eine OA-Konzentration von mindestens 20 µg/mL vorhanden ist, wurden weitere Liposomen mit einem OA-Sollgehalt von 160 µg/mL hergestellt. Zunächst wurden fünf Proben mit dem bereits zuvor verwendeten PC hergestellt. Aufgrund des hohen Verbrauchs der Hüllsubstanz wurde die gleiche Ausgangssubstanz erneut bestellt und weitere

zehn Proben hergestellt. Bei der anschließenden Bestimmung der Beladung der Liposomen konnte eine deutlich gesteigerte Einlagerung der OA bestimmt werden (Tab. 30).

Tab. 30: OA-Gehalt und Verkapselungseffizienz der TT-Liposomen (2)

Probe	OA [$\mu\text{g/mL}$]	Verkapselungseffizienz [%]
TT-Liposomen 160 $\mu\text{g/mL}$ OA – altes PC	90,1 \pm 15,2	56,3 \pm 9,5
TT-Liposomen 160 $\mu\text{g/mL}$ OA – neues PC	160,2 \pm 8,6	100,1 \pm 5,3

Die Bestimmung der OA-Konzentration erfolgte mittels HPLC-Methode und einer externen Kalibrierung mit OA als Referenzsubstanz ($n \geq 2$). Der Mittelwert \pm Standardabweichung wird angegeben. Die Verkapselungseffizienz wurde rechnerisch aus der eingesetzten OA-Soll-Konzentration ermittelt.

Für die anschließenden Zellversuche wurden aufgrund des OA-Gehalts, der Liposomengröße und des Zetapotentials ausschließlich die Liposomen mit dem neuen PC verwendet.

3.3.2.2 Mistellektin-Liposomen

Die Beladung der Liposomen mit ML wurde mit dem A-Ketten-ELISA, wie in Kapitel 2.4.1 beschrieben, bestimmt. Bei der Durchführung dieses Assays wurde jedoch auf den Zusatz von Tween 20 sowohl bei den Waschschrritten als auch bei den Inkubationsschritten verzichtet, um ein vorzeitiges Zerstören der Liposomen zu verhindern. Vor der Bestimmung der Beladung und der Verkapselungseffizienz wurden die ersten vier Fraktionen der Größenausschlusschromatographie, die die ML-Liposomen enthielten, vereinigt. Die im Anschluss gesammelten Fraktionen, die mit dem Waschpuffer PBS erhalten wurden, enthielten kein ML. Die weiteren Fraktionen, die mit dem Lösungspuffer (0,1 M D-Galaktose in PBS-Puffer) gewonnen wurden, wurden sequentiell ebenfalls im ELISA bestimmt und ML war darin bis zur letztangefangenen 20. Probe (10 mL) nachweisbar. Da das freie ML keine weitere Bedeutung in diesen Versuchen erlangte, wurde auf eine weitere Betrachtung verzichtet.

In Tabelle 31 sind die ermittelten ML-Werte für die intakten und zerstörten ML-Liposomen und die daraus resultierende Beladung und Verkapselungseffizienz zusammengefasst.

Tab. 31: ML-Gehalt, Beladung und Verkapselungseffizienz der ML-Liposomen

Probe	ML vor Lyse [$\mu\text{g/mL}$]	ML nach Lyse [$\mu\text{g/mL}$]	ML-Beladung [$\mu\text{g/mL}$]	Verkapselungseffizienz [%]
ML-Liposomen 65 $\mu\text{g/mL}$	2,9 \pm 0,6	6,4 \pm 0,3	3,2 \pm 0,6	4,8 \pm 0,9
ML-Liposomen 130 $\mu\text{g/mL}$	7,6 \pm 0,5	12,2 \pm 1,8	4,7 \pm 1,2	3,6 \pm 1,0
ML-Liposomen 260 $\mu\text{g/mL}$	23,5 \pm 2,1	33,7 \pm 3,0	7,5 \pm 0,8	2,9 \pm 0,3

Probe	ML vor Lyse [$\mu\text{g/mL}$]	ML nach Lyse [$\mu\text{g/mL}$]	ML-Beladung [$\mu\text{g/mL}$]	Verkapselungseffizienz [%]
ML-Liposomen 520 $\mu\text{g/mL}$	15,9 \pm 2,9	36,9 \pm 3,7	24,6 \pm 0,7	4,7 \pm 0,1

Die ML-Quantifizierung erfolgte durch Messung der verdünnten intakten und zerstörten ML-Liposomen. Jede Probe wurde dreifach je Platte und an mindestens drei verschiedenen Tagen mittels ELISA-Methode vermessen ($n \geq 3$). Die Verkapselungseffizienz wurde rechnerisch aus der eingesetzten ML-Sollkonzentration ermittelt. Der Mittelwert \pm Standardabweichung ist angegeben.

Eine durchschnittliche Verkapselungseffizienz aller vier Liposomenproben (je zweifach hergestellt) von 4 \pm 0,9 % wurde ermittelt, die nicht von der zugesetzten ML-Konzentration abhängig war.

Bei der Gegenüberstellung von adsorbiertem und verkapseltem ML zeigten die ML-Liposomen 130 und 260 $\mu\text{g/mL}$ eine deutlich erhöhte Adsorption statt eines Einschlusses (Tab. 32). Bei den anderen zwei ML-Liposomen konnte dagegen ein größerer ML-Anteil verkapselt werden.

Tab. 32: Adsorption und Verkapselungseffizienz der ML-Liposomen

Probe	Adsorption [%]	Verkapselungseffizienz [%]
ML-Liposomen 65 $\mu\text{g/mL}$	4,5 \pm 0,9	4,8 \pm 0,9
ML-Liposomen 130 $\mu\text{g/mL}$	5,8 \pm 0,4	3,6 \pm 1,0
ML-Liposomen 260 $\mu\text{g/mL}$	9,0 \pm 0,8	2,9 \pm 0,3
ML-Liposomen 520 $\mu\text{g/mL}$	3,0 \pm 0,6	4,7 \pm 0,1

Die Adsorption und die Verkapselungseffizienz wurden rechnerisch aus der eingesetzten ML-Soll-Konzentration ermittelt. Der Mittelwert \pm Standardabweichung ist angegeben.

Für die anschließenden Zellversuche wurden aufgrund des ML-Gehalts, der Liposomengröße und des Zetapotentials die Proben der ML-Liposomen 520 $\mu\text{g/mL}$ verwendet. Für die Experimente wurde stets von dem gesamten ML-Gehalt aus adsorbiertem und dem verkapseltem ML-Anteil (entspricht dem ML-Gehalt nach der Lyse – 36,9 \pm 3,7 $\mu\text{g/mL}$ ML) ausgegangen.

3.4 Durchflusszytometrische Messungen

Die Auswirkungen jeder eingesetzten Konzentration des ML-Standards, der Viscum- und der TT-Extrakt-Chargen auf die Zellviabilität wurde im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle durchflusszytometrisch nach 30, 60 und 120 Minuten untersucht.

3.4.1 THP-1-Zelllinie

In Abbildung 12 ist die Viabilität der THP-1-Zellen dargestellt. Die verwendeten Konzentrationen führten bei einer Inkubation von maximal 120 Minuten zu keinem signifikanten Unterschied im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle. Weiterhin zeigte die Kombination der Extrakte mit den TT-Extrakten keine Abstufungen hinsichtlich der Überlebensrate im Vergleich zu den reinen Extrakten.

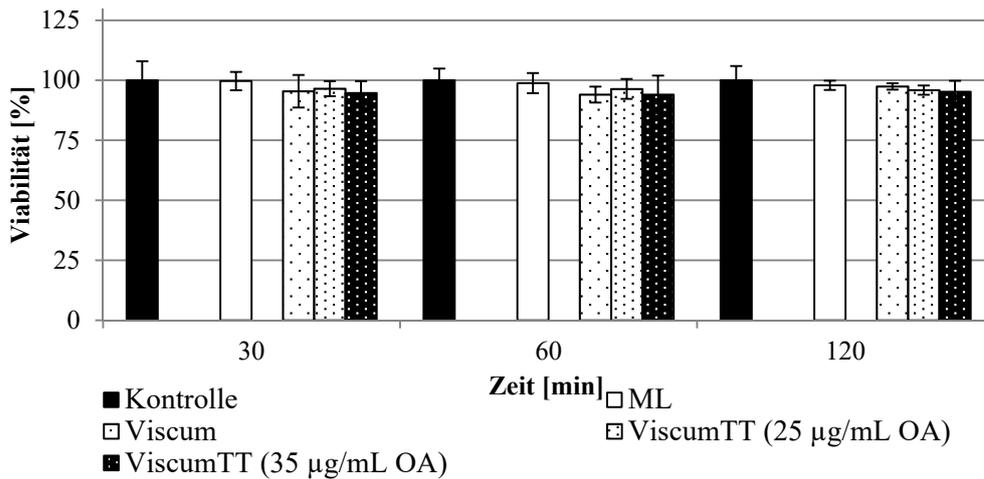


Abb. 12: Zellviabilität der THP-1-Zelllinie (1)

Die THP-1-Zellen wurden analog mit dem ML-Standard (22–88 ng/mL), den Viscum-Extrakt-Chargen 155, 157, 161 (21–55 ng/mL) und den ViscumTT-Extrakt-Chargen 161-Kombinationen (41 / 55 ng/mL ML + 25 / 35 µg/mL OA) für 30, 60 und 120 Minuten inkubiert. Die Ergebnisse präsentieren die Mittelwerte der jeweiligen Gruppen (ML, Viscum, ViscumTT) und beziehen sich auf die unbehandelten Zellkontrollen. Die Fehlerbalken stellen die Standardabweichungen bei n = 4 bei zwei unabhängigen Versuchen dar.

Ebenfalls wurden die Auswirkungen der ML-Liposomen auf die THP-1-Zelllinie untersucht und es konnte kein signifikanter Unterschied zur unbehandelten Kontrolle festgestellt werden (Abb. 13).

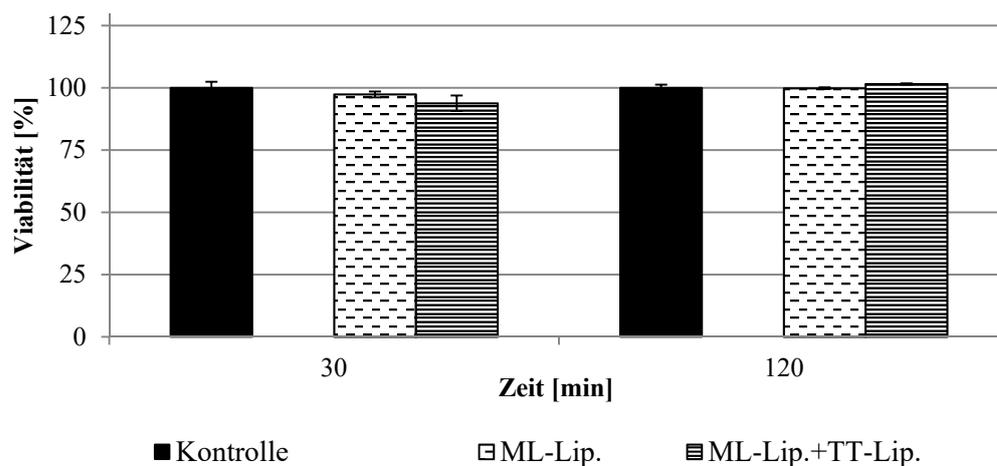


Abb. 13: Zellviabilität der THP-1-Zelllinie (2)

Die THP-1-Zellen wurden mit den ML-Liposomen (66 ng/mL) einzeln und in Kombination mit den TT-Liposomen (66 ng/mL ML + 20 µg/mL OA) für 30 und 120 Minuten inkubiert. Die Ergebnisse präsentieren die Mittelwerte der jeweiligen Gruppen (ML-Lip., ML-Lip.+TT-Lip.) und beziehen sich auf die unbehandelten Kontrollen. Die Fehlerbalken stellen die Standardabweichungen bei n = 4 bei zwei unabhängigen Versuchen dar.

3.4.2 HL-60-Zelllinie

Bei der HL-60-Zelllinie wurden keine signifikanten Unterschiede nach erfolgter Inkubation mit dem ML-Standard und den Viscum-Extrakten alleine oder in Kombination mit den TT-Extrakten ermittelt (Abb. 14). Ein Unterschied zwischen alleiniger und kombinierter Gabe der Viscum-Extrakte war nicht erkennbar.

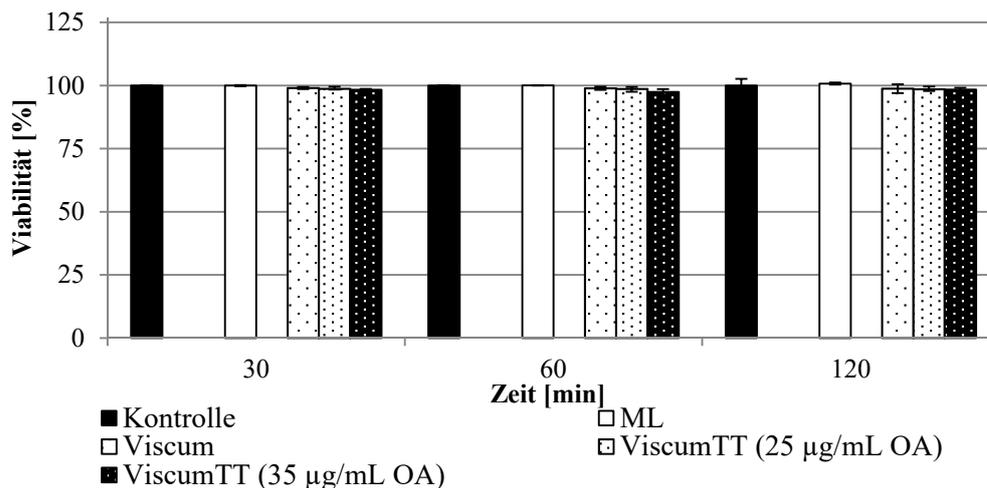


Abb. 14: Viabilität der HL-60-Zellen

Die HL-60-Zellen wurden analog mit dem ML-Standard (44 / 66 ng/mL), den Viscum-Extrakt-Chargen 155, 157, 161 (21–55 ng/mL) und den ViscumTT-Extrakt-Chargen 161-Kombinationen (41 / 55 ng/mL ML + 25 / 35 µg/mL OA) für 30, 60 und 120 Minuten inkubiert. Die Ergebnisse präsentieren die Mittelwerte der jeweiligen Gruppen (ML, Viscum, ViscumTT) und beziehen sich auf die unbehandelten Zellkontrollen. Die Fehlerbalken stellen die Standardabweichungen bei n = 4 bei zwei unabhängigen Versuchen dar.

3.4.3 TC-71-Zelllinie

Die durchflusszytometrische Betrachtung der TC-71-Zellen ergab im Gegensatz zu den anderen drei Zelllinien eine größere Viabilitätsschwankung, was nach einer Inkubationszeit von 120 Minuten bei den Kombinationen ML-Standard und Viscum-Extrakten mit den TT-Extrakten durch einen signifikanten Unterschied zur unbehandelten Probe ersichtlich war (Abb. 15). Eine tendenzielle Abnahme der Viabilität unter der kombinierten Anwendung ist ersichtlich. Zusätzlich wurde die Kombination aus ML-Standard und TT-Extrakt getestet.

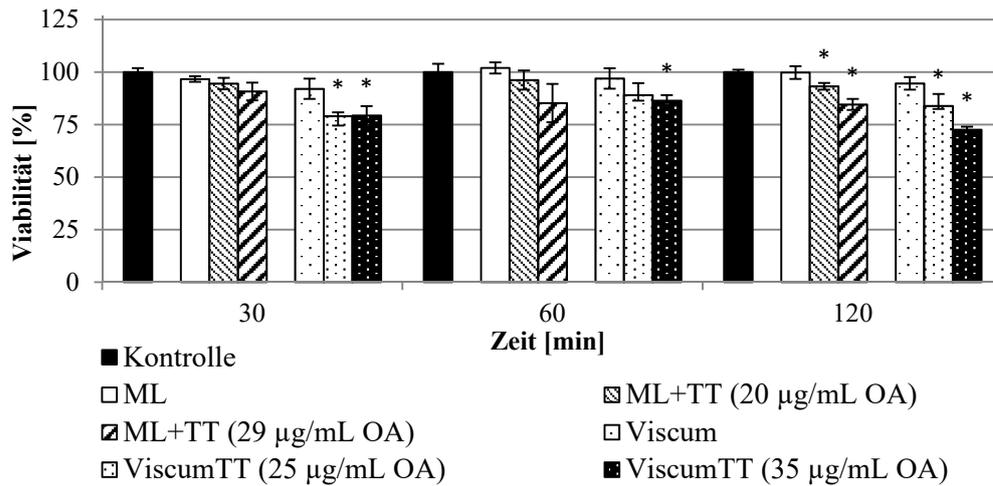


Abb. 15: Viabilität der TC-71-Zellen

Die TC-71-Zellen wurden analog mit dem ML-Standard (44 / 66 ng/mL), den ML+TT-Extrakt-Charge 155-Kombinationen (33 / 44 ng/mL ML + 20 / 29 µg/mL OA), den Viscum-Extrakt-Chargen 155, 157, 161 (21–55 ng/mL) und den ViscumTT-Extrakt-Chargen 161-Kombinationen (41 / 55 ng/mL ML + 25 / 35 µg/mL OA) für 30, 60 und 120 Minuten inkubiert. Die Ergebnisse präsentieren die Mittelwerte der jeweiligen Gruppen (ML, ML+TT, Viscum, ViscumTT) und beziehen sich auf die unbehandelten Zellkontrollen. Die Fehlerbalken stellen die Standardabweichungen bei n = 4 bei zwei unabhängigen Versuchen dar.

* signifikanter Unterschied zur unbehandelten Kontrolle, zweiseitiger t-Test, $\alpha \leq 0,05$.

3.4.4 143B-Zelllinie

Bei den 143B-Zellen erfolgte die Inkubation mit dem ML-Standard und den Viscum-Extrakten sowohl einzeln als auch in Kombination mit den jeweiligen TT-Extrakten analog zur TC-71-Zelllinie. Bei der Inkubation mit ML-Standard zeigte sich kein signifikanter Unterschied zur unbehandelten Probe. Bei der Viscum-Extrakt-Zugabe zeigte sich jedoch ein signifikanter Unterschied nach 60 und 120 Minuten (Abb. 16). Die Kombination mit den TT-Extrakten zeigte aber keinen Unterschied im Vergleich zur reinen Viscum-Extrakt-Zugabe.

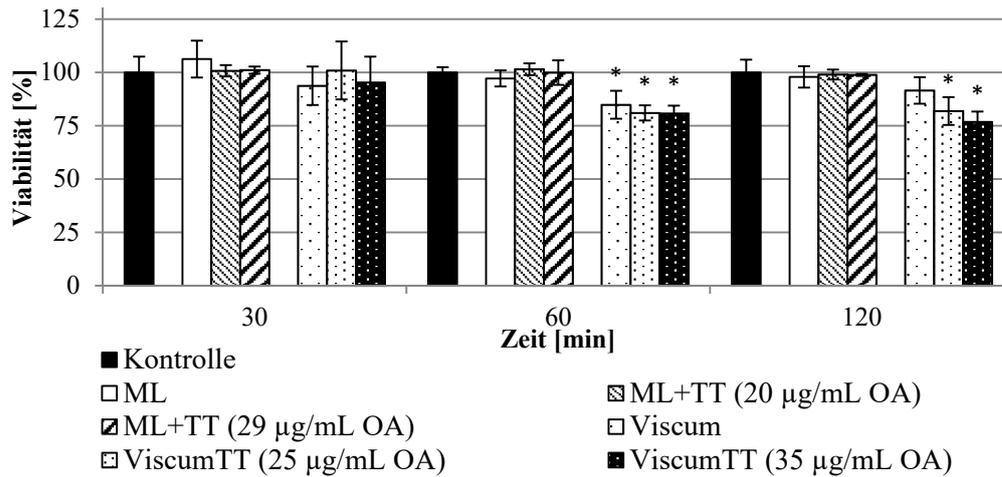


Abb. 16: Viabilität der 143B-Zellen (1)

Die 143B-Zellen wurden mit dem ML-Standard (44 / 66 ng/mL), den ML+TT-Extrakt-Charge 155-Kombinationen (33 / 44 ng/mL ML + 20 / 29 µg/mL OA), den Viscum-Extrakt-Chargen 155, 157, 161 (21–55 ng/mL) und den ViscumTT-Extrakt-Chargen 161-Kombinationen (41 / 55 ng/mL ML + 25 / 35 µg/mL OA) für 30, 60 und 120 Minuten inkubiert. Die Ergebnisse präsentieren die Mittelwerte der jeweiligen Gruppen (ML, ML+TT, Viscum, ViscumTT) und beziehen sich auf die unbehandelten Zellkontrollen. Die Fehlerbalken stellen die Standardabweichungen bei n = 4 bei zwei unabhängigen Versuchen dar.

* signifikanter Unterschied zur unbehandelten Kontrolle, zweiseitiger t-Test, $\alpha \leq 0,05$.

Die Viabilität der 143B-Zellen wurde ebenfalls nach Inkubation mit den hergestellten Liposomen getestet. Es wurden sowohl die ML-Liposomen in einer ML-Konzentration von 66 ng/mL einzeln als auch in Kombination mit den TT-Liposomen und einer OA-Konzentration von 20 µg/mL verwendet. Es konnte nach 30 und 120 Minuten kein signifikanter Unterschied zur unbehandelten Kontrolle festgestellt werden. Die Zugabe führte in diesem Beobachtungszeitraum zu keiner Viabilitätseinschränkung (Abb. 17).

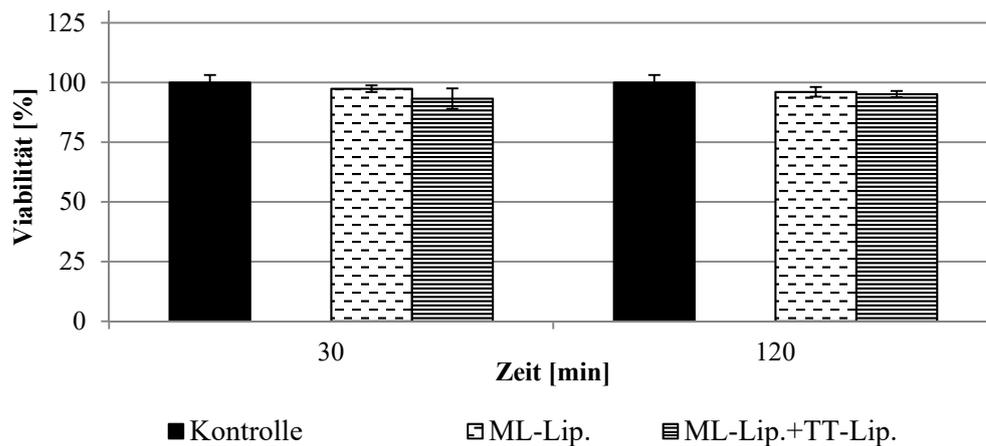


Abb. 17: Viabilität der 143B-Zellen (2)

Die 143B-Zellen wurden sowohl mit den ML-Liposomen (66 ng/mL) einzeln als auch mit der Kombination aus ML-Liposomen+TT-Liposomen (66 ng/mL ML + 20 µg/mL OA) für 30 und 120 Minuten inkubiert. Die Ergebnisse präsentieren die Mittelwerte der jeweiligen Gruppen (ML-Lip., ML-Lip.+TT-Lip.) und beziehen sich auf die unbehandelten Kontrollen. Die Fehlerbalken stellen die Standardabweichungen bei n = 4 bei zwei unabhängigen Versuchen dar.

Um den TT-Trockenextrakt in eine wässrige Lösung zu überführen, wurde mit 2-HP- β -CD gearbeitet. Der Einfluss dieser Substanz auf die ML-Aufnahme sollte ebenfalls untersucht werden, indem ein lipophiler TT-Trockenextrakt ohne 2-HP- β -CD verwendet wurde. Das Lyophilisat wurde in Methanol gelöst und in gleicher Konzentration den 143B-Zellen zugesetzt. In Abbildung 18 ist die Zellviabilität nach der Zugabe der Viscum-Extrakte, der ViscumTT-Extrakt-Kombinationen und der Kombination aus den Viscum-Extrakten mit den methanolischen TT-Lösungen dargestellt. Es zeigte sich kein signifikanter Unterschied bezüglich der Viabilität im Vergleich zur Inkubation mit ViscumTT, das mit 2-HP- β -CD solubilisiertes TT enthielt.

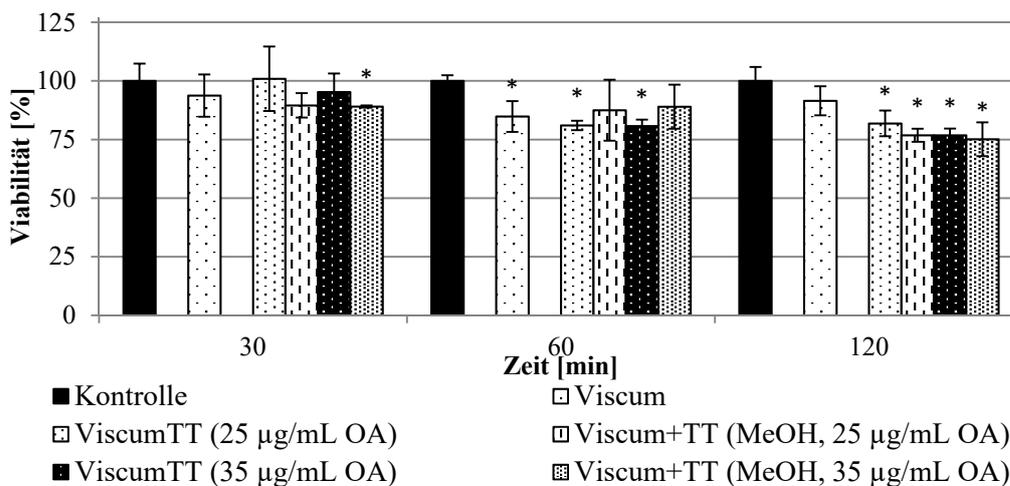


Abb. 18: Viabilität der 143B-Zellen mit dem TT-Trockenextrakt (in MeOH gelöst)

Die 143B-Zellen wurden mit den Viscum-Extrakt-Chargen 155, 157, 161 (21–55 ng/mL), den ViscumTT-Extrakt-Chargen 161-Kombinationen (41 / 55 ng/mL ML + 25 / 35 µg/mL OA) und der Viscum-Extrakt-Charge 161 mit den TT-Trockenextrakten (41 / 55 ng/mL ML + 25 / 35 µg/mL OA), in MeOH gelöst, für 30, 60 und 120 Minuten inkubiert. Die Ergebnisse präsentieren die Mittelwerte der jeweiligen Gruppen (Viscum, ViscumTT, Viscum+TT (MeOH)) und beziehen sich auf die unbehandelten Zellkontrollen. Die Fehlerbalken stellen die Standardabweichungen bei $n=4$ bei zwei unabhängigen Versuchen dar.

* signifikanter Unterschied zur unbehandelten Kontrolle, zweiseitiger t-Test, $\alpha \leq 0,05$.

3.5 Mistellektinaufnahme

3.5.1 THP-1-Zelllinie

In Abbildung 19 ist exemplarisch die Aufnahme des MLs aus der Viscum-Extrakt-Charge 161 dargestellt und zeigt eine Aufnahme nach 120 Minuten. Ein Unterschied zur Kombinationsgabe (ViscumTT) war nicht festzustellen.

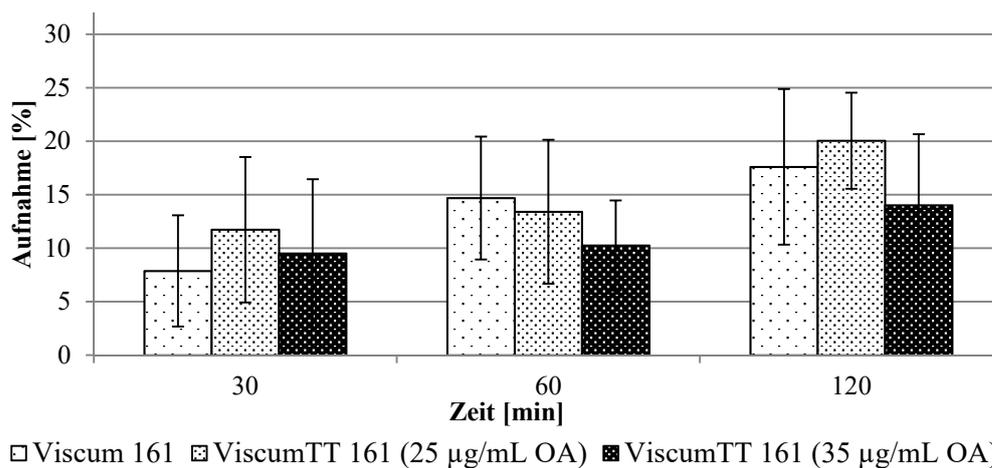


Abb. 19: ML-Aufnahme durch die THP-1-Zelllinie

Die THP-1-Zellen wurden mit der Viscum-Extrakt-Charge 161 (41 / 55 ng/mL ML) und den ViscumTT-Extrakt-Charge 161-Kombinationen (41 / 55 ng/mL ML + 25 / 35 µg/mL OA) für 30, 60 und 120 Minuten inkubiert. Die angegebenen Werte beziehen sich auf die jeweils eingesetzten ML-Konzentrationen und wurden gemittelt. Die Fehlerbalken repräsentieren die Standardabweichungen von vier Experimenten.

Ein signifikanter Unterschied bei der ML-Aufnahme aus den verschiedenen Proben (ML-Standard, Viscum-Extrakt einzeln und in Kombination mit den TT-Extrakten) war nach 120 Minuten nicht festzustellen (Tab. 33). Lediglich bei der Inkubationszeit von 60 Minuten zeigte sich ein signifikanter Unterschied hinsichtlich der Aufnahme aus dem ML-Standard und den reinen Viscum-Extrakten oder in Kombination mit den TT-Extrakten. Die Aufnahme des MLs aus dem ML-Standard zeigte nach 120 Minuten einen signifikanten Unterschied im Vergleich zur Messung nach 30 und 60 Minuten. Bei der Betrachtung der ML-Aufnahme aus der Viscum-Probe zeigte sich eine zeitabhängige Erhöhung auf schließlich $19,34 \pm 3,60$ % innerhalb der 120-minütigen Inkubationszeit.

Tab. 33: ML-Aufnahme durch die THP-1-Zellen

Zeit [min]	ML-Aufnahme [%]			
	ML	Viscum	ViscumTT (25 µg/mL OA)	ViscumTT (35 µg/mL OA)
30	$8,94 \pm 2,87$	$7,82 \pm 0,13$	$9,92 \pm 2,56$	$7,22 \pm 3,24$
60	$7,63 \pm 2,41$	$13,88 \pm 1,69$ *	$14,13 \pm 1,03$ *	$12,39 \pm 3,01$ *
120	$17,04 \pm 4,27$	$19,34 \pm 3,60$	$15,70 \pm 6,14$	$12,57 \pm 2,05$

Die THP-1-Zellen wurden mit dem ML-Standard (22–88 ng/mL), den Viscum-Extrakt-Chargen 155, 157, 161 (21–59 ng/mL) und den ViscumTT-Extrakt-Chargen 161.1 / 2-Kombinationen (41–59 ng/mL ML + 25 / 35 µg/mL OA) für 30, 60 und 120 Minuten inkubiert. Die angegebenen Werte beziehen sich auf die jeweils eingesetzten ML-Konzentrationen. Der jeweilige Mittelwert \pm Standardabweichung ist angegeben ($n \geq 3$).

* signifikanter Unterschied zum ML-Standard, U-Test nach Wilcoxon-Mann-Whitney, $\alpha \leq 0,05$.

Des Weiteren wurde die ML-Aufnahme aus der Liposomen-Formulierung durch die THP-1-Zelllinie nach 30 und 120 Minuten untersucht (Abb. 20). Nach 120 Minuten konnte eine ML-Aufnahme nachgewiesen werden, die jedoch relativ zu den nicht-liposomalen Proben gesehen mit $6,9 \pm 1,0$ % deutlich geringer war. Die Zugabe von liposomal-verpacktem TT erhöhte die ML-Aufnahme nicht.

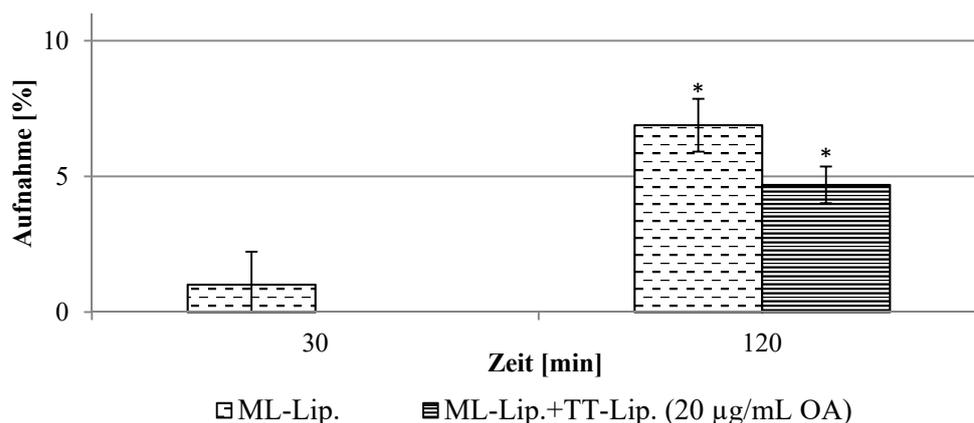


Abb. 20: ML-Aufnahme aus den ML-Liposomen durch die THP-1-Zelllinie

Die THP-1-Zellen wurden mit den ML-Liposomen (66 ng/mL ML) einzeln und in Kombination mit den TT-Liposomen (66 ng/mL ML + 20 µg/mL OA) für 30 und 120 Minuten inkubiert. Die angegebenen Werte beziehen sich auf die jeweils eingesetzten ML-Konzentrationen und wurden gemittelt. Die Fehlerbalken repräsentieren die Standardabweichungen von vier Experimenten.

* signifikanter Unterschied der jeweiligen Probe zur 30-minütigen Inkubation, U-Test nach Wilcoxon-Mann-Whitney, $\alpha \leq 0,05$.

3.5.2 HL-60-Zelllinie

Eine erhöhte ML-Aufnahme aus dem Viscum-Extrakt im Vergleich zum ML-Standard durch die HL-60-Zellen konnte festgestellt werden, eine Kombination mit den TT-Extrakten ergab zumindest bei 60 Minuten ebenfalls eine höhere Aufnahmerate (Tab. 34). Ein weiterer signifikanter Unterschied konnte jedoch nicht ermittelt werden, da die Standardabweichungen bei dem ML-Standard sehr hoch ausfielen.

Tab. 34: ML-Aufnahme durch die HL-60-Zellen

Zeit [min]	ML-Aufnahme [%]		
	ML	Viscum	ViscumTT
30	4,45 ± 4,01	10,10 ± 0,24	5,5 ± 1,0
60	8,04 ± 5,12	14,89 ± 2,84	26,2 ± 7,6 *
120	17,48 ± 6,71	32,84 ± 2,19 *	24,0 ± 5,1

Die HL-60-Zellen wurden mit dem ML-Standard (44 / 66 ng/mL), den Viscum-Extrakt-Chargen 155, 157, 161 (21–55 ng/mL) und den ViscumTT-Kombinationen (21–55 ng/mL ML + 18–35 µg/mL OA) für 30, 60 und 120 Minuten inkubiert. Die angegebenen Mittelwerte ± Standardabweichung beziehen sich auf die jeweils eingesetzten ML-Konzentrationen (n = 4).

* signifikanter Unterschied zum ML-Standard, U-Test nach Wilcoxon-Mann-Whitney, $\alpha \leq 0,05$.

In Abbildung 21 wird der Einfluss zweier unterschiedlicher TT-Extrakt-Konzentrationen auf die ML-Aufnahme aus der Viscum-Extrakt-Charge 155 dargestellt. Es wird deutlich, dass die höhere TT-Extrakt-Konzentration zu keiner erhöhten ML-Aufnahme nach 120 Minuten führte.

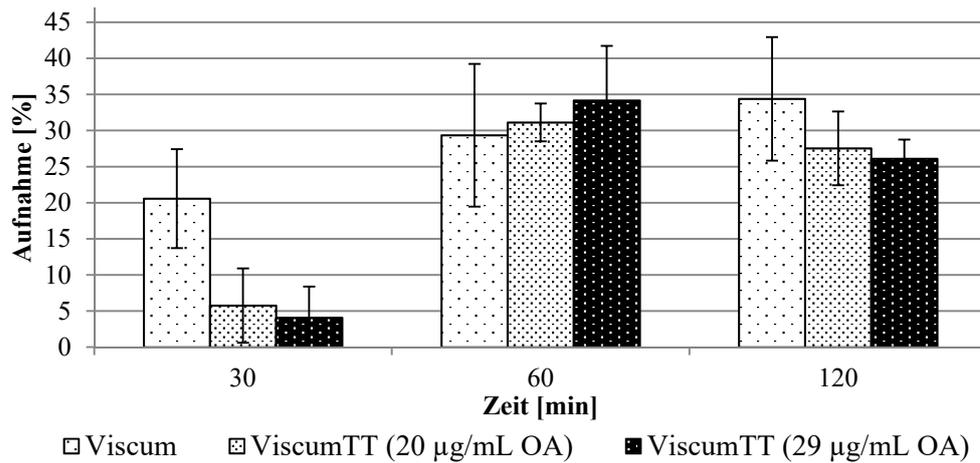


Abb. 21: ML-Aufnahme durch die HL-60-Zelllinie

Die HL-60-Zellen wurden mit der Viscum-Extrakt-Charge 155 (21 / 29 ng/mL) und den ViscumTT-Extrakt-Charge 155-Kombinationen (21 / 29 ng/mL ML + 20 / 29 µg/mL OA) für 30, 60 und 120 Minuten inkubiert. Die angegebenen Werte beziehen sich auf die jeweils eingesetzten ML-Konzentrationen und wurden gemittelt. Die Fehlerbalken stellen die Standardabweichungen dar (n = 4).

3.5.3 TC-71-Zelllinie

Bei der Untersuchung der ML-Aufnahme durch die TC-71-Zellen zeigte sich, wie bei den durchflusszytometrischen Versuchen ebenfalls beobachtet wurde, eine größere Streuung der Ergebnisse, was in den Standardabweichungen (Fehlerbalken) in Abbildung 22 deutlich wird.

Eine signifikant erhöhte ML-Aufnahme aus dem Viscum-Extrakt im Vergleich zum Standard konnte nach 120 Minuten festgestellt werden (Abb. 22).

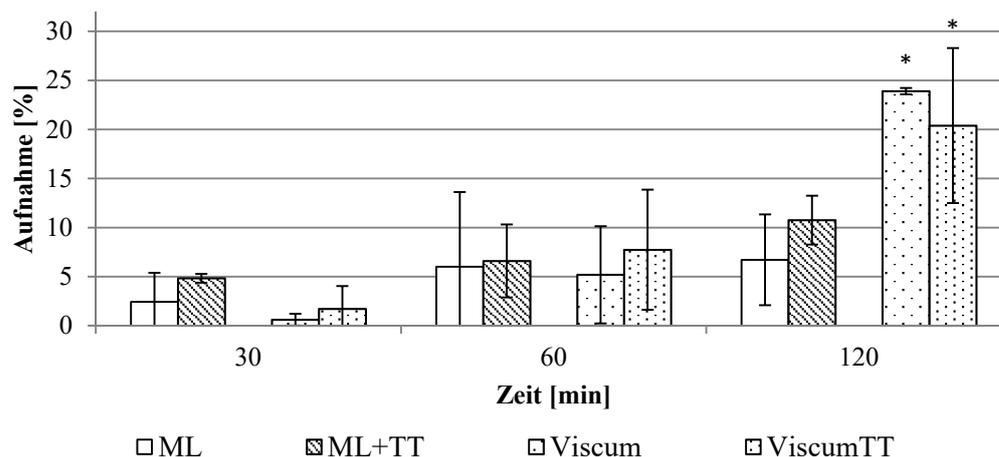


Abb. 22: ML-Aufnahme durch die TC-71-Zelllinie

Die TC-71-Zellen wurden mit dem ML-Standard (44 / 66 ng/mL), der ML+TT-Extrakt-Charge 155-Kombination (33 / 44 ng/mL ML + 20 / 29 µg/mL OA), den Viscum-Extrakt-Chargen 155, 157, 161 (21–55 ng/mL) und den ViscumTT-Kombinationen (21–55 ng/mL ML + 18–35 µg/mL OA) für 30, 60 und 120 Minuten inkubiert. Die angegebenen Werte beziehen sich auf die jeweils eingesetzten ML-Konzentrationen und wurden je Gruppe gemittelt. Die Fehlerbalken geben die Standardabweichungen an (n = 4).

* signifikanter Unterschied zum ML-Standard, U-Test nach Wilcoxon-Mann-Whitney, $\alpha \leq 0,05$.

Bei dieser Zelllinie konnte ebenfalls kein Unterschied in der ML-Aufnahme bezüglich unterschiedlicher Konzentrationen des TT-Extraktes ermittelt werden (Tab. 35 – exemplarisch für die ML-Aufnahme aus dem Viscum-Extrakt).

Tab. 35: ML-Aufnahme durch die TC-71-Zellen

Zeit [min]	ML-Aufnahme [%]	
	ViscumTT 157 (18 µg/mL OA)	ViscumTT 157 (25 µg/mL OA)
30	5,0 ± 6,5	0,1 ± 0,1
60	0 ± 0	0 ± 0
120	26,7 ± 3,1	25,7 ± 3,5

Die TC-71-Zellen wurden mit den ViscumTT-Extrakt-Charge 157-Kombinationen (32 / 42 ng/mL ML + 18 / 25 µg/mL OA) für 30, 60 und 120 Minuten inkubiert. Die angegebenen Mittelwerte ± Standardabweichung beziehen sich auf die jeweils eingesetzten ML-Konzentrationen (n = 4).

3.5.4 143B-Zelllinie

Die Untersuchung der ML-Aufnahme durch die 143B-Zellen ergab keine ML-Aufnahme aus dem Standard und auch nicht aus den Viscum-Extrakten. Eine signifikante ML-Aufnahme erfolgte erst durch Kombination mit den TT-Extrakten (ML+TT / ViscumTT – Abb. 23).

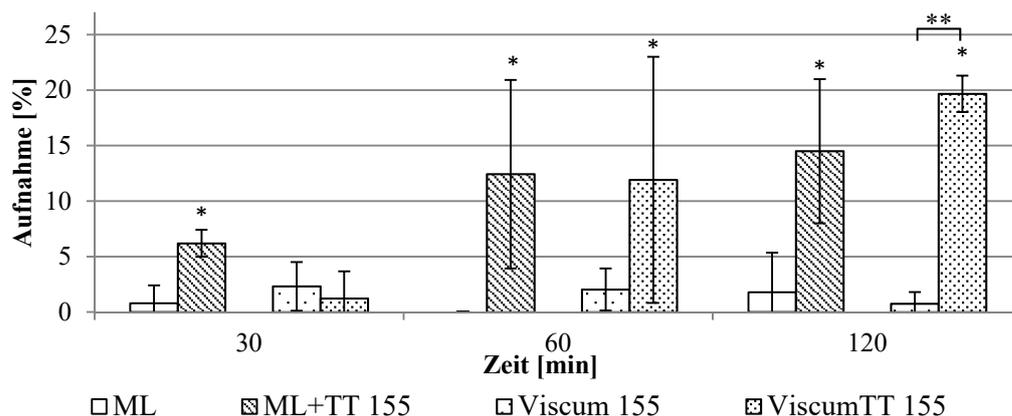


Abb. 23: ML-Aufnahme durch die 143B-Zelllinie

Die 143B-Zellen wurden mit dem ML-Standard (44 / 66 ng/mL), der ML+TT-Extrakt-Charge 155-Kombination (33 / 44 ng/mL ML + 20 µg/mL OA), der Viscum-Extrakt-Charge 155 (21 / 29 ng/mL ML + 20 µg/mL OA) und der ViscumTT-Extrakt-Charge 155-Kombination (21 / 29 ng/mL ML + 20 µg/mL OA) für 30, 60 und 120 Minuten inkubiert. Die angegebenen Werte beziehen sich auf die jeweils eingesetzten ML-Konzentrationen und wurden je Gruppe gemittelt. Die Fehlerbalken stellen die Standardabweichungen dar (n = 5).

* signifikanter Unterschied zum ML-Standard, U-Test nach Wilcoxon-Mann-Whitney, $\alpha \leq 0,05$.

** signifikanter Unterschied zwischen Viscum-Extrakt-Charge 155 und ViscumTT-Extrakt-Charge 155, U-Test nach Wilcoxon-Mann-Whitney, $\alpha \leq 0,05$.

Durch die Kombination mit TT-Extrakt konnte eine Steigerung der Aufnahme des ML-Standards von $1,8 \pm 3,6$ % auf $14,5 \pm 6,5$ % erreicht werden, bei der Viscum-Extrakt-Charge 155 konnte eine Steigerung von $0,8 \pm 1,1$ % auf $19,7 \pm 1,6$ % ermittelt werden.

Zusätzlich wurde wieder die ML-Aufnahme in Abhängigkeit von zwei verschiedenen TT-Extrakt-Konzentrationen gemessen, es zeigte sich erneut kein Unterschied (exemplarisch Viscum-Extrakt-Charge 155 – Abb. 24).

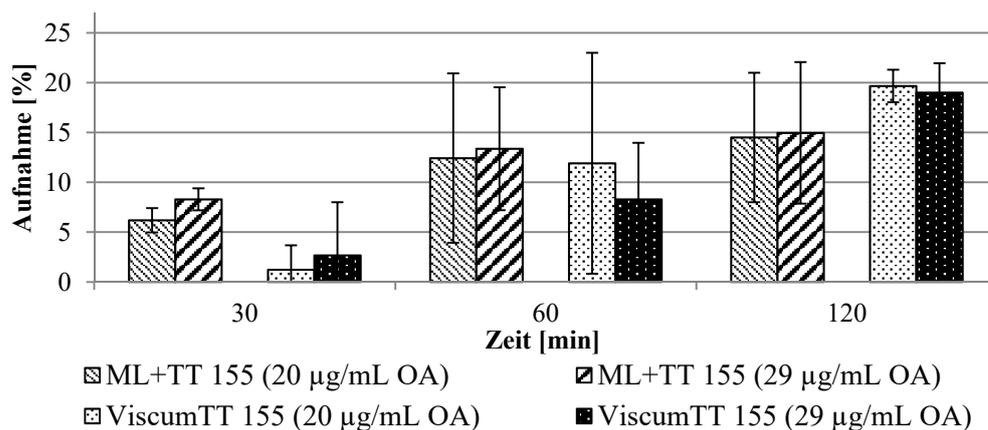


Abb. 24: Einfluss der TT-Extrakt-Konzentration auf die ML-Aufnahme durch die 143B-Zelllinie

Die 143B-Zellen wurden mit der ML+TT-Extrakt-Charge 155-Kombination (33 / 44 ng/mL ML + 20 / 29 µg/mL OA) und den ViscumTT-Extrakt-Chargen 155-Kombinationen (21 / 29 ng/mL ML + 20 / 29 µg/mL OA) für 30, 60 und 120 Minuten inkubiert. Die angegebenen Werte beziehen sich auf die jeweils eingesetzten ML-Konzentrationen und wurden je Gruppe gemittelt. Die Fehlerbalken stellen die Standardabweichungen dar (n = 5).

3.5.4.1 Einfluss von 2-Hydroxypropyl-β-Cyclodextrin auf die ML-Aufnahme

Um die TT in wässrige Lösung zu bringen, wurde der lipophile Mistelextrakt von der Firma Birken AG mit 2-HP-β-CD solubilisiert. Der Einfluss von 2-HP-β-CD auf die ML-Aufnahme wurde in einer separaten Versuchsreihe mit den 143B-Zellen untersucht (n = 3). Eine Aufnahme des MLs aus dem ML-Standard und aus dem Viscum-Extrakt wurde durch Zugabe von reinem 2-HP-β-CD nicht erreicht (Tab. 36). Eine signifikant erhöhte Aufnahme war nur in der Kombination mit dem TT-Extrakt (mit 2-HP-β-CD solubilisiert) feststellbar.

Tab. 36: Einfluss von 2-HP-β-CD auf die ML-Aufnahme durch die 143B-Zellen

Zeit [min]	ML-Aufnahme [%]					
	ML	ML+TT	ML+CD	Viscum 161	ViscumTT 161	Viscum 161+CD
30	0,8 ± 1,6	6,2 ± 1,2	4,1 ± 4,9	2,3 ± 2,8	5,0 ± 4,6	4,1 ± 4,4
60	0 ± 0	12,4 ± 8,5 *	0 ± 0	2,7 ± 3,3	1,0 ± 1,3	0 ± 0
120	1,8 ± 3,6	14,5 ± 6,5 *	3,6 ± 2,9	2,67 ± 2,1	13,1 ± 2,4 **	4,2 ± 0

Die 143B-Zellen wurden mit dem ML-Standard (44 / 66 ng/mL), der ML+TT-Extrakt-Charge 155-Kombination (33 / 44 ng/mL ML + 20 µg/mL OA), der ML+CD-Kombination (33 / 44 ng/mL ML + 240 mg/mL 2-HP-β-CD), der Viscum-Extrakt-Charge 161 (41 / 55 ng/mL), der ViscumTT-Extrakt-Charge 161-Kombination (41 / 55 ng/mL ML + 35 µg/mL OA) und der Viscum-Extrakt-Charge 161 mit 240 mg/mL 2-HP-β-CD für 30, 60 und 120 Minuten inkubiert. Die angegebenen Werte beziehen sich auf die jeweils eingesetzten ML-Konzentrationen. Der jeweilige Mittelwert pro Gruppe ± Standardabweichung ist angegeben (n ≥ 3).

* signifikanter Unterschied zum ML-Standard und zur ML+CD-Kombination, U-Test nach Wilcoxon-Mann-Whitney, $\alpha \leq 0,05$.

** signifikanter Unterschied zur Viscum-Extrakt-Charge 161 und zur Viscum 161+CD-Kombination, U-Test nach Wilcoxon-Mann-Whitney, $\alpha \leq 0,05$.

Um den Einfluss des TT-Extraktes zu bestätigen, wurde eine weitere Versuchsreihe mit dem TT-Trockenextrakt durchgeführt. Dabei wurde nicht der mit 2-HP- β -CD solubilisierter, sondern der in Methanol gelöste TT-Trockenextrakt (TT MeOH) verwendet und in den gleichen Konzentrationen den 143B-Zellen zugesetzt. Die Zugabe der methanolischen TT-Lösung ermöglichte ebenfalls eine ML-Aufnahme nach 120 Minuten im Vergleich zum ML-Standard und zur Viscum-Extrakt-Charge 161 (Abb. 25). Der zelluläre ML-Anteil war jedoch statistisch nicht signifikant höher als bei dem mit 2-HP- β -CD-solubilisierten TT-Extrakt.

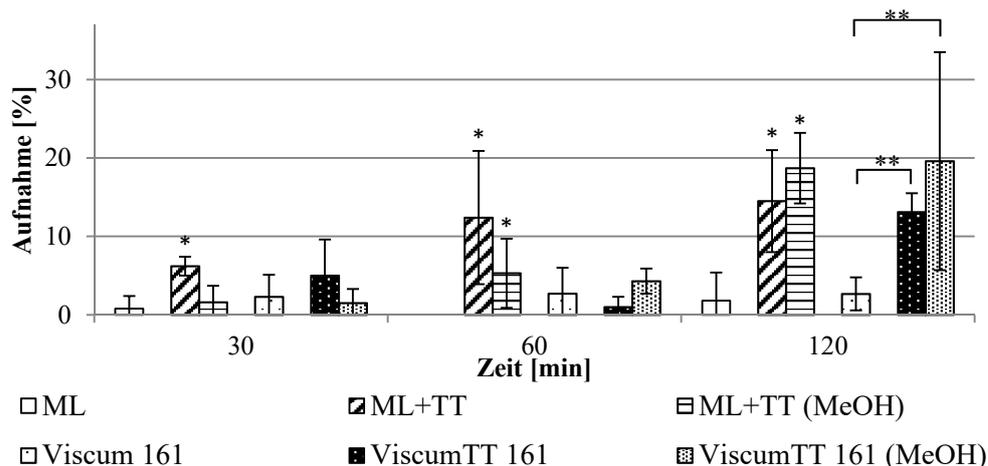


Abb. 25: Vergleich zwischen dem mit 2-HP- β -CD solubilisierter und dem in Methanol gelösten TT-Trockenextrakt
Die 143B-Zellen wurden mit dem ML-Standard (44 / 66 ng/mL), der ML+TT-Extrakt-Charge 155-Kombination (33 / 44 ng/mL ML + 20 μ g/mL OA), der ML+TT-(MeOH)-Kombination (33 / 44 ng/mL ML + 20 μ g/mL OA), der Viscum-Extrakt-Charge 161 (41 / 55 ng/mL), der ViscumTT-Extrakt-Charge 161-Kombination (41 / 55 ng/mL ML + 35 μ g/mL OA) und der ViscumTT-161-(MeOH)-Kombination (41 / 55 ng/mL ML + 35 μ g/mL OA) für 30, 60 und 120 Minuten inkubiert. Die angegebenen Werte beziehen sich auf die jeweils eingesetzten ML-Konzentrationen und wurden je Gruppe gemittelt. Die Fehlerbalken stellen die Standardabweichungen dar ($n \geq 3$).

* signifikanter Unterschied zum ML-Standard, U-Test nach Wilcoxon-Mann-Whitney, $\alpha \leq 0,05$.

** signifikanter Unterschied zur Viscum-Extrakt-Charge 161, U-Test nach Wilcoxon-Mann-Whitney, $\alpha \leq 0,05$.

3.5.4.2 Mistellektinaufnahme aus den Liposomen

Eine weitere Untersuchung der ML-Aufnahme erfolgte mit den hergestellten ML-Liposomen (Abb. 26). Eine Differenz zwischen der Einzel- und Kombinationsgabe konnte nach 120 Minuten jedoch nicht festgestellt werden. Der zelluläre ML-Anteil nach 120 Minuten war relativ betrachtet sehr gering, mit einem maximalen Wert von $6,0 \pm 0,5$ % (ML-Lip.) und $6,2 \pm 0,1$ % (ML-Lip.+TT-Lip.).

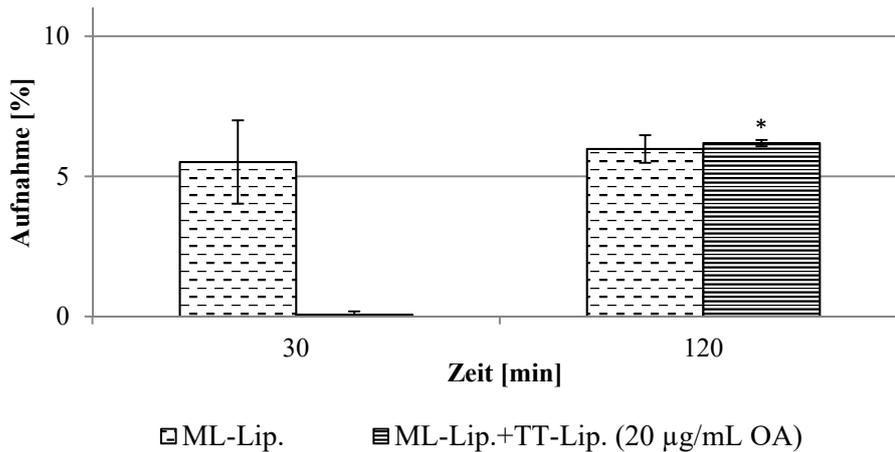


Abb. 26: ML-Aufnahme aus ML-Liposomen durch die 143B-Zelllinie

Die 143B-Zellen wurden mit den ML-Liposomen (66 ng/mL ML) einzeln und in Kombination mit den TT-Liposomen (66 ng/mL ML + 20 µg/mL OA) für 30 und 120 Minuten inkubiert. Die angegebenen Werte beziehen sich auf die jeweils eingesetzten ML-Konzentrationen und wurden gemittelt. Die Fehlerbalken repräsentieren die Standardabweichungen von vier Experimenten.

* signifikanter Unterschied zur 30-minütigen Inkubation, U-Test nach Wilcoxon-Mann-Whitney, $\alpha \leq 0,05$.

Beim direkten Vergleich zwischen der Kombination aus ML-Standard und Viscum-Extrakt-Charge 155 (20 µg/mL OA) und der Kombination aus ML- und TT-Liposomen (20 µg/mL OA) zeigte sich eine geringere Aufnahme beim Einsatz der Liposomenformulierung (Abb. 27).

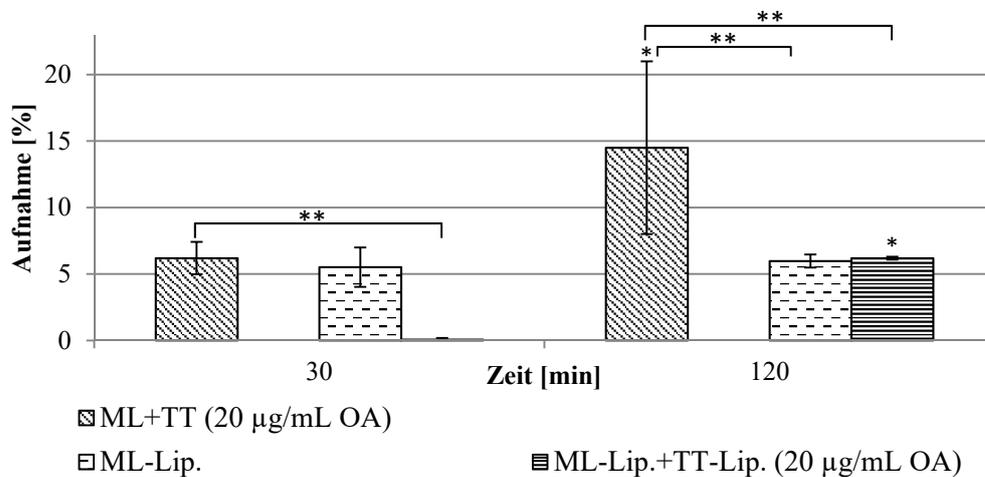


Abb. 27: ML-Aufnahme aus den Kombinationen ML-Standard mit der TT-Extrakt-Charge 155, aus den ML-Liposomen und in Kombination mit den TT-Liposomen durch die 143B-Zelllinie

Die 143B-Zellen wurden mit der ML+TT-Extrakt-Charge 155-Kombination (33 / 44 ng/mL ML + 20 µg/mL OA), mit den ML-Lip. (66 ng/mL ML) und mit der ML-Lip.+TT-Lip.-Kombination (66 ng/mL ML + 20 µg/mL OA) für 30 und 120 Minuten inkubiert. Die angegebenen Werte beziehen sich auf die jeweils eingesetzten ML-Konzentrationen und wurden gemittelt. Die Fehlerbalken repräsentieren die Standardabweichungen von vier Experimenten.

* signifikanter Unterschied zur 30-minütigen Inkubation, U-Test nach Wilcoxon-Mann-Whitney, $\alpha \leq 0,05$.

** signifikanter Unterschied zwischen ML+TT und ML-Lip. oder ML-Lip.+TT-Lip., U-Test nach Wilcoxon-Mann-Whitney, $\alpha \leq 0,05$.

3.5.5 Vergleich der verschiedenen Zelllinien

Bei der Betrachtung aller vier Zelllinien konnte somit festgestellt werden, dass im Unterschied zu den anderen drei Zelllinien die Osteosarkom-Zelllinie 143B kein ML (nach 120 Minuten lediglich $2,3 \pm 1,5 \%$) aufnehmen konnte (Abb. 28).

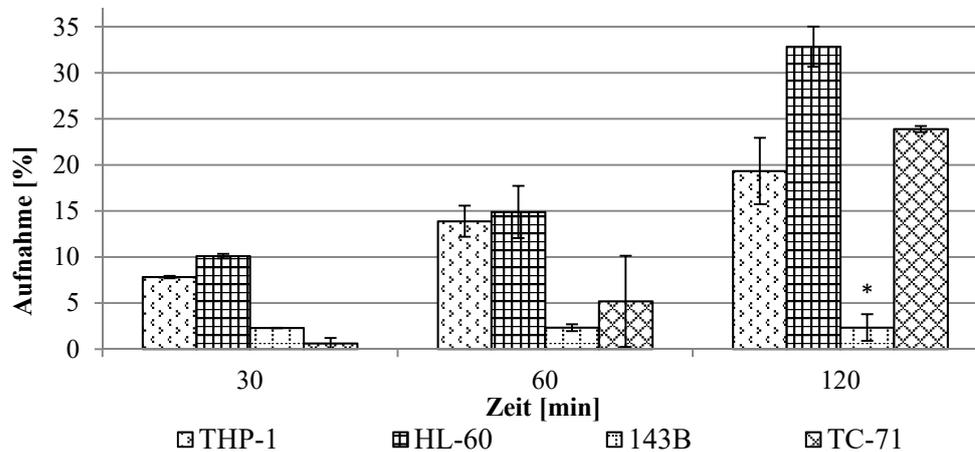


Abb. 28: ML-Aufnahme aus den Viscum-Extrakten ohne Zugabe von den TT-Extrakten

Alle vier Zelllinien wurden mit den Viscum-Extrakt-Chargen 155, 157, 161 (21–59 ng/mL) für 30, 60 und 120 Minuten inkubiert. Die angegebenen Werte beziehen sich auf die jeweils eingesetzten ML-Konzentrationen. Die Fehlerbalken stellen die Standardabweichungen dar ($n \geq 4$).

* signifikanter Unterschied zu den anderen Zelllinien, U-Test nach Wilcoxon-Mann-Whitney, $\alpha \leq 0,05$.

Erfolgte eine Kombination mit dem TT-Extrakt, konnte eine ML-Konzentration in allen vier Zelllinien nachgewiesen werden (exemplarisch Viscum- und TT-Extrakt-Charge 161 – Abb. 29). Ein signifikanter Unterschied in der ML-Aufnahme aus ViscumTT zwischen den Zelllinien konnte nicht festgestellt werden.

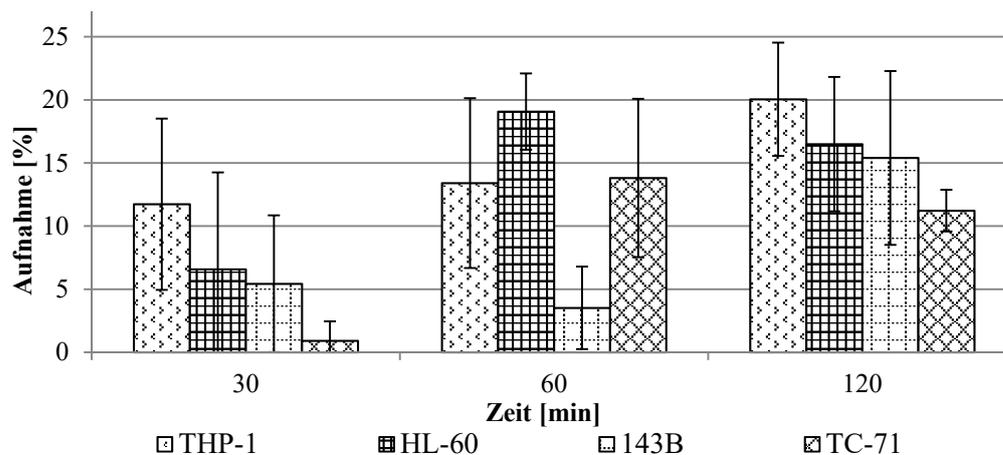


Abb. 29: ML-Aufnahme aus dem Viscum-Extrakt mit dem TT-Extrakt-Zusatz (ViscumTT)

Alle vier Zelllinien wurden mit der ViscumTT-Extrakt-Charge 161-Kombination (41 / 55 ng/mL ML + 25 μ g/mL OA) für 30, 60 und 120 Minuten inkubiert. Die angegebenen Werte beziehen sich auf die jeweils eingesetzten ML-Konzentrationen und wurden jeweils gemittelt. Die Fehlerbalken stellen die Standardabweichungen dar ($n \geq 4$).

Die ML-Aufnahme aus den ML-Liposomen fiel unabhängig von der gewählten Zelllinie geringer aus als die ML-Aufnahme aus dem ML-Standard und den Viscum-Extrakten. Die Zugabe von TT-Liposomen änderte daran nichts (Abb. 30 – A, B).

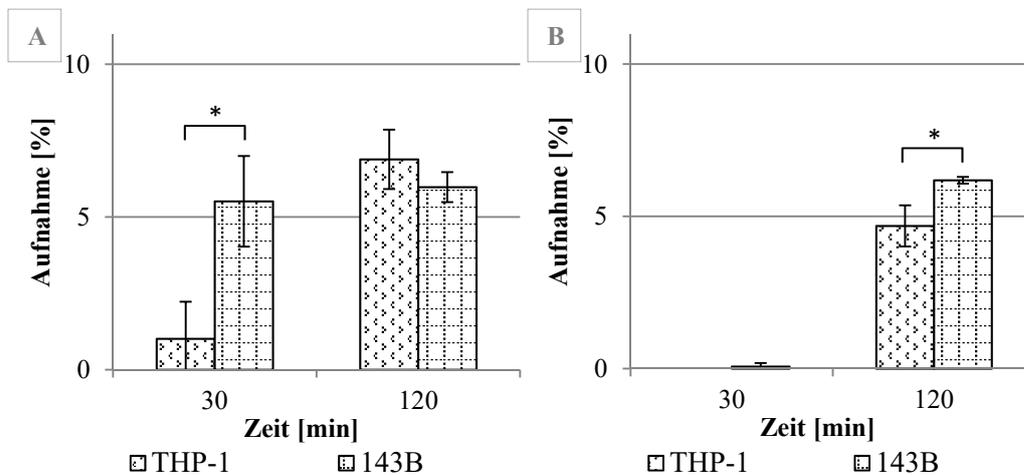


Abb. 30: ML-Aufnahme aus den ML-Liposomen

A – Die THP-1- und 143B-Zelllinie wurden mit den ML-Liposomen (66 ng/mL ML) für 30 und 120 Minuten inkubiert.

B – Die THP-1- und 143B-Zelllinie wurden mit der Kombination aus ML- und TT-Liposomen (66 ng/mL ML und 20 µg/mL OA) für 30 und 120 Minuten inkubiert.

Die angegebenen Werte beziehen sich auf die eingesetzte ML-Konzentration. Die Fehlerbalken stellen die Standardabweichungen dar (n = 4).

* signifikanter Unterschied zwischen den THP-1- und 143B-Zelllinien, U-Test nach Wilcoxon-Mann-Whitney, $\alpha \leq 0,05$.

In Abbildung 31 ist die Aufnahme aus dem ML-Standard und aus den ML-Liposomen mit einer eingesetzten ML-Konzentration von 66 ng/mL gegenübergestellt. Es konnte bei 30 und 120 Minuten ein signifikanter Unterschied zwischen den Formulierungsarten festgestellt werden. Bei der THP-1-Zelllinie zeigte sich eine geringere Aufnahme bei der Verwendung von Liposomen ($13,5 \pm 2,9$ % vs. $6,9 \pm 1,0$ %), wohingegen bei der Osteosarkom-Zelllinie 143B eine Steigerung der Aufnahme bei Verwendung von Liposomen ($0,7 \pm 1,4$ % vs. $6,0 \pm 0,5$ %) erkennbar war.

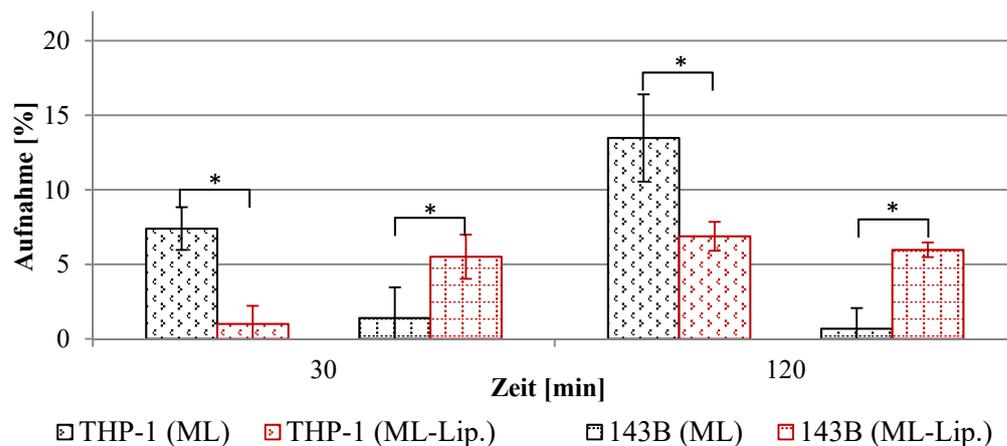


Abb. 31: ML-Aufnahme aus dem ML-Standard und den ML-Liposomen

Die THP-1- und 143B-Zelllinie wurden mit dem ML-Standard (66 ng/mL ML) und den ML-Liposomen (66 ng/mL ML) für 30 und 120 Minuten inkubiert. Die angegebenen Werte beziehen sich auf die eingesetzte ML-Konzentration. Die Fehlerbalken stellen die Standardabweichungen dar (n ≥ 4).

* signifikanter Unterschied zum ML-Standard, U-Test nach Wilcoxon-Mann-Whitney, $\alpha \leq 0,05$.

3.6 Echtzeitanalyse der 143B-Zellen

Die Auswirkungen von ML und TT-Säuren auf die 143B-Zellen wurden über einen längeren Zeitraum in Echtzeit mithilfe des iCelligence®-Gerätes untersucht. Die Osteosarkom-Zelllinie 143B wurde aufgrund seiner Adhärenz und den vorherigen Ergebnisse der gesteigerten Aufnahme des MLs durch den TT-Zusatz ausgewählt.

Um den Synergismus, d.h. die Zytotoxizität der Einzelsubstanzen und der Kombinationen beurteilen zu können, wurden sowohl die Einzelkomponenten (ML-Standard, Viscum-Extrakt-Charge 155, TT-Extrakt-Charge 155) als auch die Kombinationen (ML+TT, ViscumTT) sowie die hergestellten ML- und TT-Liposomen getestet. Als Positivkontrolle wurde jeweils Triton X-100 5 % mitgeführt. Die Zugabe der Substanzen erfolgte jeweils bei 70- bis 80%iger Konfluenz und der Versuch wurde mit einem MTT-Assay nach 100%iger Konfluenz beendet (ca. 24 Stunden nach Substanzzugabe).

3.6.1 Zugabe der Einzelkomponenten

3.6.1.1 Zugabe des Mistellektin-Standards

Die 143B-Zelllinie wurde mit dem ML-Standard über einen Zeitraum von 52 Stunden inkubiert, bis die unbehandelte Kontrolle eine 100%ige Konfluenz erreicht hatte. Der ML-Standard wurde in einer Konzentration von 2,76 bis 44 ng/mL eingesetzt. Eine Inkubation mit dem ML-Standard führte zu keiner Veränderung des Zellindex im Vergleich zur Kontrolle (Abb. 32). Erst nach 44 Stunden (18 Stunden nach der Substanzzugabe) war ein Abfall der Impedanz bei der ML-Konzentration von 44 ng/mL erkennbar. Bei den anderen Proben (2,76, 5,5, 11, 22 und 33 ng/mL) waren keine Zellindexschwankungen gegenüber der Kontrolle erkennbar.

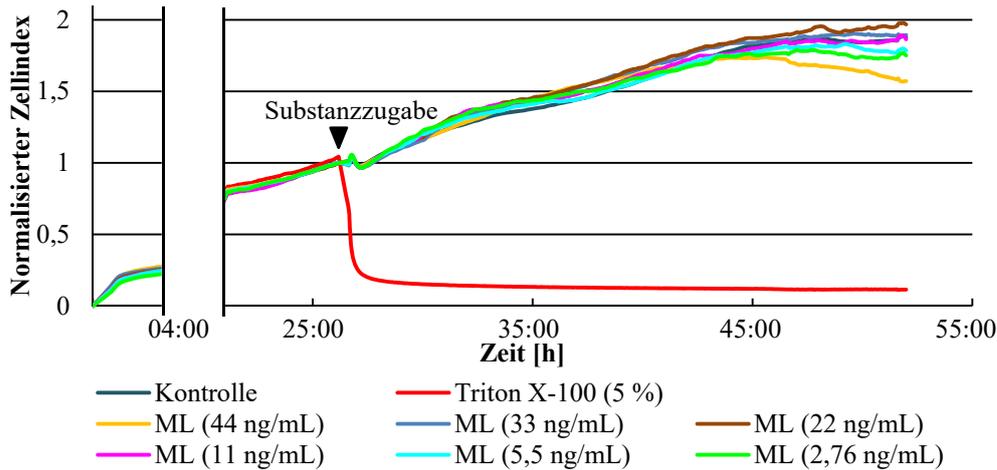


Abb. 32: Echtzeitanalyse der 143B-Zellen mit dem ML-Standard über 52 Stunden

Analyse von 15 000 Zellen pro Well mittels iCelligence®. Nach 70–80%iger Konfluenz erfolgte die Substanzzugabe in entsprechender Konzentration im Zellmedium, bei der Kontrolle wurde reines Medium ohne Zusätze ergänzt. Triton X-100 wurde als Positivkontrolle bezüglich der Zytotoxizität verwendet. Die Aufzeichnung der Zellindizes erfolgte alle drei Minuten.

Die Untersuchung mit dem MTT-Assay ergab im Durchschnitt für drei Messungen lediglich für die ML-Konzentration von 33 ng/mL einen signifikanten Unterschied bezogen auf die Kontrolle (Abb. 33). Die anderen ML-Konzentrationen zeigten keine statistisch signifikanten Veränderungen der Viabilität im Vergleich zur Kontrolle.

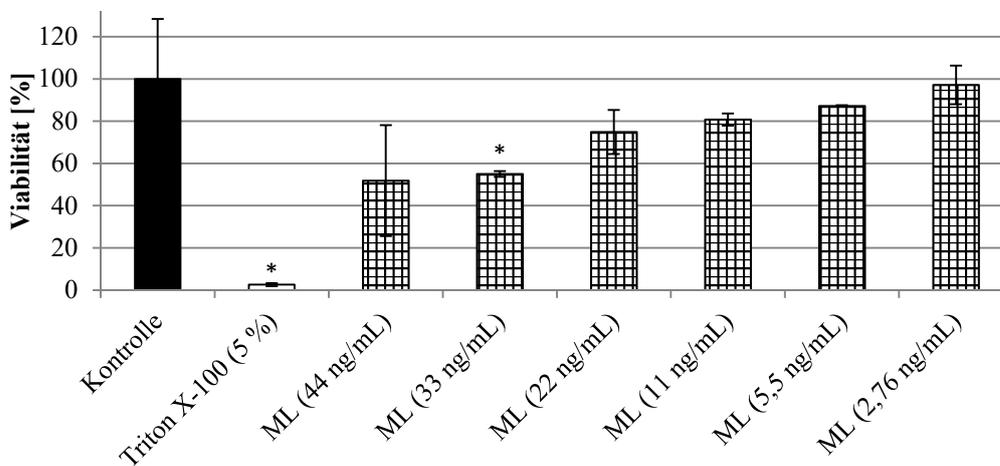


Abb. 33: Zytotoxizitätsuntersuchung nach der Inkubation mit dem ML-Standard

Analyse von 15 000 Zellen pro Well. Nach 70–80%iger Konfluenz erfolgte die Substanzzugabe in entsprechender Konzentration im Zellmedium, bei der Kontrolle wurde reines Medium ohne Zusätze verwendet. Der MTT-Assay erfolgte bei 100%iger Konfluenz der unbehandelten Kontrolle nach 52 Stunden. Angegeben sind die Mittelwerte \pm Standardabweichungen ($n = 3$).

* signifikanter Unterschied zur unbehandelten Kontrolle, U-Test nach Wilcoxon-Mann-Whitney, $\alpha \leq 0,05$.

3.6.1.2 Zugabe der Viscum-Extrakt-Charge 155

Bei der Untersuchung der Impedanzwerte der 143B-Zellen mit einer Inkubation mit der Viscum-Extrakt-Charge 155 zeigte sich bereits nach acht und zehn Stunden ein Abfall des Zellindex bei den ML-Konzentrationen von 33 und 44 ng/mL (Abb. 34). Nach 18 Stunden fiel der Index ebenfalls bei der ML-Konzentration von 22 ng/mL. Die anderen drei untersuchten Proben zeigten keine Veränderung im Vergleich zur Kontrolle.

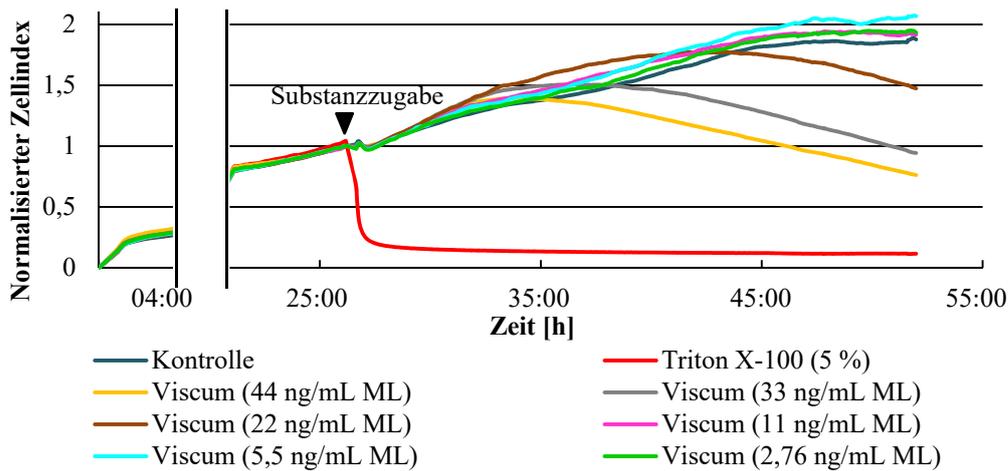


Abb. 34: Echtzeitanalyse der 143B-Zellen mit der Viscum-Extrakt-Charge 155 über 52 Stunden

Analyse von 15 000 Zellen pro Well mittels iCelligence®. Nach 70–80%iger Konfluenz erfolgte die Substanzzugabe in entsprechender Konzentration im Zellmedium, bei der Kontrolle wurde reines Medium ohne Zusätze ergänzt. Triton X-100 wurde als Positivkontrolle bezüglich der Zytotoxizität verwendet. Die Aufzeichnung der Zellindizes erfolgte alle drei Minuten.

In der folgenden Abbildung 35 ist die Besiedlung der Platten der Kontrolle (A) und der Proben nach erfolgter Inkubation mit Triton X-100 (5 %) (B) und mit der Viscum-Extrakt-Charge 155 (22 (C) und 44 ng/mL ML (D)) nach Versuchsende dargestellt.

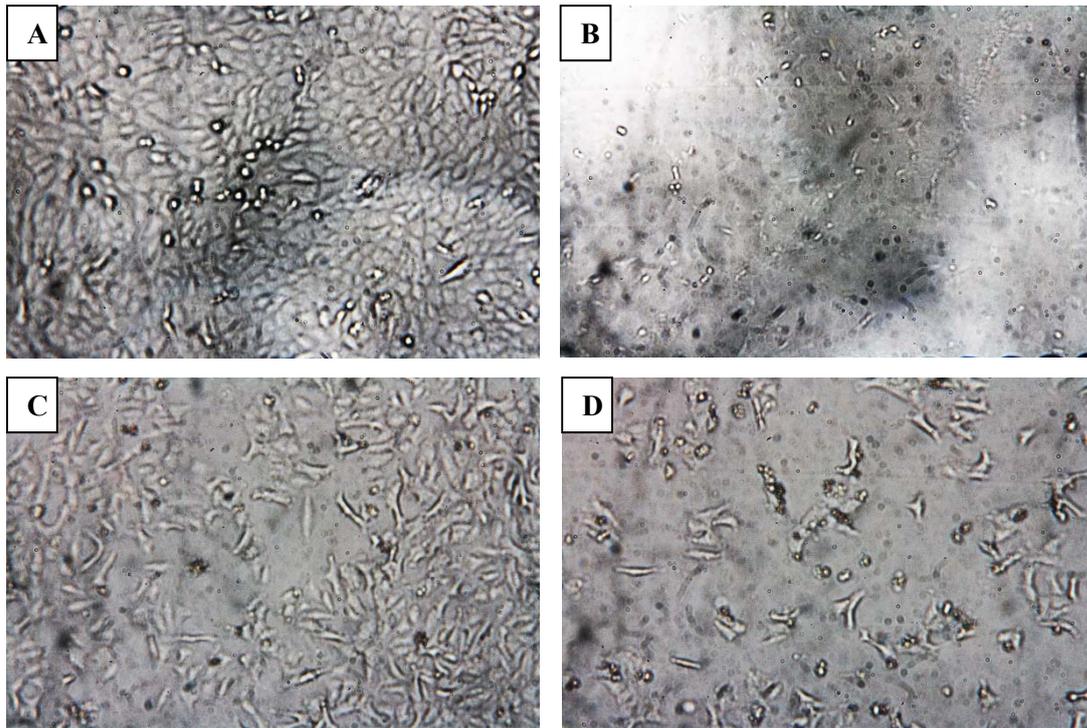


Abb. 35: Das Zellwachstum auf der iCelligence®-Platte

Mikroskopische Aufnahme des Zellwachstums der 143B-Zellen nach 50-stündiger Kultivierung der unbehandelten Probe (A) und der Proben nach erfolgter Inkubation mit Triton X-100 (5 %) (B) und mit der Viscum-Extrakt-Charge 155 (22 (C) und 44 ng/mL ML (D)).

Anschließend wurde der MTT-Assay durchgeführt und es konnte eine signifikante Toxizität bei Triton X-100 und bei den Viscum-Extrakten mit den ML-Konzentrationen von 22, 33 und 44 ng/mL festgestellt werden (Abb. 36). Bei den anderen ML-Konzentrationen war kein Unterschied zur Kontrolle erkennbar.

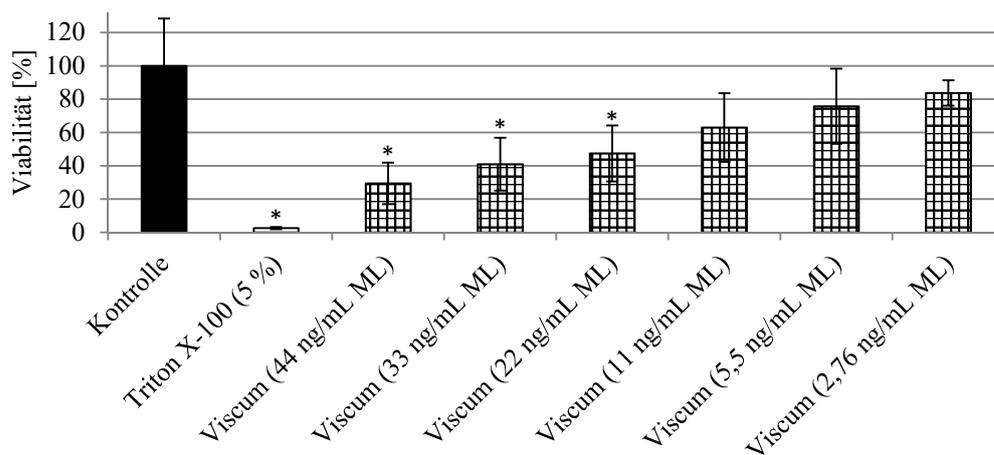


Abb. 36: Zytotoxizitätsuntersuchung nach der Inkubation mit der Viscum-Extrakt-Charge 155

Analyse von 15 000 Zellen pro Well. Nach 70–80%iger Konfluenz erfolgte die Substanzzugabe in entsprechender Konzentration im Zellmedium, bei der Kontrolle wurde reines Medium ohne Zusätze verwendet. Der MTT-Assay erfolgte bei 100%iger Konfluenz der unbehandelten Kontrolle nach 52 Stunden. Angegeben sind die Mittelwerte \pm Standardabweichungen ($n = 3$).

* signifikanter Unterschied zur unbehandelten Kontrolle, U-Test nach Wilcoxon-Mann-Whitney, $\alpha \leq 0,05$.

3.6.1.3 Vergleich zwischen dem Mistellektin-Standard und der Viscum-Extrakt-Charge

Die 143B-Zellen wurden ebenfalls mit dem ML-Standard und der Viscum-Extrakt-Charge 155 im direkten Vergleich (auf einer Platte) inkubiert und mittels der iCelligence®-Messung über einen Zeitraum von 52 Stunden analysiert. Bis zu einer Inkubationszeit von acht Stunden verhielten sich die Zellindices aller Proben gleich und es kam zum stetigen Anstieg, danach war bei der Viscum-Extrakt-Charge 155 mit 33 und 44 ng/mL ML ein Abfall erkennbar, der sich zusätzlich mikroskopisch zeigte. Es kam zum Ablösen der Zellen. Bei der gleichen ML-Konzentration von 44 ng/mL fiel der Zellindex beim ML-Standard erst nach ca. 19 Stunden. Bei den anderen ML-Standard-Konzentrationen konnte bis zum Erreichen der 100%igen Konfluenz der unbehandelten Kontrolle kein Unterschied im Zellindex festgestellt werden (Abb. 37).

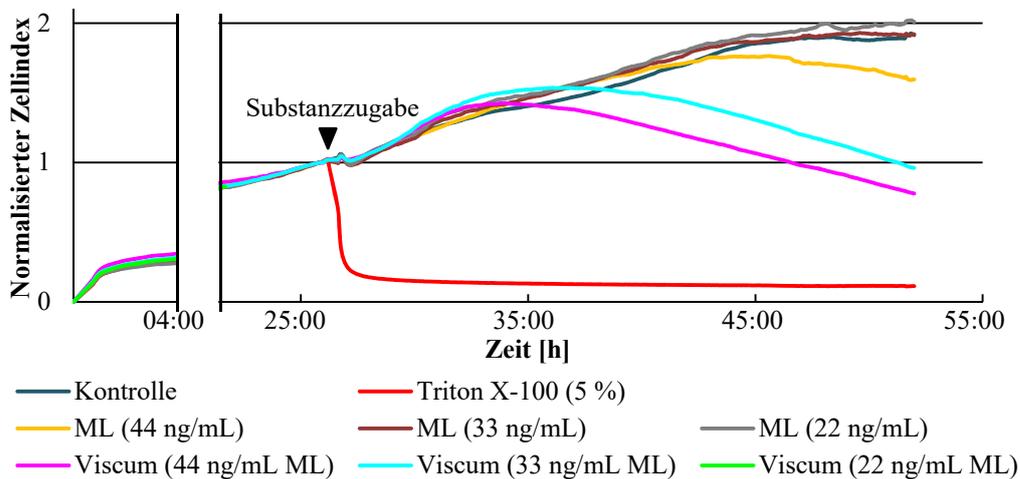


Abb. 37: Echtzeitanalyse der 143B-Zellen mit dem ML-Standard und mit der Viscum-Extrakt-Charge 155

Analyse von 15 000 Zellen pro Well mittels iCelligence®. Nach 70–80%iger Konfluenz erfolgte die Substanzzugabe in entsprechender Konzentration im Zellmedium, bei der Kontrolle wurde reines Medium ohne Zusätze ergänzt. Triton X-100 wurde als Positivkontrolle bezüglich der Zytotoxizität verwendet. Die Aufzeichnung der Zellindices erfolgte alle drei Minuten.

Mithilfe des Endpunktassays MTT konnten die Ergebnisse der Echtzeitanalyse bestätigt werden, die Viscum-Extrakt-Charge 155 wirkte zytotoxischer als der reine ML-Standard (Abb. 38). Alle verwendeten Konzentrationen zeigten einen signifikanten Unterschied zur unbehandelten Kontrolle.

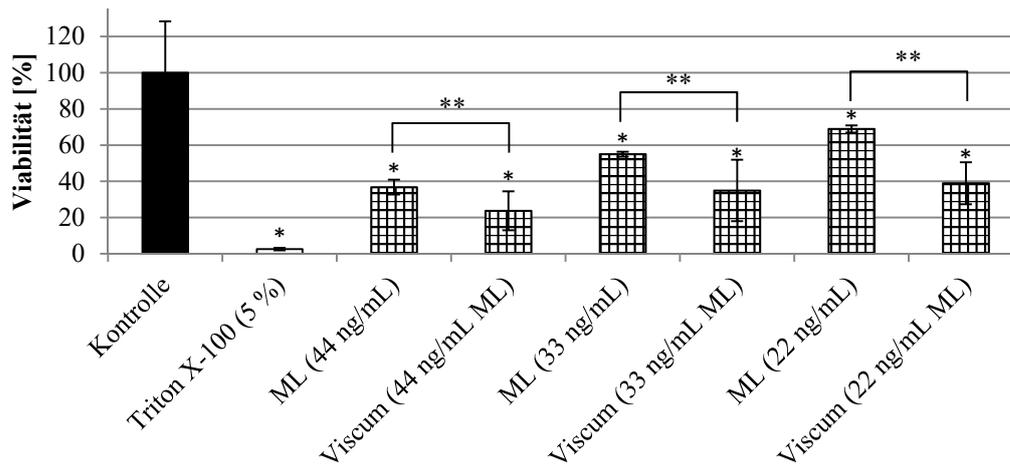


Abb. 38: Zytotoxizitätsuntersuchung nach der Inkubation mit dem ML-Standard und mit der Viscum-Extrakt-Charge 155

Analyse von 15 000 Zellen pro Well. Nach 70–80%iger Konfluenz erfolgte die Substanzzugabe in entsprechender Konzentration im Zellmedium, bei der Kontrolle wurde reines Medium ohne Zusätze verwendet. Der MTT-Assay erfolgte bei 100%iger Konfluenz der unbehandelten Kontrolle nach 52 Stunden. Angegeben sind die Mittelwerte \pm Standardabweichungen ($n = 3$).

* signifikanter Unterschied zur unbehandelten Kontrolle, U-Test nach Wilcoxon-Mann-Whitney, $\alpha \leq 0,05$.

** signifikanter Unterschied zwischen ML-Standard und Viscum-Extrakt-Charge, U-Test nach Wilcoxon-Mann-Whitney, $\alpha \leq 0,05$.

3.6.1.4 Zugabe der Triterpen-Extrakt-Charge 155

Bei der Echtzeitanalyse wurde die TT-Extrakt-Charge 155 in einem OA-Konzentrationsbereich von 14 $\mu\text{g/mL}$ bis 110 $\mu\text{g/mL}$ eingesetzt. In Abbildung 39 ist der jeweilige Verlauf des normalisierten Zellindex über 34 Stunden dargestellt. Bei der Positivkontrolle Triton X-100 zeigte sich ein steiler Abfall des Zellindex auf 0,21 drei Stunden nach der Zugabe. Die Substanz wirkte zytotoxisch, ein komplettes Ablösen der Zellen von der goldbeschichteten Plattenoberfläche fand statt. Bei den TT-Extrakten (55 und 110 $\mu\text{g/mL}$ OA) sank der Zellindex ebenfalls auf 0,47 oder 0,60. Bei den anderen OA-Konzentrationen (14, 21, 28 und 35 $\mu\text{g/mL}$) befand sich der normalisierte Zellindex im Durchschnitt bei 0,8, im Vergleich zu 1,05 bei der unbehandelten Kontrolle.

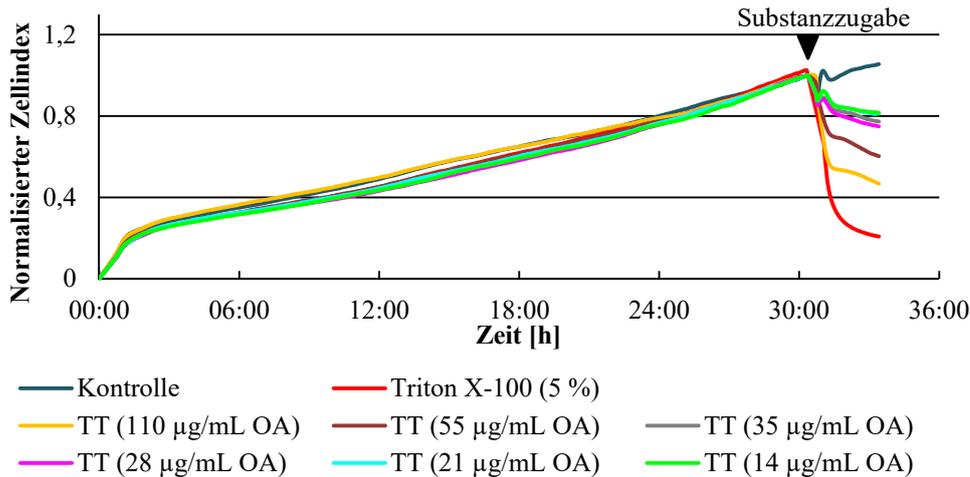


Abb. 39: Echtzeitanalyse von 143B-Zellen mit dreistündiger Inkubation mit der TT-Extrakt-Charge 155

Analyse von 15 000 Zellen pro Well mittels iCelligence®. Nach 70–80%iger Konfluenz erfolgte die Substanzzugabe in entsprechender Konzentration im Zellmedium, bei der Kontrolle wurde reines Medium ohne Zusätze ergänzt. Triton X-100 wurde als Positivkontrolle bezüglich der Zytotoxizität verwendet. Die Aufzeichnung der Zellindices erfolgte alle drei Minuten.

Erfolgte die Betrachtung dieses Versuches über einen längeren Zeitpunkt von insgesamt 80 Stunden (50 Stunden nach der Substanzzugabe), konnte bei den OA-Konzentrationen von 14 und 21 µg/mL ein Anstieg des Zellindexes auf den ungefähren Wert der unbehandelten Kontrolle festgestellt werden (Abb. 40). Der Abfall des Zellindexes in den ersten drei Stunden wurde dementsprechend über einen längeren Zeitpunkt kompensiert. Bei den höheren Konzentrationen von 55 und 110 µg/mL OA zeigte sich keine Erholung der Zellindexwerte, sie wirkten stark zytotoxisch und ein komplettes Ablösen der Zellen erfolgte. Bei den mittleren OA-Konzentrationen von 28 und 35 µg/mL zeigte sich ebenfalls ein allmähliches Anwachsen des Zellindexes, der jedoch innerhalb von 50 Stunden den Kontrollwert noch nicht erreichte.

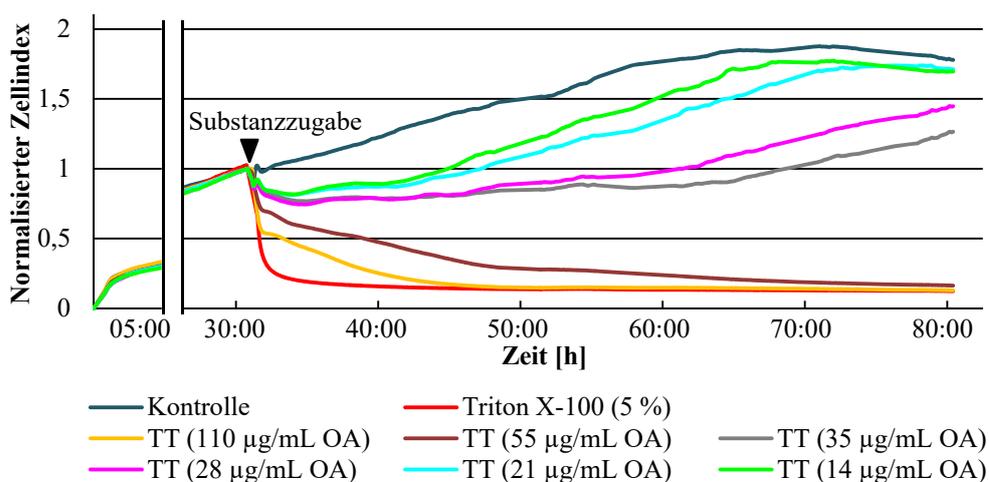


Abb. 40: Echtzeitanalyse der 143B-Zellen mit der TT-Extrakt-Charge 155 über 80 Stunden

Analyse von 15 000 Zellen pro Well mittels iCelligence®. Nach 70–80%iger Konfluenz erfolgte die Substanzzugabe in entsprechender Konzentration im Zellmedium, bei der Kontrolle wurde reines Medium ohne Zusätze ergänzt. Triton X-100 wurde als Positivkontrolle bezüglich der Zytotoxizität verwendet. Die Aufzeichnung der Zellindices erfolgte alle drei Minuten.

Nach 100%iger Konfluenz wurde der Versuch mit dem MTT-Assay abgeschlossen und es konnte festgestellt werden, dass eine OA-Konzentration von 21 $\mu\text{g/mL}$ und höher signifikant zytotoxisch wirkte (Abb. 41).

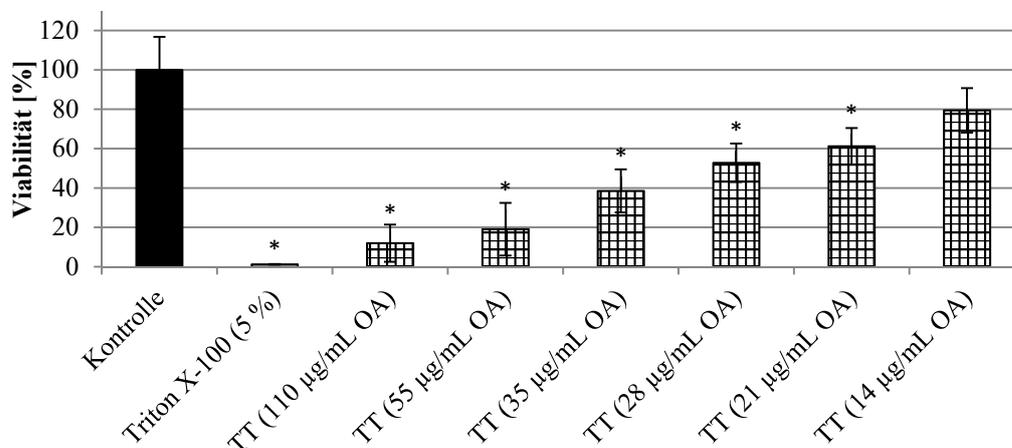


Abb. 41: Zytotoxizitätsuntersuchung nach der Inkubation mit der TT-Extrakt-Charge 155

Analyse von 15 000 Zellen pro Well. Nach 70–80%iger Konfluenz erfolgte die Substanzzugabe in entsprechender Konzentration im Zellmedium, bei der Kontrolle wurde reines Medium ohne Zusätze verwendet. Der MTT-Assay erfolgte bei 100%iger Konfluenz der unbehandelten Kontrolle nach 80 Stunden. Angegeben sind die Mittelwerte \pm Standardabweichungen ($n = 3$).

* signifikanter Unterschied zur unbehandelten Kontrolle, U-Test nach Wilcoxon-Mann-Whitney, $\alpha \leq 0,05$.

3.6.2 Zugabe der Kombinationen

3.6.2.1 Kombination Mistellektin-Standard + Triterpen-Extrakt-Charge

3.6.2.1.1 Kombination Mistellektin-Standard + Triterpen-Extrakt-Charge mit konstanter Oleanolsäure-Konzentration

Die kombinierte Inkubation erfolgte jeweils mit der gleichen OA-Konzentration von 14 $\mu\text{g/mL}$, die bei den Vorversuchen als nicht toxisch bestimmt wurde, um den alleinigen Effekt des MLs bestimmen zu können.

Bei der Inkubation mit der Kombination aus dem ML-Standard (44 ng/mL ML) und der TT-Extrakt-Charge 155 (14 $\mu\text{g/mL}$ OA) zeigten die 143B-Zellen nach ca. 18 Stunden einen Abfall des Zellindex. Die niedrigeren ML-Konzentrationen (22 und 33 ng/mL) zeigten weitere acht Stunden später ebenfalls ein Absinken der Impedanz. Im Vergleich zur Inkubation mit reinem TT-Extrakt (14 $\mu\text{g/mL}$ OA) zeigten die Kombinationen mit 2,76, 5,5 und 11 ng/mL ML keinen Unterschied. Alle behandelten Zellen zeigten jedoch einen geringfügig erniedrigten Zellindex im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle (Abb. 42).

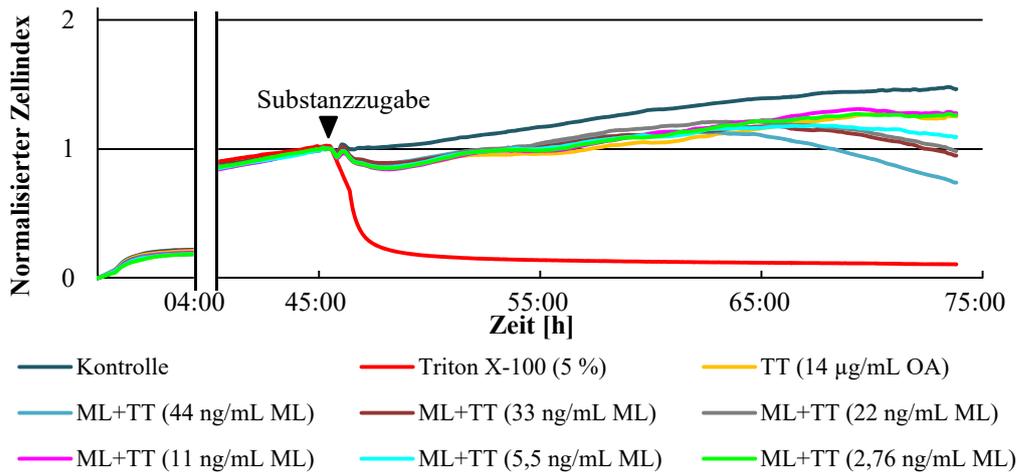


Abb. 42: Echtzeitanalyse der 143B-Zellen mit erfolgter Inkubation mit der Kombination ML+TT

Analyse von 15 000 Zellen pro Well mittels iCelligence®. Nach 70–80%iger Konfluenz erfolgte die Substanzzugabe in entsprechender Konzentration im Zellmedium. Bei allen Kombinationen ML+TT wurde die TT-Extrakt-Charge 155 mit einer OA-Endkonzentration von 14 µg/mL verwendet. Bei der Kontrolle wurde reines Medium ohne Zusätze ergänzt. Triton X-100 wurde als Positivkontrolle mitgeführt. Die Aufzeichnung der Zellindizes erfolgte alle drei Minuten.

Bei der Endpunktanalyse konnte nach dreimaliger Versuchsdurchführung ausschließlich die Kombination ML+TT aus 44 ng/mL ML und 14 µg/mL OA als von der Kontrolle signifikant verschieden identifiziert werden (Abb. 43). Die ermittelten Viabilitätswerte waren zwar im Vergleich zu vorangegangenen Messungen niedriger, besaßen allerdings tendenziell höhere Standardabweichungen.

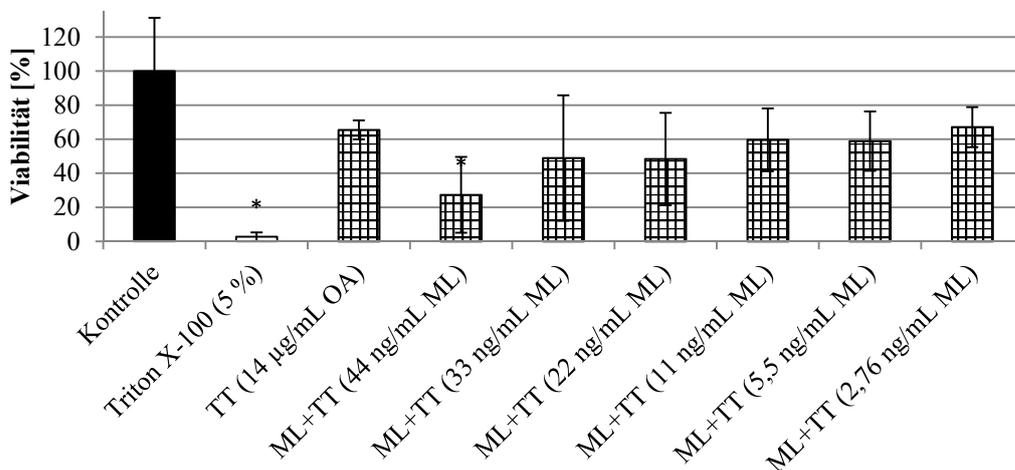


Abb. 43: Zytotoxizitätsuntersuchung nach der Inkubation mit der Kombination ML+TT

Analyse von 15 000 Zellen pro Well. Nach 70–80%iger Konfluenz erfolgte die Substanzzugabe in entsprechender Konzentration im Zellmedium. Bei allen Kombinationen ML+TT wurde die TT-Extrakt-Charge 155 mit einer OA-Endkonzentration von 14 µg/mL verwendet. Bei der Kontrolle wurde reines Medium ohne Zusätze verwendet. Der MTT-Assay erfolgte bei 100%iger Konfluenz der unbehandelten Kontrolle nach 74 Stunden. Angegeben sind die Mittelwerte \pm Standardabweichungen ($n = 3$).

* signifikanter Unterschied zur unbehandelten Kontrolle, U-Test nach Wilcoxon-Mann-Whitney, $\alpha \leq 0,05$.

In folgender Abbildung 44 wird der direkte Vergleich zwischen Einzel- und Kombinationsgabe parallel auf zwei Platten (ein Versuchsansatz) dargestellt. Bei der Applikation der Kombination aus

ML-Standard und TT-Extrakt-Charge 155 (ML+TT) wurden geringere Zellindizes festgestellt, während sich die Zellindizes der Einzelinkubationen mit dem ML-Standard kaum von der unbehandelten Probe unterschieden haben.

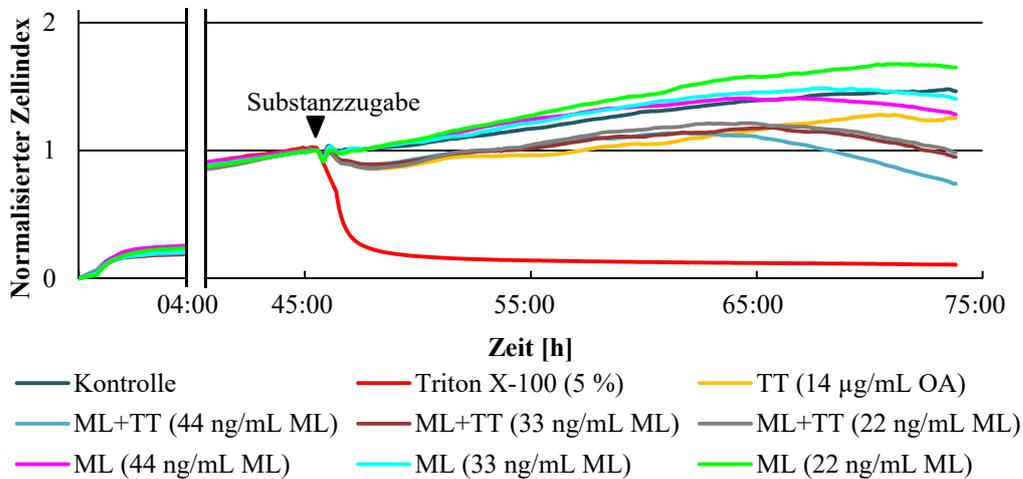


Abb. 44: Echtzeitanalyse der 143B-Zellen mit erfolgter Inkubation aus ML und ML+TT

Analyse von 15 000 Zellen pro Well mittels iCelligence®. Nach 70–80%iger Konfluenz erfolgte die Substanzzugabe in entsprechender Konzentration im Zellmedium. Bei den Kombinationen ML+TT wurde die TT-Extrakt-Charge 155 mit einer OA-Endkonzentration von 14 µg/mL verwendet. Bei der Kontrolle wurde reines Medium ohne Zusätze ergänzt. Triton X-100 wurde als Positivkontrolle mitgeführt. Die Aufzeichnung der Zellindizes erfolgte alle drei Minuten.

Bei der Endpunktbetrachtung konnte keine Differenzierung beider Gruppen (ML gegenüber ML+TT) festgestellt werden (Abb. 45).

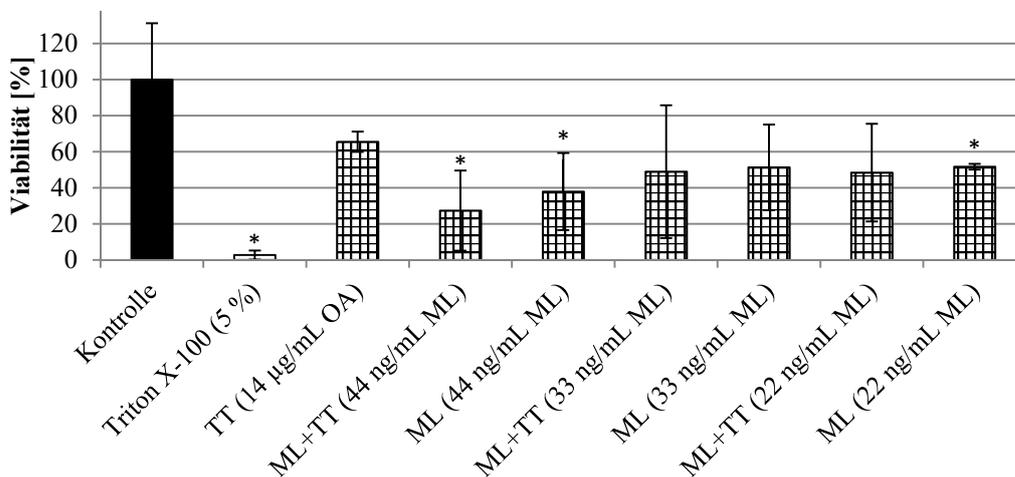


Abb. 45: Zytotoxizitätsuntersuchung nach der Inkubation mit ML und ML+TT

Analyse von 15 000 Zellen pro Well. Nach 70–80%iger Konfluenz erfolgte die Substanzzugabe in entsprechender Konzentration im Zellmedium. Bei den Kombinationen ML+TT wurde die TT-Extrakt-Charge 155 mit einer OA-Endkonzentration von 14 µg/mL verwendet. Bei der Kontrolle wurde reines Medium ohne Zusätze ergänzt. Triton X-100 wurde als Positivkontrolle mitgeführt. Der MTT-Assay erfolgte bei 100%iger Konfluenz der unbehandelten Kontrolle nach 74 Stunden. Angegeben sind die Mittelwerte \pm Standardabweichungen ($n = 3$).

* signifikanter Unterschied zur unbehandelten Kontrolle, U-Test nach Wilcoxon-Mann-Whitney, $\alpha \leq 0,05$.

3.6.2.1.2 Kombination Mistellektin-Standard + Triterpen-Extrakt-Charge mit konstanter Mistellektin-Konzentration

Die Inkubation mit der Kombination ML+TT erfolgte jeweils mit der gleichen ML-Konzentration von 11 ng/mL. Diese Konzentration wurde bei den Vorversuchen als nicht toxisch bestimmt (Abb. 32, Abb. 33) und dient zur besseren Beobachtung des alleinigen Effektes des TT-Extraktes.

Die Gabe einer OA-Konzentration von 14 bis 28 $\mu\text{g/mL}$ zeigte eine geringfügige Verringerung des Zellindexes im Vergleich zur Kontrolle. Die OA-Konzentration von 55 und 110 $\mu\text{g/mL}$ führte zu einem kompletten Ablösen der Zellen, zum Abfall der Impedanz und dementsprechend auch zum Abfall des normalisierten Zellindexes. Bei der OA-Konzentration von 35 $\mu\text{g/mL}$ zeigte sich kein sofortiger Rückgang des Indexes, jedoch wurde der Anfangswert bei der Substanzzugabe nicht mehr erreicht, es kam zu einem Stagnieren der Impedanz (Abb. 46).

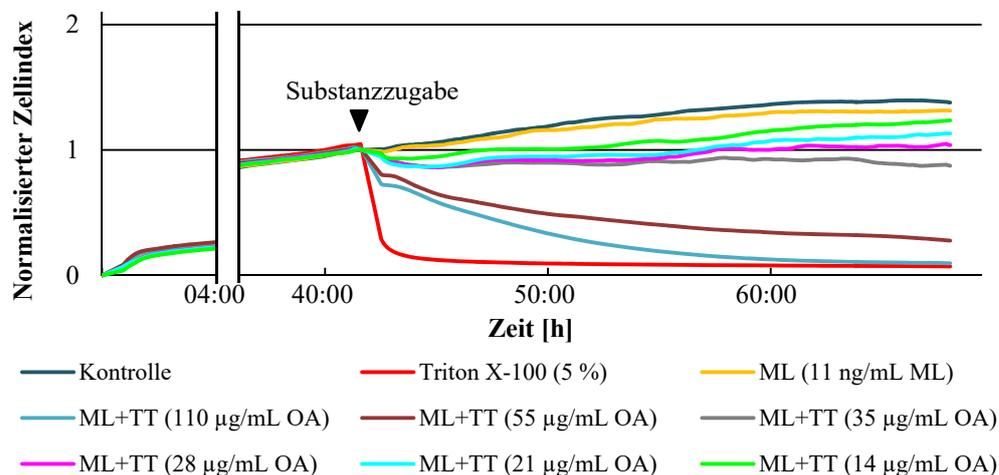


Abb. 46: Echtzeitanalyse der 143B-Zellen mit erfolgter Inkubation mit der Kombination ML (11 ng/mL ML) + TT Analyse von 15 000 Zellen pro Well mittels iCelligence®. Nach 70–80%iger Konfluenz erfolgte die Substanzzugabe in entsprechender Konzentration im Zellmedium. Bei allen Kombinationen ML+TT wurde der ML-Standard in einer Endkonzentration von 11 ng/mL und die TT-Extrakt-Charge 155 verwendet. Bei der Kontrolle wurde reines Medium ohne Zusätze ergänzt. Triton X-100 wurde als Positivkontrolle mitgeführt. Die Aufzeichnung der Zellindizes erfolgte alle drei Minuten.

Bei der Endpunktanalyse konnten alle Kombinationen als zytotoxisch nachgewiesen werden (Abb. 47). Lediglich die Mitführung des zweiten Bestandteiles der Kombination (ML 11 ng/mL) zeigte keinen signifikanten Unterschied zur Kontrolle, wie oben erwähnt.

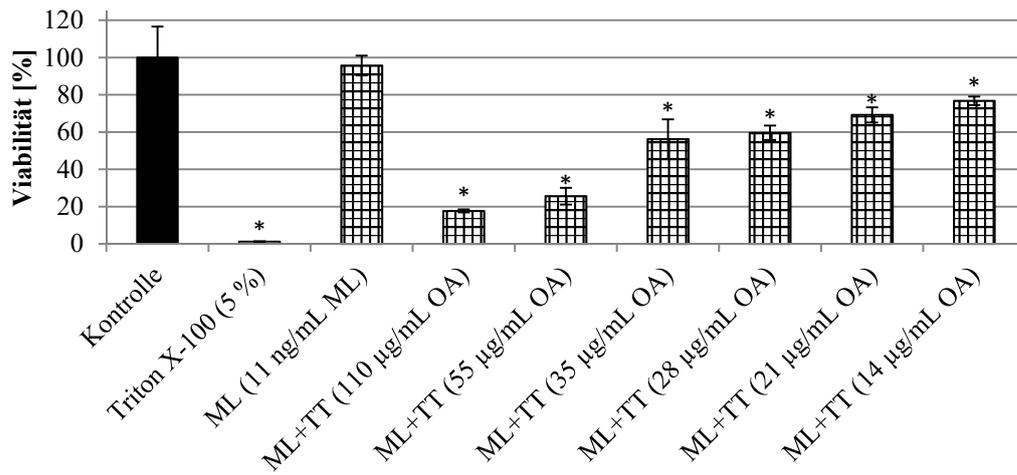


Abb. 47: Zytotoxizitätsuntersuchung nach der Inkubation mit ML+TT (konstante ML-Konzentration)

Analyse von 15 000 Zellen pro Well. Nach 70–80%iger Konfluenz erfolgte die Substanzzugabe in entsprechender Konzentration im Zellmedium. Bei den Kombinationen ML+TT wurde der ML-Standard mit einer ML-Endkonzentration von 11 ng/mL und die TT-Extrakt-Charge 155 verwendet. Bei der Kontrolle wurde reines Medium ohne Zusätze ergänzt. Triton X-100 wurde als Positivkontrolle mitgeführt. Der MTT-Assay erfolgte bei 100%iger Konfluenz der unbehandelten Kontrolle nach 68 Stunden. Angegeben sind die Mittelwerte \pm Standardabweichungen ($n = 3$).

* signifikanter Unterschied zur unbehandelten Kontrolle, U-Test nach Wilcoxon-Mann-Whitney, $\alpha \leq 0,05$.

Beim direkten Vergleich der Kombination und der Einzelgabe von TT sind keine signifikanten Unterschiede erkennbar, sowohl in der Echtzeitanalyse (Abb. 48) als auch im MTT-Assay.

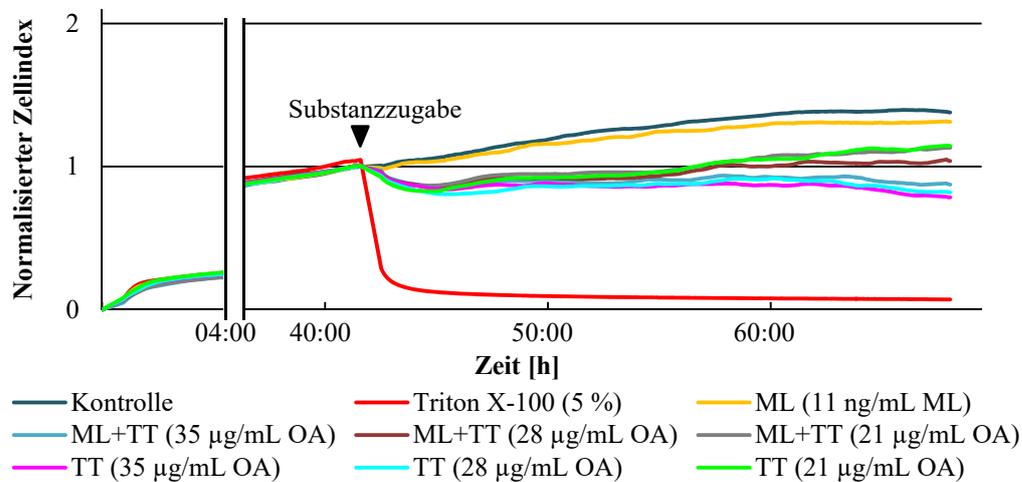


Abb. 48: Echtzeitanalyse der 143B-Zellen mit erfolgter Inkubation mit ML, TT oder ML+TT (bei konstanter ML-Konzentration von 11 ng/mL)

Analyse von 15 000 Zellen pro Well mittels iCelligence®. Nach 70–80%iger Konfluenz erfolgte die Substanzzugabe in entsprechender Konzentration im Zellmedium. Bei den Kombinationen ML+TT wurde der ML-Standard mit einer ML-Endkonzentration von 11 ng/mL und die TT-Extrakt-Charge 155 verwendet. Bei der Kontrolle wurde reines Medium ohne Zusätze ergänzt. Triton X-100 wurde als Positivkontrolle mitgeführt. Die Aufzeichnung der Zellindizes erfolgte alle drei Minuten.

3.6.2.2 Kombination Viscum- und Triterpen-Extrakt-Charge

Bei der Kombination ViscumTT wurde die Viscum-Extrakt-Charge 155 in den ML-Konzentrationen 2,76, 5,5, 11, 22, 33 und 44 ng/mL mit jeweils 14 µg/mL OA der TT-Extrakt-Charge 155 verwendet. Bei der Echtzeitanalyse konnte ein Abfall des Zellindex bei den vier höheren ML-Konzentrationen nach 9, 13, 14 und 18,5 Stunden nach der Substanzzugabe beobachtet werden (Abb. 49). Die Kombination mit 2,76 und 5,5 ng/mL ML zeigte keine Unterschiede gegenüber der Kontrolle und der Einzelinkubation mit der TT-Extrakt-Charge 155 (14 µg/mL OA).

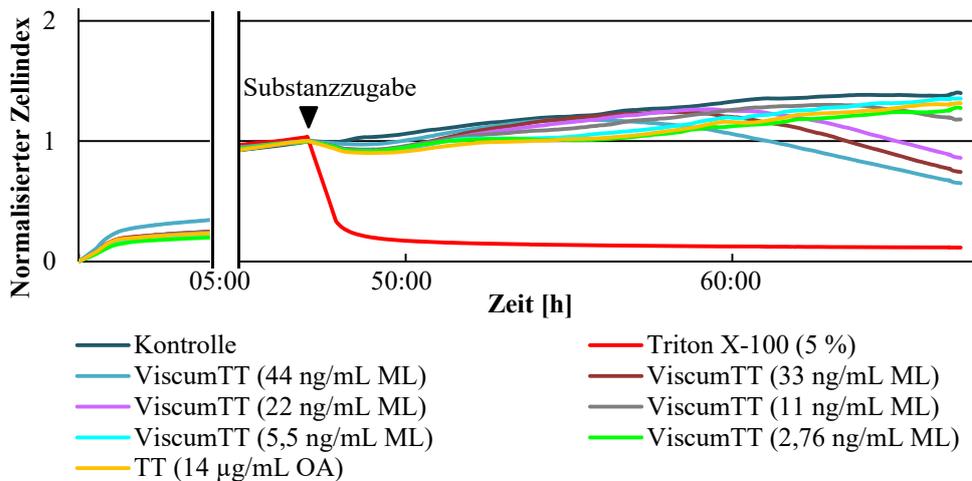


Abb. 49: Echtzeitanalyse der 143B-Zellen mit erfolgter Inkubation mit der Kombination ViscumTT

Analyse von 15 000 Zellen pro Well mittels iCelligence®. Nach 70–80%iger Konfluenz erfolgte die Substanzzugabe in entsprechender Konzentration im Zellmedium. Bei allen Kombinationen ViscumTT wurde die TT-Extrakt-Charge 155 mit einer OA-Endkonzentration von 14 µg/mL und die Viscum-Extrakt-Charge 155 verwendet. Bei der Kontrolle wurde reines Medium ohne Zusätze ergänzt. Triton X-100 wurde als Positivkontrolle mitgeführt. Die Aufzeichnung der Zellindices erfolgte alle drei Minuten.

Bei der Endpunktbetrachtung nach insgesamt 67 Stunden wurde das gleiche Ergebnis ermittelt (Abb. 50).

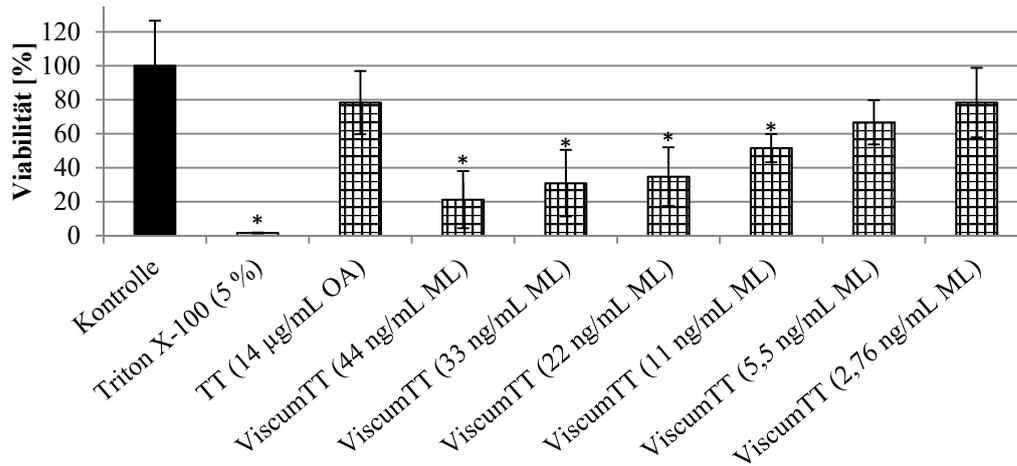


Abb. 50: Zytotoxizitätsuntersuchung nach der Inkubation mit ViscumTT

Analyse von 15 000 Zellen pro Well. Nach 70–80%iger Konfluenz erfolgte die Substanzzugabe in entsprechender Konzentration im Zellmedium. Bei den Kombinationen ViscumTT wurde die TT-Extrakt-Charge 155 mit einer OA-Endkonzentration von 14 µg/mL und die Viscum-Extrakt-Charge 155 verwendet. Bei der Kontrolle wurde reines Medium ohne Zusätze ergänzt. Triton X-100 wurde als Positivkontrolle mitgeführt. Der MTT-Assay erfolgte bei 100%iger Konfluenz der unbehandelten Kontrolle nach 67 Stunden. Angegeben sind die Mittelwerte ± Standardabweichungen (n = 3).

* signifikanter Unterschied zur unbehandelten Kontrolle, U-Test nach Wilcoxon-Mann-Whitney, $\alpha \leq 0,05$.

Im parallelen Vergleich der Einzel- und kombinierten Gabe auf zwei Platten (ein Versuchsansatz) zeigte die Kombination ViscumTT geringere Impedanzwerte als die Monogabe des Viscum-Extraktes, diese Unterschiede waren jedoch erst nach einer Inkubation von mindestens neun Stunden erkennbar (Abb. 51).

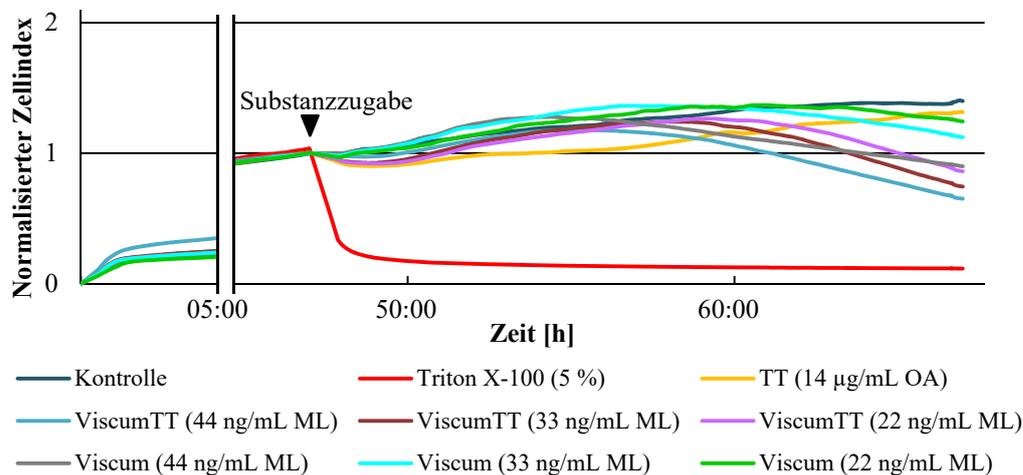


Abb. 51: Echtzeitanalyse der 143B-Zellen mit erfolgter Inkubation mit Viscum und ViscumTT

Analyse von 15 000 Zellen pro Well mittels iCelligence®. Nach 70–80%iger Konfluenz erfolgte die Substanzzugabe in entsprechender Konzentration im Zellmedium. Die Viscum-Extrakt-Charge 155 und die TT-Extrakt-Charge 155 mit einer OA-Endkonzentration von 14 µg/mL in der Kombination ViscumTT wurden verwendet. Bei der Kontrolle wurde reines Medium ohne Zusätze ergänzt. Triton X-100 wurde als Positivkontrolle mitgeführt. Die Aufzeichnung der Zellindizes erfolgte alle drei Minuten.

Mithilfe des MTT-Assays konnte nach insgesamt 67 Stunden keine Unterscheidung hinsichtlich der Viabilität zwischen der alleinigen und kombinierten Gabe getroffen werden (Abb. 52). Es konnte für

jede Viscum- und ViscumTT-Probe eine signifikante Viabilitätsminderung im Vergleich zur unbehandelten Probe festgestellt werden.

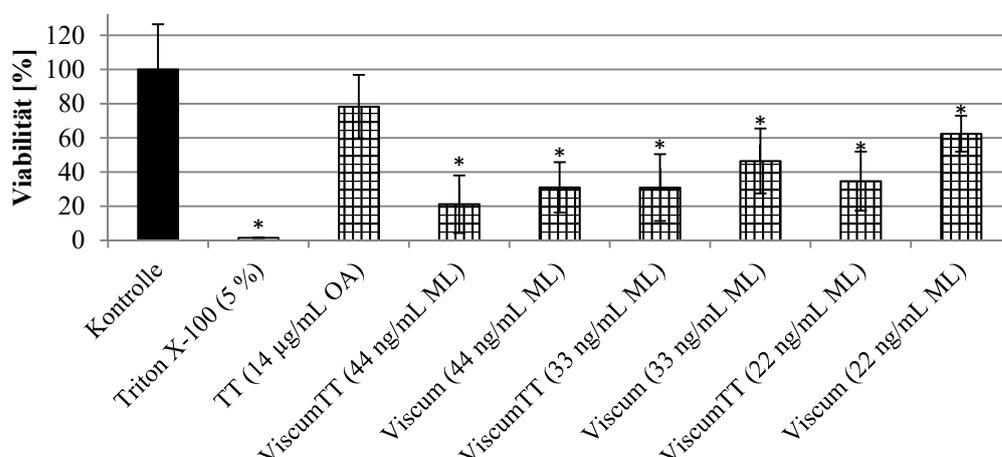


Abb. 52: Zytotoxizitätsuntersuchung nach der Inkubation mit Viscum und ViscumTT

Analyse von 15 000 Zellen pro Well. Nach 70–80%iger Konfluenz erfolgte die Substanzzugabe in entsprechender Konzentration im Zellmedium. Die Viscum-Extrakt-Charge 155 und die TT-Extrakt-Charge 155 mit einer OA-Endkonzentration von 14 µg/mL in der Kombination ViscumTT wurden verwendet. Bei der Kontrolle wurde reines Medium ohne Zusätze ergänzt. Triton X-100 wurde als Positivkontrolle mitgeführt. MTT-Assay erfolgte bei 100%iger Konfluenz der unbehandelten Kontrolle nach 67 Stunden. Angegeben sind die Mittelwerte ± Standardabweichungen (n = 3).

* signifikanter Unterschied zur unbehandelten Kontrolle, U-Test nach Wilcoxon-Mann-Whitney, $\alpha \leq 0,05$.

3.6.2.3 Vergleich der Kombinationen Mistellektin-Standard + Triterpen-Extrakt-Charge und ViscumTriterpen-Extrakt-Charge

Bei der Kombination des ML-Standards bzw. der Viscum-Extrakt-Charge 155 mit der TT-Extrakt-Charge 155 zeigte sich erneut ein geringerer Zellindex bei der Kombination ViscumTT-Extrakt im Vergleich zur ML+TT-Kombination (Abb. 53). Dieser Unterschied war jedoch nicht stärker ausgeprägt als bei der Einzelgabe (siehe Kapitel 3.6.1.3).

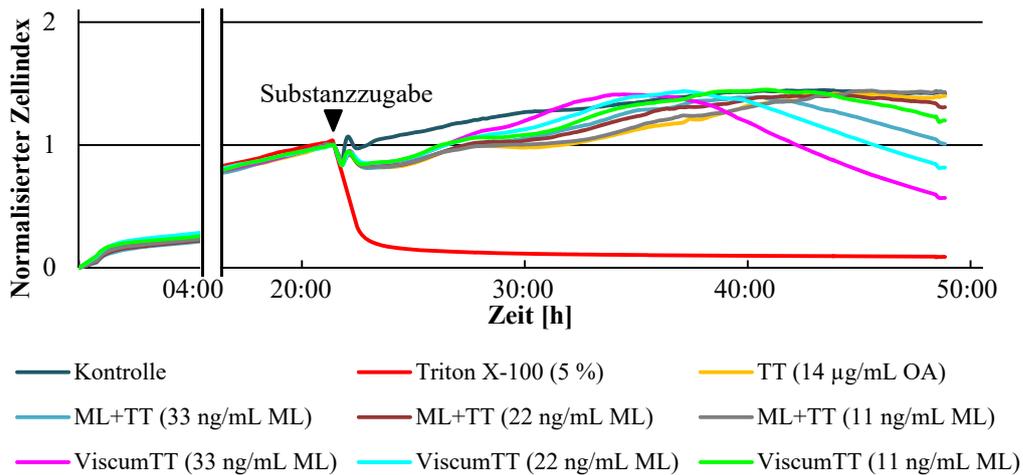


Abb. 53: Echtzeitanalyse der 143B-Zellen mit erfolgreicher Inkubation mit ML+TT und ViscumTT

Analyse von 15 000 Zellen pro Well mittels iCelligence®. Nach 70–80%iger Konfluenz erfolgte die Substanzzugabe in entsprechender Konzentration im Zellmedium. Bei den Kombinationen ML+TT und ViscumTT wurde die TT-Extrakt-Charge 155 mit einer OA-Endkonzentration von 14 µg/mL verwendet. Bei der Kontrolle wurde reines Medium ohne Zusätze ergänzt. Triton X-100 wurde als Positivkontrolle mitgeführt. Die Aufzeichnung der Zellindizes erfolgte alle drei Minuten.

Im MTT-Assay konnte ebenfalls ein signifikanter Unterschied zwischen ML+TT und ViscumTT (22 und 11 ng/mL ML) festgestellt werden (Abb. 54). Jede Kombination zeigte nach 49 Stunden eine geringere Zellviabilität im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle.

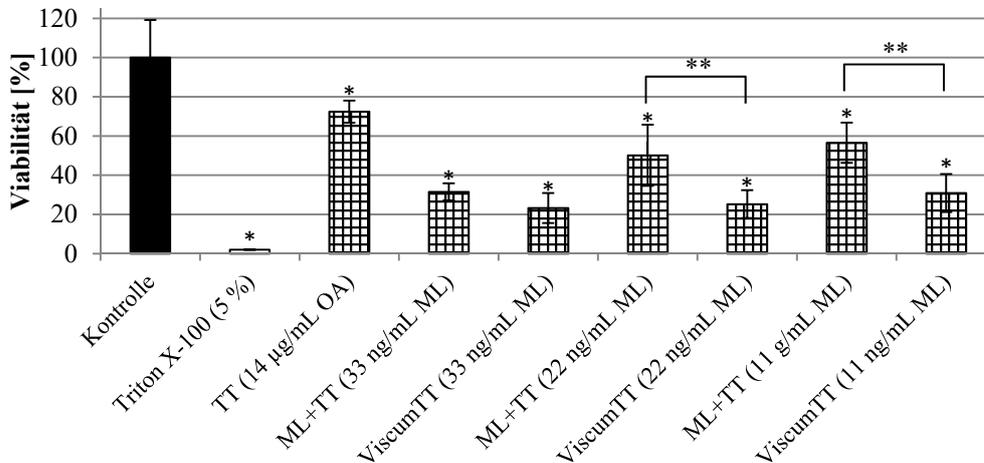


Abb. 54: Zytotoxizitätsuntersuchung nach der Inkubation mit ML+TT und ViscumTT

Analyse von 15 000 Zellen pro Well. Nach 70–80%iger Konfluenz erfolgte die Substanzzugabe in entsprechender Konzentration im Zellmedium, bei der Kontrolle wurde reines Medium ohne Zusätze verwendet. MTT-Assay erfolgte bei 100%iger Konfluenz der unbehandelten Kontrolle nach 49 Stunden. Angegeben sind die Mittelwerte \pm Standardabweichungen ($n = 3$).

* signifikanter Unterschied zur unbehandelten Kontrolle, U-Test nach Wilcoxon-Mann-Whitney, $\alpha \leq 0,05$.

** signifikanter Unterschied zwischen ML+TT und ViscumTT, U-Test nach Wilcoxon-Mann-Whitney, $\alpha \leq 0,05$.

3.6.3 Zugabe der Liposomen

3.6.3.1 Zugabe der Mistellektin-Liposomen

Der Verlauf der normalisierten Zellindices der 143B-Zellen nach erfolgter 24-stündiger Inkubation mit den ML-Liposomen ist in Abbildung 55 dargestellt. Es war kein Unterschied zwischen den zwei Formulierungsarten (Liposomen und Reinsubstanz) erkennbar. Die ausgewählten Konzentrationen von 22, 33 und 44 ng/mL zeigten keine Zytotoxizität.

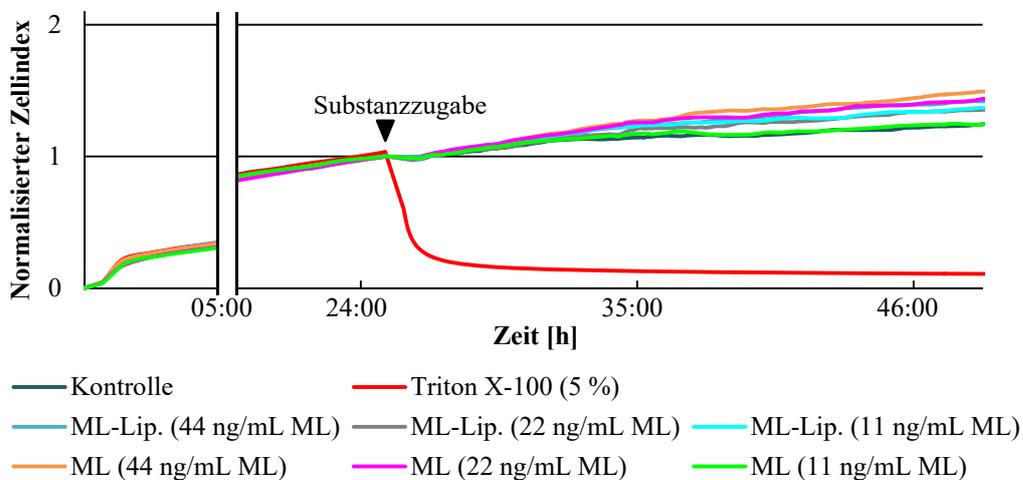


Abb. 55: Echtzeitanalyse der 143B-Zellen mit erfolgter Inkubation mit ML und ML-Liposomen

Analyse von 15 000 Zellen pro Well mittels iCelligence®. Nach 70–80%iger Konfluenz erfolgte die Substanzzugabe entsprechender Konzentration im Zellmedium. Bei der Kontrolle wurde reines Medium ohne Zusätze ergänzt. Triton X-100 wurde als Positivkontrolle mitgeführt. Die Aufzeichnung der Zellindizes erfolgte alle drei Minuten.

Im MTT-Assay konnte diese Beobachtung bestätigt werden, die Formulierungen mit einer ML-Konzentration von 11, 22 und 44 ng/mL zeigten kein signifikant unterschiedliches Zellwachstum (Abb. 56).

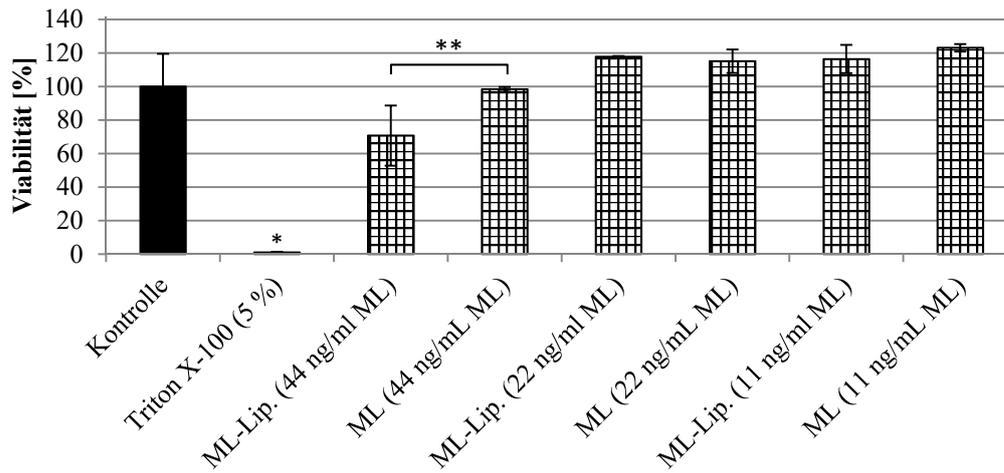


Abb. 56: Zytotoxizitätsuntersuchung nach der Inkubation mit ML und ML-Liposomen

Analyse von 15 000 Zellen pro Well. Nach 70–80%iger Konfluenz erfolgte die Substanzzugabe in entsprechender Konzentration im Zellmedium, bei der Kontrolle wurde reines Medium ohne Zusätze verwendet. Der MTT-Assay erfolgte bei 100%iger Konfluenz der unbehandelten Kontrolle nach 49 Stunden. Angegeben sind die Mittelwerte \pm Standardabweichungen ($n = 4$ bei zwei unabhängigen Versuchen).

* signifikanter Unterschied zur unbehandelten Kontrolle, zweiseitiger t-Test, $\alpha \leq 0,05$.

** signifikanter Unterschied zwischen ML und ML-Liposomen (ML-Lip.), zweiseitiger t-Test, $\alpha \leq 0,05$.

3.6.3.2 Zugabe der Triterpen-Liposomen

Der Einfluss der hergestellten TT-Liposomen auf die Osteosarkom-Zelllinie 143B wurde ebenfalls über eine Echtzeitanalyse und einen Endpunktassay bestimmt. In Abbildung 57 ist der Verlauf des normalisierten Zellindex nach erfolgter Inkubation mit den TT-Liposomen (14, 28 und 55 $\mu\text{g}/\text{mL}$ OA) dargestellt, dem gegenübergestellt sind die entsprechenden Verläufe der normalisierten Zellindices der Ausgangssubstanz (TT-Extrakt in MeOH, 14, 28 und 55 $\mu\text{g}/\text{mL}$ OA). Bei der höchsten Konzentration von 55 $\mu\text{g}/\text{mL}$ konnte ein Unterschied zwischen den Liposomen und der Ausgangssubstanz festgestellt werden (Abb. 57). Die anderen zwei untersuchten Konzentrationen zeigten nur minimale Unterschiede zwischen den Liposomen und dem Ausgangsextrakt.

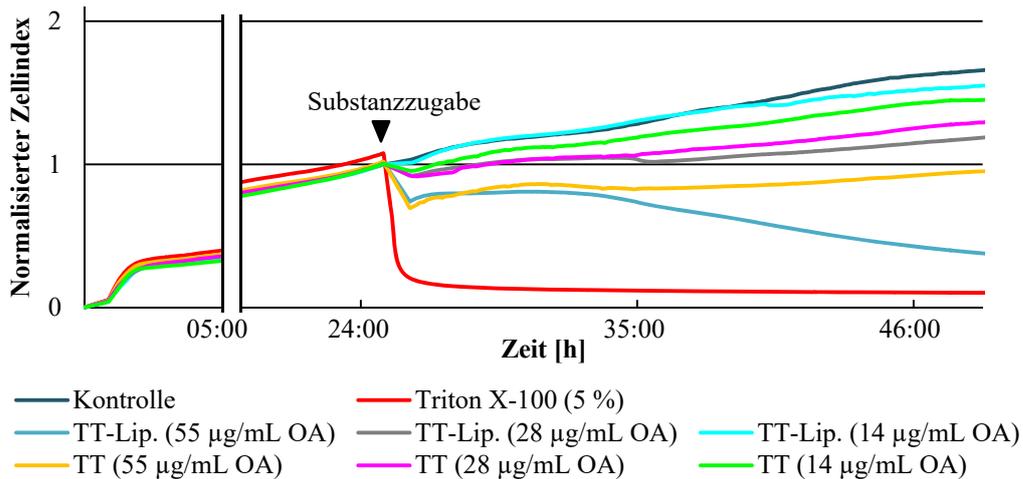


Abb. 57: Echtzeitanalyse der 143B-Zellen mit erfolgter Inkubation mit TT und TT-Liposomen

Analyse von 15 000 Zellen pro Well mittels iCelligence®. Nach 70–80%iger Konfluenz erfolgte die Substanzzugabe in entsprechender Konzentration im Zellmedium. Bei der Kontrolle wurde reines Medium ohne Zusätze ergänzt. Triton X-100 wurde als Positivkontrolle mitgeführt. Die Aufzeichnung der Zellindices erfolgte alle drei Minuten.

Bei dem abschließenden MTT-Assay konnte der signifikante Unterschied zwischen den TT-Liposomen und dem TT-Extrakt in MeOH bei einer OA-Konzentration von 55 µg/mL bestätigt werden (Abb. 58). Die weiteren Formulierungen mit einer OA-Konzentration von 14 und 28 µg/mL zeigten keine Unterscheidung hinsichtlich der Zytotoxizität. Die höheren OA-Konzentrationen von 28 und 55 µg/mL wirkten unabhängig von ihrer Verarbeitung beide zytotoxisch.

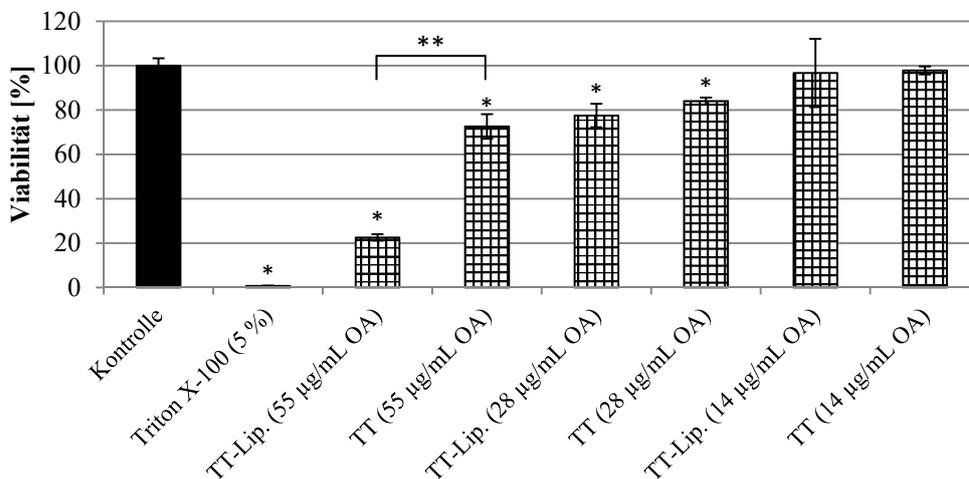


Abb. 58: Zytotoxizitätsuntersuchung nach der Inkubation mit TT und TT-Liposomen

Analyse von 15 000 Zellen pro Well. Nach 70–80%iger Konfluenz erfolgte die Substanzzugabe in entsprechender Konzentration im Zellmedium, bei der Kontrolle wurde reines Medium ohne Zusätze verwendet. Der MTT-Assay erfolgte bei 100%iger Konfluenz der unbehandelten Kontrolle nach 49 Stunden. Angegeben sind die Mittelwerte \pm Standardabweichungen ($n = 4$ bei zwei unabhängigen Versuchen).

* signifikanter Unterschied zur unbehandelten Kontrolle, zweiseitiger t-Test, $\alpha \leq 0,05$.

** signifikanter Unterschied zwischen TT und TT-Liposomen (TT-Lip.), zweiseitiger t-Test, $\alpha \leq 0,05$.

3.6.3.3 Zugabe der Kombination aus Triterpen- und Mistellektin-Liposomen

Bei der Kombination der ML-Liposomen mit dem methanolischen TT-Extrakt und den TT-Liposomen zeigte sich keine Unterscheidung bezüglich der Zellindices. Des Weiteren zeigte sich kein Unterschied gegenüber den reinen ML-Liposomen (Abb. 59).

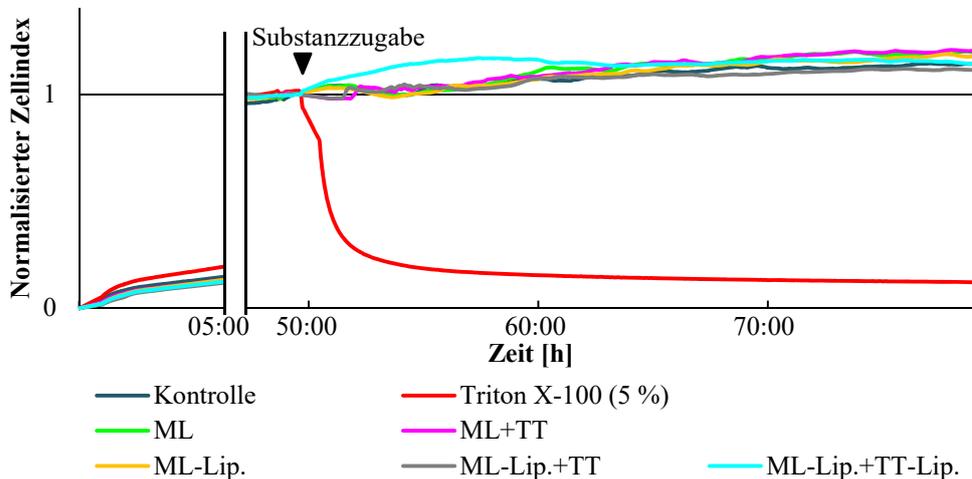


Abb. 59: Echtzeitanalyse der 143B-Zellen mit erfolgter Inkubation mit ML, TT, ML- und TT-Liposomen (1)
Analyse von 15 000 Zellen pro Well mittels iCelligence®. Nach 70–80%iger Konfluenz erfolgte die Substanzzugabe in entsprechender Konzentration im Zellmedium. Eine ML-Konzentration von 22 ng/mL wurde in den Proben ML, ML+TT, ML-Lip., ML-Lip.+TT und ML-Lip.+TT-Lip. verwendet. In den Proben ML+TT, ML-Lip.+TT und ML-Lip.+TT-Lip lag jeweils eine OA-Konzentration von 14 µg/mL vor. Bei der Kontrolle wurde reines Medium ohne Zusätze ergänzt. Triton X-100 wurde als Positivkontrolle mitgeführt. Die Aufzeichnung der Zellindices erfolgte alle drei Minuten.

Bei der Betrachtung der TT-Liposomen in der Kombination mit dem ML-Standard oder den ML-Liposomen konnten ebenfalls keine Unterschiede beobachtet werden (Abb. 60). Die Inkubation mit dem TT-Extrakt in MeOH führte zum gleichen Zellindex-Verlauf.

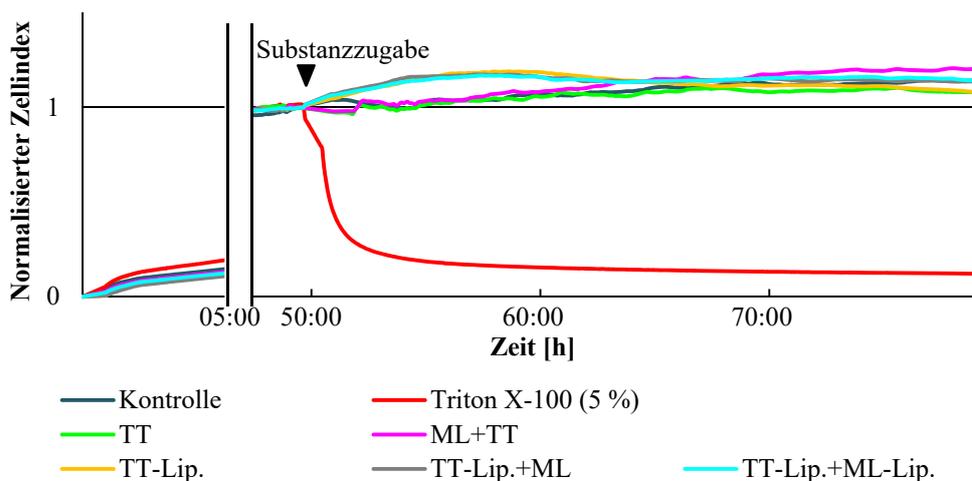


Abb. 60: Echtzeitanalyse der 143B-Zellen mit erfolgter Inkubation mit ML, TT, ML- und TT-Liposomen (2)
Analyse von 15 000 Zellen pro Well mittels iCelligence®. Nach 70–80%iger Konfluenz erfolgte die Substanzzugabe in entsprechender Konzentration im Zellmedium. Eine ML-Konzentration von 22 ng/mL wurde in den Proben ML+TT, TT-Lip.+ML und TT-Lip.+ML-Lip. verwendet. In den Proben TT, ML+TT, TT-Lip., TT-Lip.+ML und TT-Lip.+ML-Lip lag jeweils eine OA-Konzentration von 14 µg/mL vor. Bei der Kontrolle wurde reines Medium ohne Zusätze ergänzt. Triton X-100 wurde als Positivkontrolle mitgeführt. Die Aufzeichnung der Zellindices erfolgte alle drei Minuten.

Bei der Viabilitätsbestimmung mit dem MTT-Assay konnten diese Ergebnisse bestätigt werden und es zeigte sich lediglich bei der Kombination aus den ML-Liposomen und der methanolischen TT-Extrakt-Lösung ein signifikanter zytotoxischer Effekt (Abb. 61).

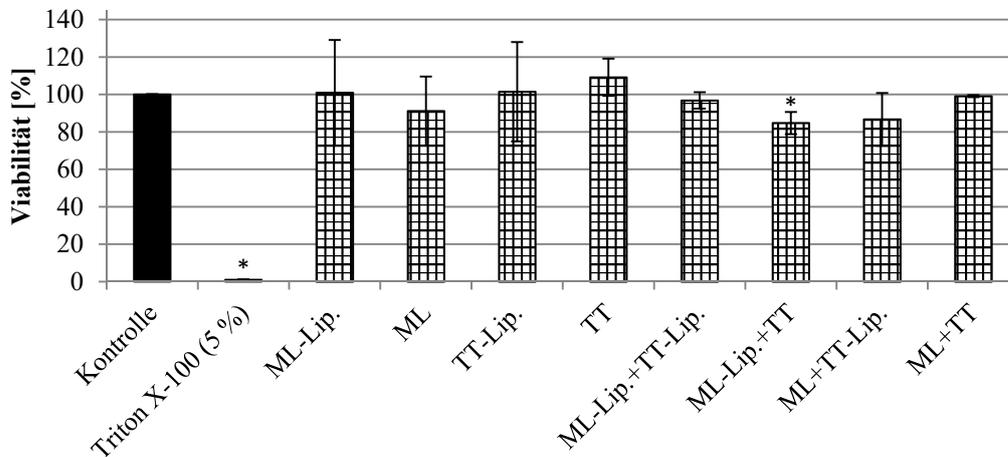


Abb. 61: Zytotoxizitätsuntersuchung nach der Inkubation mit ML, TT, ML- und TT-Liposomen

Analyse von 15 000 Zellen pro Well. Nach 70–80%iger Konfluenz erfolgte die Substanzzugabe, für die ML-Proben wurde eine ML-Konzentration von 22 ng/mL verwendet und für die TT-Proben eine OA-Konzentration von 14 µg/mL sowohl einzeln als auch in den Kombinationen, bei der Kontrolle wurde reines Medium ohne Zusätze verwendet. Der MTT-Assay erfolgte bei 100%iger Konfluenz der unbehandelten Kontrolle nach 79 Stunden. Angegeben sind die Mittelwerte ± Standardabweichungen (n = 4 bei zwei unabhängigen Versuchen).

* signifikanter Unterschied zur unbehandelten Kontrolle, zweiseitiger t-Test, $\alpha \leq 0,05$.

3.7 Konfokale Mikroskopie

Mithilfe der konfokalen Mikroskopie konnte die Aufnahme des MLs an lebenden Zellen über einen längeren Zeitraum beobachtet werden. Die Zellkerne wurden mit Hoechst 33342 angefärbt und sind in den folgenden Abbildungen stets blau dargestellt.

Fluoreszenzmarkierter ML-Standard (grüne Färbung) konnte in kleinen Vesikel in der Zelle nach einer Inkubation mit 200 ng/mL ML von insgesamt 16 Stunden lokalisiert werden (Abb. 62-A). Ebenfalls konnte eine Anhäufung des markierten MLs an der Peripherie der Zellen festgestellt werden (Abb. 62-B).

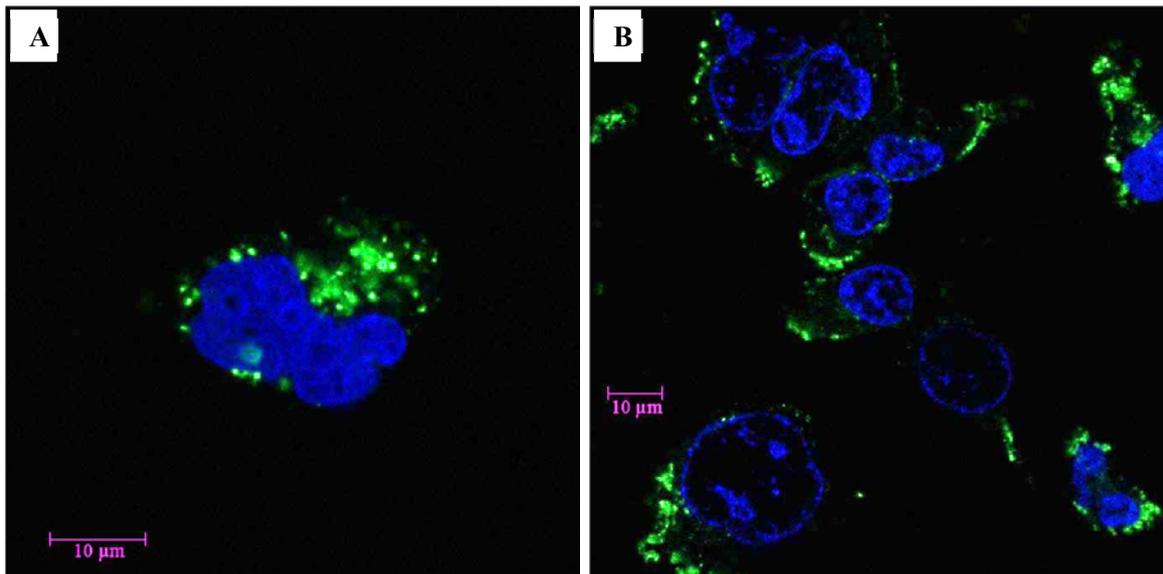


Abb. 62: Fluoreszenzmikroskopische Bilder von 143B-Zellen nach der Inkubation mit dem fluoreszenzmarkiertem ML-Standard

A – Nahaufnahme einer 143B-Zelle mit angefärbten Kern (blau) und mit mehreren ML-Standard-Vesikeln (grün). Die Inkubation erfolgte mit einer ML-Konzentration von 200 ng/mL über 16 Stunden.

B – Aufnahme mehrerer 143B-Zellen nach 24-stündiger Inkubation mit 100 µg/mL ML-Standard.

Durch die Anfärbung von Endosomen mithilfe von pHrodo® red Dextran konnte die Vesikelbildung innerhalb von Endosomen identifiziert werden (Abb. 63). Diese Lokalisation des MLs konnte nach einer 45-minütigen Inkubation mit 200 µg/mL ML-Standard beobachtet werden. Weiterhin war in dem gesamten Zellschälchen erkennbar, dass nicht jede Zelle ML aufgenommen hatte, sondern nur vereinzelt eine Aufnahme stattgefunden hatte.

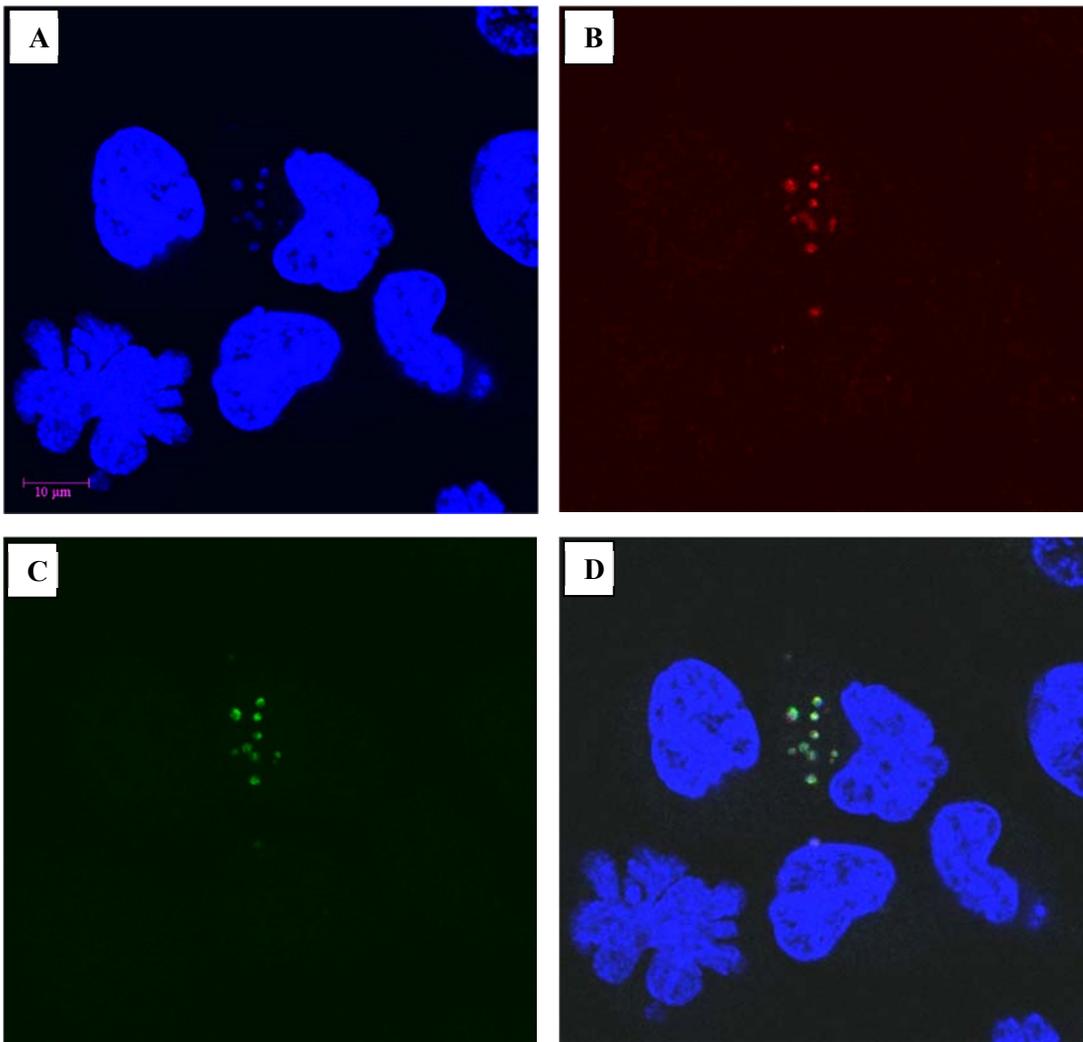


Abb. 63: Fluoreszenzmikroskopische Bilder von 143B-Zellen nach 45-minütiger Inkubation mit dem ML-Standard
 Die Zellkerne sind blau und der ML-Standard grün dargestellt. Die Endosomen (rot) wurden mit pHrodo® red Dextran angefärbt. Die Bilder wurden nach 45-minütiger Inkubation mit 200 µg/mL ML-Standard, gefärbt mit Alexa Fluor® 488, aufgenommen. Bild A stellt nur die Zellkerne dar, Bild B zeigt die Anfärbung von Endosomen und Bild C beschreibt die Ansiedlung von ML-Standard. Bild D ergibt sich aus der Zusammenlagerung aller drei vorherigen.

Diese Beobachtung zeigte sich ebenfalls bei den 143B-Zellen, die zuvor mit 750 ng/mL ML-Standard über vier Stunden inkubiert wurden. Da die Farbintensitäten nicht sehr stark ausgeprägt waren, wurde bei späteren Untersuchungen mit einer höheren ML-Standard-Konzentration gearbeitet.

Bei der Untersuchung von 143B-Zellen mit vorangegangener 24-stündiger Inkubation mit 150 µg/mL fluoreszenzmarkiertem ML-Standard zeigte sich nach der TT-Zugabe (methanolischer TT-Extrakt) eine Verschmelzung von Vesikeln. Die Abbildung 64-A zeigt den Beginn der Untersuchung mit einer OA-Konzentration von 10 µg/mL, nach 25 Minuten wurde die Abbildung 64-B erstellt, in der die Vesikelverschmelzung erkennbar ist (Pfeil). Anschließend wurde erneut der methanolische TT-Extrakt hinzugefügt (30 µg/mL OA-Endkonzentration), es kam zum Abfall der Farbintensität des beobachteten Vesikels mit dem Beginn einer Bläschenbildung nach 29 Minuten

(Abb. 64-C). Die Abnahme der Fluoreszenzintensität deutete auf eine ML-Abgabe in das Zytoplasma hin, eine erhöhte diffuse Streuung im Zellinneren konnte jedoch nicht festgestellt werden.

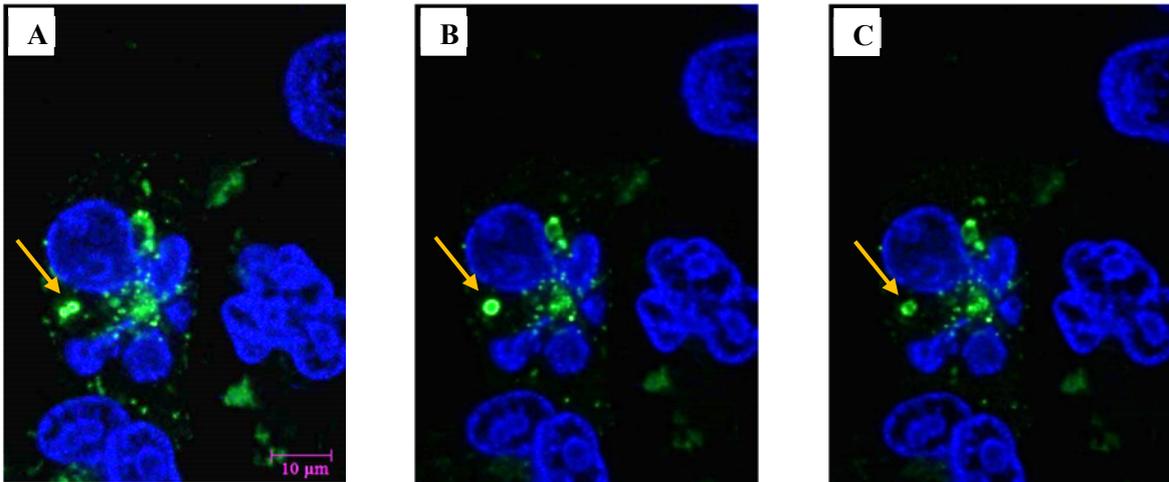


Abb. 64: Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen der Vesikelverschmelzung und anschließenden Lyse in 143B-Zellen

Die Zellen wurden über 24 Stunden mit dem ML-Standard (150 µg/mL) inkubiert und anschließend wurden die Kerne mit Hoechst 33343 angefärbt. Bild A zeigt den Beginn der Beobachtung mit einer Initial-OA-Konzentration von 10 µg/mL und Bild B zeigt den Zustand nach 25 Minuten. Nach einer weiteren Gabe des TT-Extraktes in MeOH (30 µg/mL OA-Endkonzentration) wurde zwei Minuten später Bild C aufgenommen. Die Vesikel bzw. der Vesikel wurden mit einem Pfeil markiert.

Die Bläschenbildung nach einer vorangegangenen Verschmelzung von Vesikeln konnte bei einer zweiten 24-stündigen Inkubation mit 100 µg/mL ML-Standard mit dem Zusatz des methanolischen TT-Extraktes (60 µg/mL OA-Endkonzentration) in einer Zelle noch deutlicher gezeigt werden (Abb. 65-Pfeil).

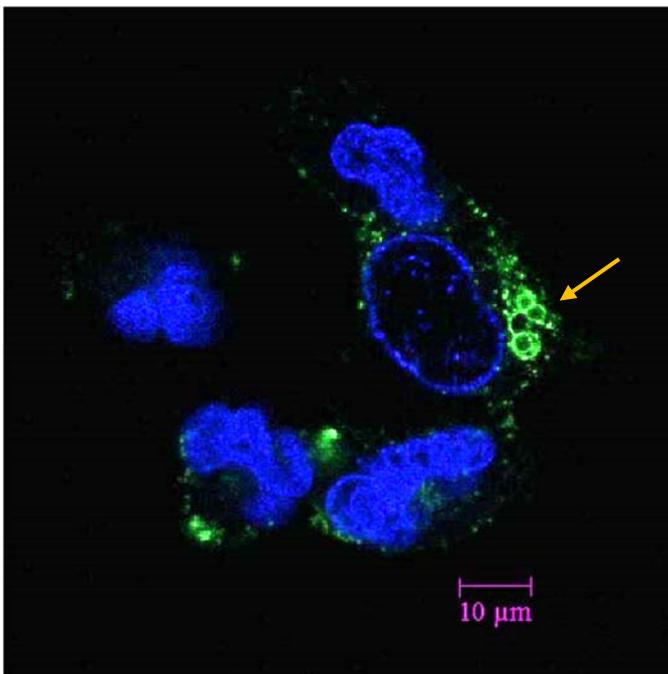


Abb. 65: Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen von 143B-Zellen mit ML-Bläschen-Bildung

Die Zellen wurden über 24 Stunden mit ML-Standard (100 µg/mL) inkubiert und anschließend wurden die Kerne mit Hoechst 33343 angefärbt.

Um die Lokalisation des fluoreszenzmarkierten MLs in der Zelle detaillierter zu beschreiben, wurden 143B-Zellen für 40 Stunden ausgesät und mit 200 $\mu\text{g}/\text{mL}$ fluoreszenzmarkierten ML für 45 Minuten inkubiert. Kurz vor dem Beginn der Fluoreszenzmikroskopie wurde zusätzlich die TT-Extrakt-Charge 155 mit einer OA-Endkonzentration von 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ zugesetzt. In der folgenden Abbildung 66 sind mehrere Zellen erkennbar, die den ML-Standard aufgenommen haben, sowohl in Vesikeln verpackt als auch diffus innerhalb des Zytoplasmas vorliegend (Abb. 66-C). In Abbildung 66-D ist bei den markierten Zellen (Pfeile) keine deutlich abgegrenzte Zellmembran erkennbar, der ML-Standard ist diffus zerstreut. Nach einer Stunde Beobachtung war ein Untergang dieser Zellen deutlich sichtbar (Abb. 66-E), die Zellmembran wurde porös und der Farbstoff CellMask[®] wanderte ins Zytoplasma ein, was die ML-Färbung überdeckte. Bei den anderen Zellen waren die ML-Vesikel nicht zerstört und die Zellmembranen zeigten eine scharfe Abtrennung zum Plasma. Bei den mittleren Zellen des Ausschnitts (Kreis) wurden sogar neue Zell-Zell-Verbindungen aufgebaut.

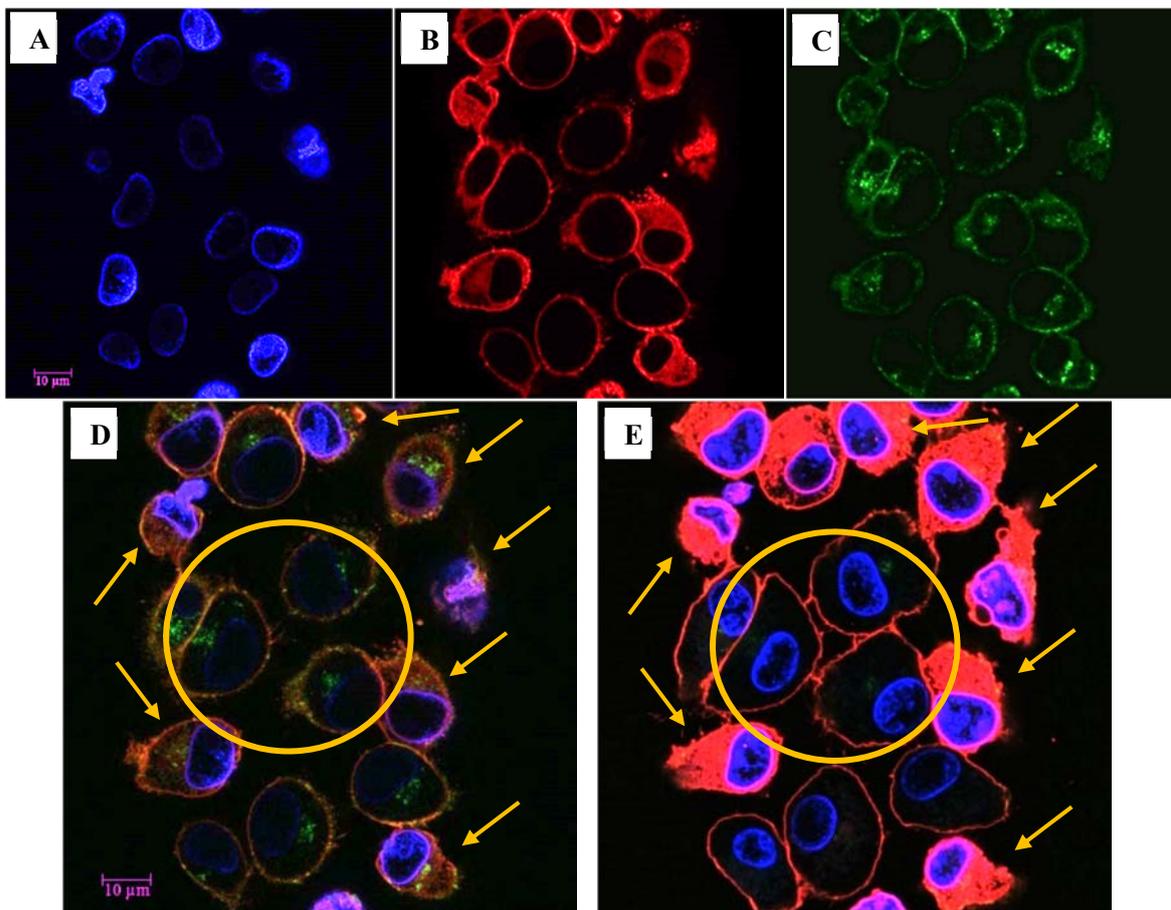


Abb. 66: Fluoreszenzmikroskopische Bilder von 143B nach 45-minütiger Inkubation mit dem ML-Standard und einem TT-Extrakt-Zusatz

Die 143B-Zellen wurden mit 200 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ML-Standard für 45 Minuten inkubiert mit den Färbelösungen Hoechst 33343 und CellMask[®] angefärbt. Kurz vor dem Beginn der mikroskopischen Betrachtung erfolgte die Zugabe der TT-Extrakt-Charge 155 mit einer OA-Endkonzentration von 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$. Die Bilder A bis C zeigen die einzelnen Färbungen bei Beginn der Aufnahme (A – Kernfärbung, B – Plasmamembranfärbung, C – ML-Standard-Färbung). Bild D ergibt sich aus der Zusammenlagerung von A, B und C. Bild E zeigt die Anfärbung der gleichen Zellen nach einem Untersuchungszeitpunkt von einer Stunde. Die Pfeile markieren die Zellen, die keine scharf abgegrenzte Zellmembran besitzen. Der markierte Kreis schließt die lebenden Zellen mit scharf abgegrenzter Zellmembran ein.

Bei der Betrachtung eines Zellausschnitts nach 7,5-stündiger Inkubation mit 100 µg/mL fluoreszenzmarkierten ML konnte in zwei Zellen die Lyse von Vesikeln beobachtet werden, was in einer komplett diffusen ML-Verteilung (Grünfärbung) resultierte (Abb. 67-Pfeile). Die Lyse der Vesikel der oberen Zelle erfolgte eine Minute nach der Erhöhung der OA-Konzentration von 20 µg/mL auf 40 µg/mL (Abb. 67-B), eine deutliche Grünfärbung konnte nach 65 Minuten in der Abbildung 67-F identifiziert werden. Die diffuse Verteilung des ML-Standards in der zweiten (unteren) Zelle begann erst ab der 46. Minute und stellte keinen direkten Zusammenhang zur TT-Zugabe dar. Jedoch konnte ebenfalls nach einer bestimmten Inkubationszeit mit dem ML-Standard und der methanolischen TT-Extrakt-Lösung eine Lyse der Vesikel erreicht werden, was sich in einer diffusen Verteilung, wie im Ansatz bei Abbildung 66, äußerte.

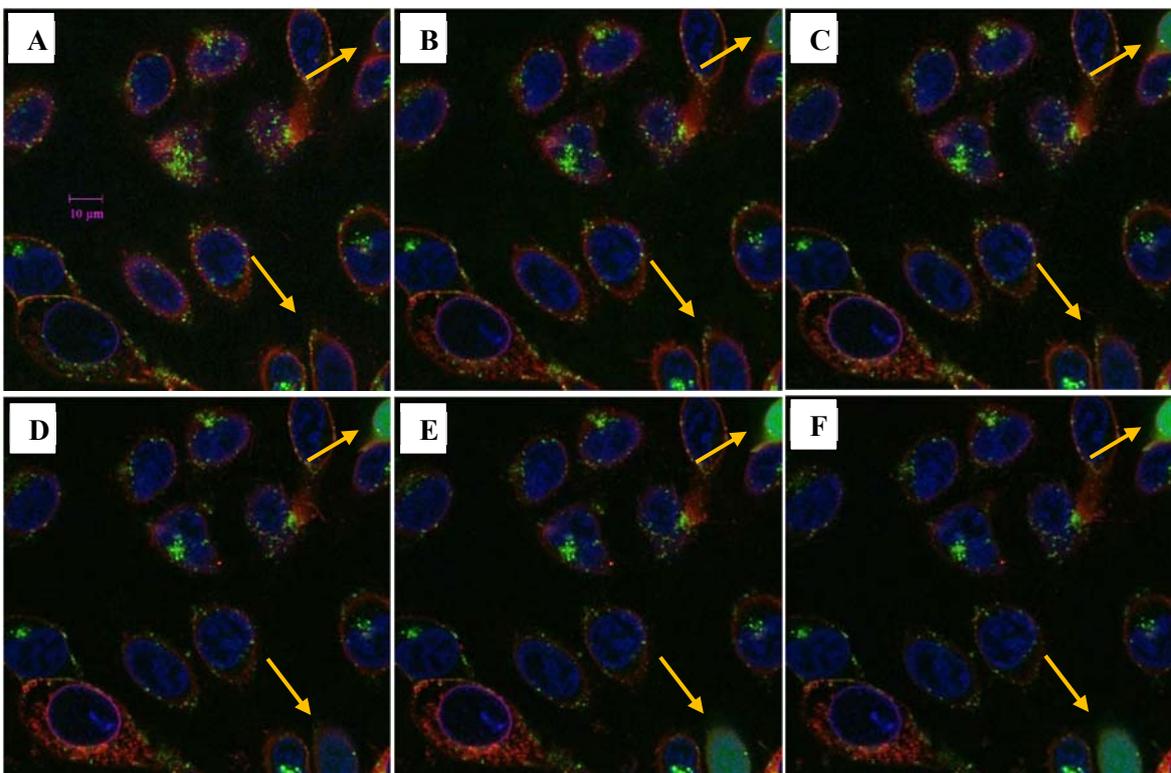


Abb. 67: Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen von 143B-Zellen über 70 Minuten mit erhöhter TT-Zugabe

Die Zellen wurden über 7,5 Stunden mit dem ML-Standard (100 µg/mL) inkubiert und anschließend wurden die Kerne mit Hoechst 33343 und die Zellmembranen mit CellMask® angefärbt. Bild A zeigt den Versuchsbeginn und es erfolgte die Zugabe von 20 µg/mL OA in Form einer methanolischen TT-Extrakt-Lösung. Nach elf Minuten wurde die OA-Konzentration verdoppelt (40 µg/mL) und Bild B aufgenommen. Die Untersuchung dieses Zellausschnittes erfolgte insgesamt 70 Minuten. Bild C wurde nach 20, Bild D nach 40, Bild E nach 46 und Bild F nach 65 Minuten aufgenommen.

Ein separater Versuch wurde mit der Einzelgabe der TT-Extrakt-Charge 155 (28 µg/mL OA) durchgeführt, um mögliche Auswirkungen auf die Zellen und insbesondere auf die Zellmembranen auszuschließen. In den mikroskopischen Untersuchungen wurden keine Veränderungen durch die Zugabe von 28 µg/mL OA-Endkonzentration festgestellt.

Des Weiteren wurde ein Experiment mit Rhodamin-gekoppeltem β -CD (6-deoxy-6-[(5/6)-rhodaminythioureido]- β -CD) durchgeführt, um eine mögliche separate Ansiedlung innerhalb der

Zelle und Interaktionen mit der Zelle oder der Zellmembran ausschließen zu können. In der Abbildung 68 ist die Verteilung des gefärbten β -CD und des MLs in der Zelle dargestellt, es wurde mit 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ML für 4,5 Stunden und mit 40 $\mu\text{g}/\text{mL}$ gefärbtem β -CD für 20 Minuten inkubiert.

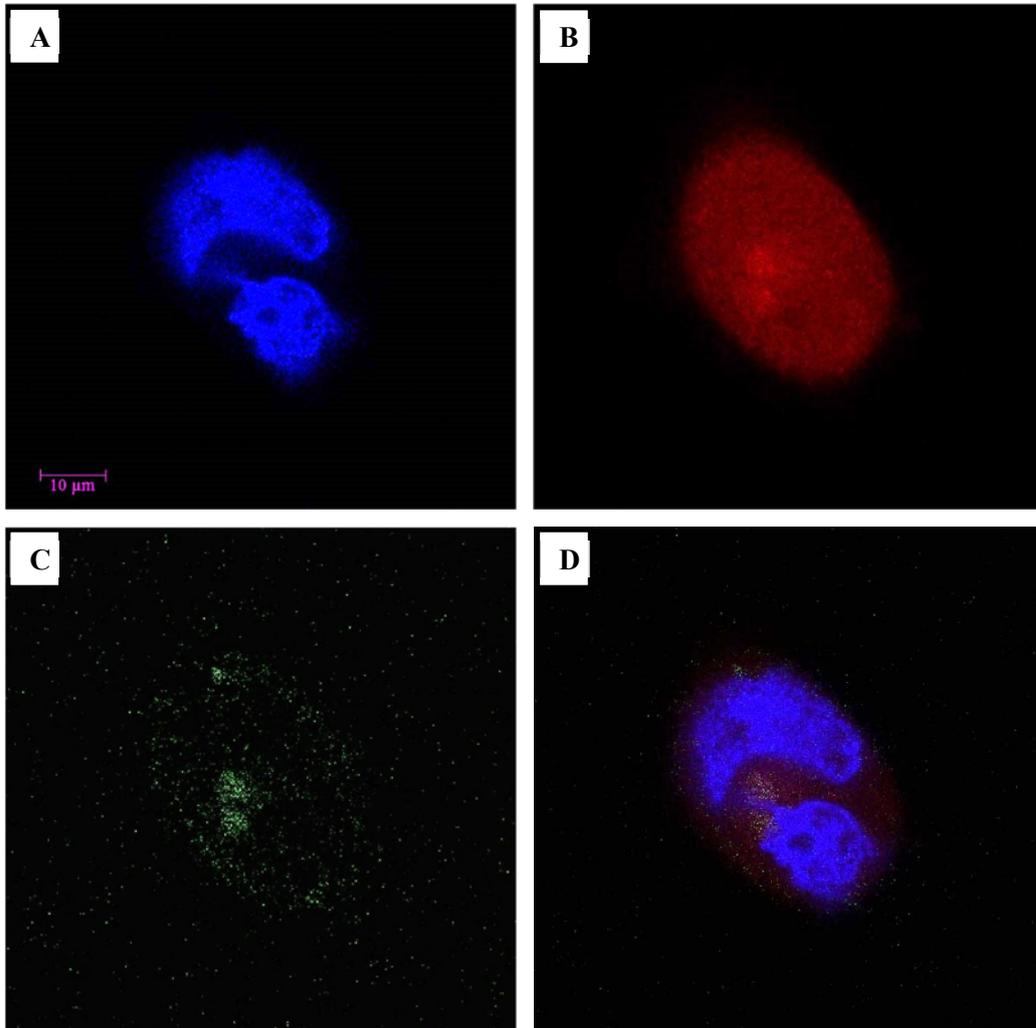


Abb. 68: Fluoreszenzmikroskopische Bilder von 143B nach 4,5-stündiger Inkubation mit dem ML-Standard

Die Zellkerne sind blau und der ML-Standard grün dargestellt. Zusätzlich wurde 20 Minuten mit Rhodamin-markiertem β -CD inkubiert (rot gefärbt). Die Bilder wurden nach 4,5-stündiger Inkubation mit 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ML-Standard, gefärbt mit Alexa Fluor® 488, aufgenommen. Bild A stellt nur die Zellkerne dar, Bild B zeigt die Verteilung des Rhodamin-markierten β -CDs an und Bild C beschreibt die Ansiedlung von ML-Standard. Bild D ergibt sich aus der Zusammenlagerung aller drei vorherigen.

Es konnte bei der kurzen Inkubationsdauer lediglich eine diffuse Verteilung des gefärbten β -CDs in der Zelle beobachtet werden, die keinen direkten Zusammenhang mit der Verteilung des MLs erkennen ließ.

Anschließend wurden 143B-Zellen betrachtet, die sowohl mit 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ML als auch mit 40 $\mu\text{g}/\text{mL}$ gefärbtem β -CD über 22 Stunden inkubiert wurden. Diese Beobachtung sollte einen Unterschied bei der Verteilung des β -CDs bei Langzeiteinwirkung aufdecken. In Abbildung 69 zeigt sich eine geringere diffuse Verteilung in der Zelle im Vergleich zur kurzen Inkubationsdauer. Zusätzlich konnten erste Vesikel beobachtet werden, die sowohl das β -CD als auch das ML gemeinsam

beinhalteten. Weitere Vesikel, in denen ausschließlich das ML vorhanden war, konnten ebenfalls in den Zellen lokalisiert werden.

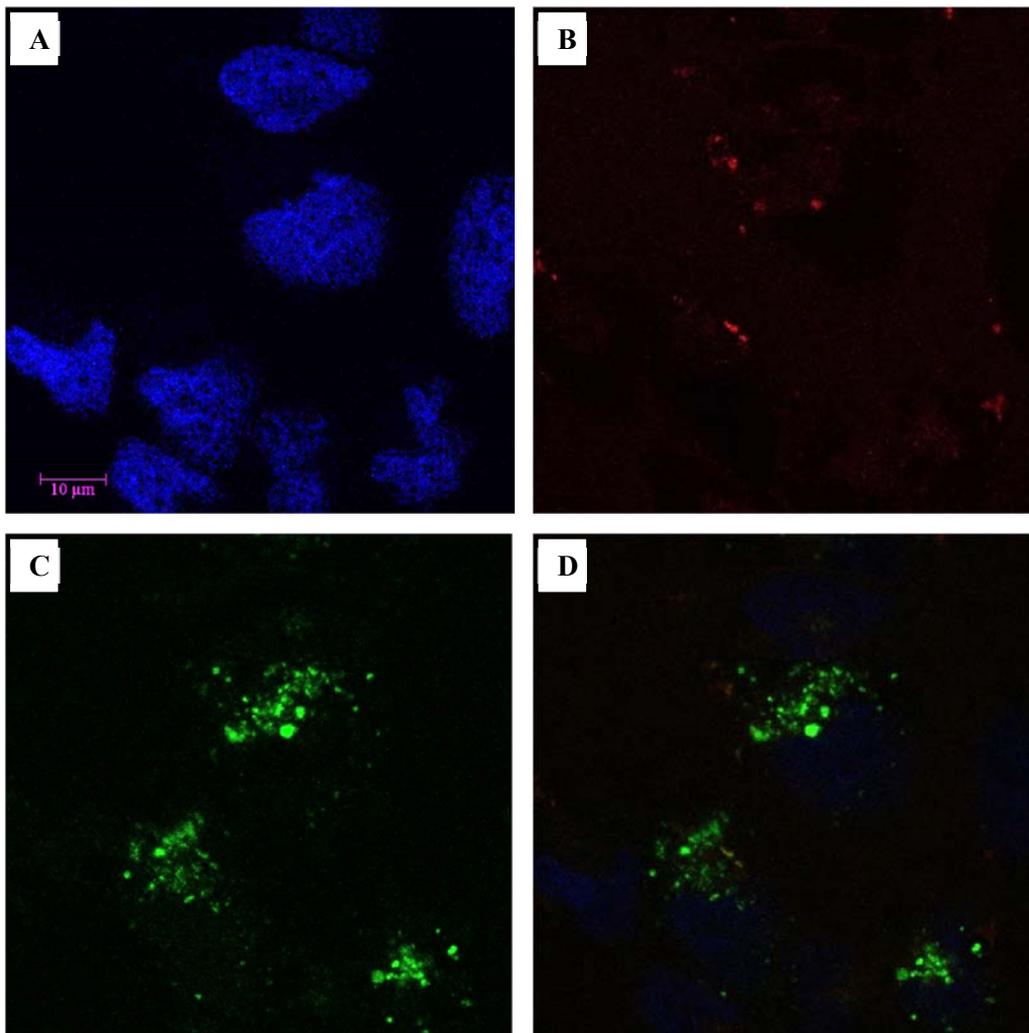


Abb. 69: Fluoreszenzmikroskopische Bilder von 143B nach 22-stündiger Inkubation mit dem ML-Standard und mit β-CD

Die Zellkerne sind blau und der ML-Standard grün dargestellt. Es wurde 22 Stunden mit 100 µg/mL ML-Standard, gefärbt mit Alexa Fluor® 488, und mit 40 µg/mL Rhodamin-markierten β-CD inkubiert (rot gefärbt). Bild A stellt nur die Zellkerne dar, Bild B zeigt die Verteilung des Rhodamin-markierten β-CDs an und Bild C beschreibt die Ansiedlung des ML-Standards. Bild D ergibt sich aus der Zusammenlagerung aller drei vorherigen.

3.8 Oleanolsäure-Quantifizierung

3.8.1 Faktorbestimmung im organischen Lösungsmittel (Chloroform)

Die Quantifizierung der OA im organischen Lösungsmittel erfolgte mithilfe des internen Standards Erythrodiols (Abb. 70).

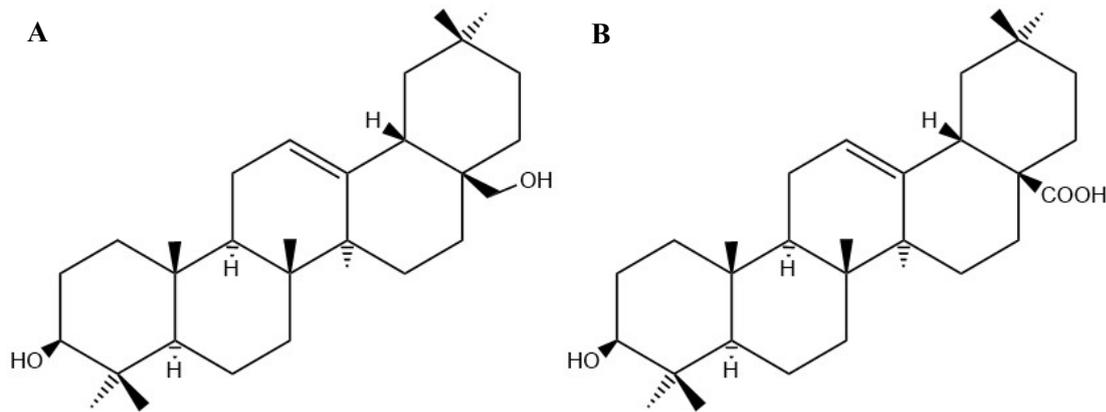


Abb. 70: Strukturformeln von Erythrodiol (A) und Oleanolsäure (B)

Die Berechnung erfolgte mittels entsprechender Formel:

$$c(\text{OA}) = F \times \frac{c(\text{Erythro})}{A(\text{Erythro})} \times A(\text{OA})$$

$c(\text{OA})$	Konzentration OA [$\mu\text{g/mL}$]
F	Faktor von 2,37
$c(\text{Erythro})$	Konzentration Erythrodiol [$\mu\text{g/mL}$]
$A(\text{Erythro})$	Fläche von Erythrodiol
$A(\text{OA})$	Fläche von OA

Um die Berechnung mittels Erythrodiol zu ermöglichen, wurde die Wiederfindungsrate von Erythrodiol in acht verschiedenen Proben, die jeweils dreifach vermessen wurden, bestimmt. Eine externe Kalibrierung mit dem Standard erfolgte mithilfe von sieben verschiedenen Proben im Konzentrationsbereich von 0,5–8,3 $\mu\text{g/mL}$. Eine gute Linearität mit einem Korrelationskoeffizienten von 0,9997 wurde erreicht. Die Wiederfindungsrate betrug $99,30 \pm 3,62 \%$. Anschließend wurde der Faktor 2,37 für die OA-Quantifizierung mithilfe von acht verschiedenen Mischungen aus OA und Erythrodiol ermittelt. Alle Mischungen wurden separat dreimal vermessen.

In Abbildung 71 ist beispielhaft ein Chromatogramm mit einem Erythrodiol-Gehalt von 5,5 $\mu\text{g/mL}$ und einem OA-Gehalt von 2,17 $\mu\text{g/mL}$ dargestellt.

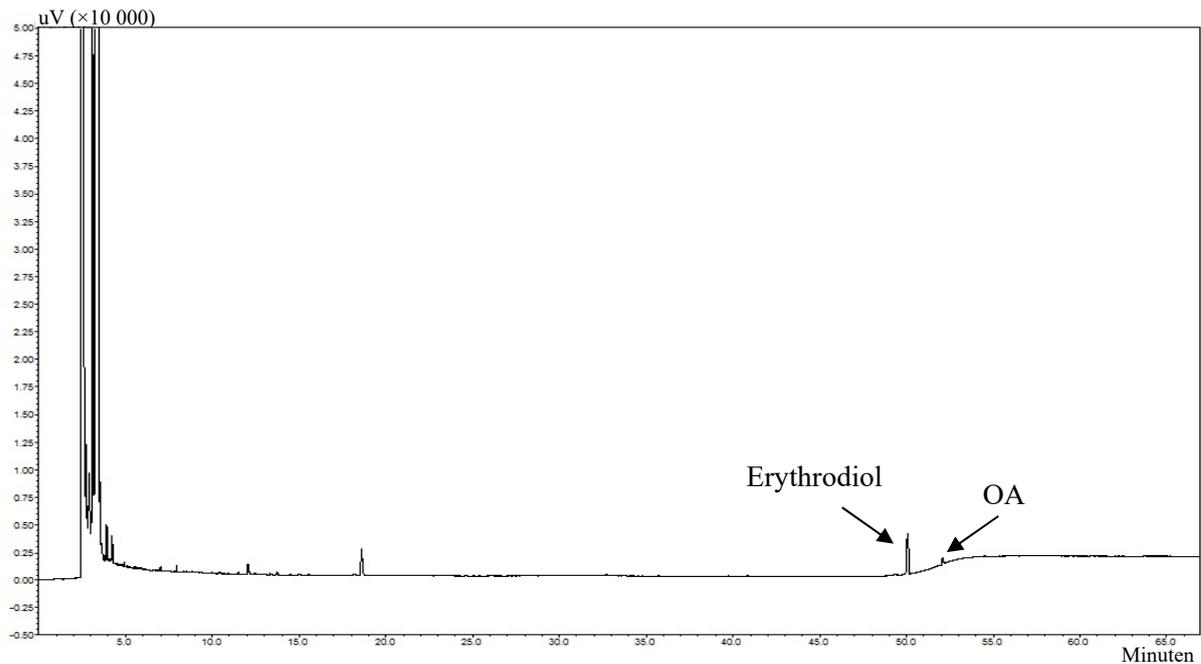


Abb. 71: GC / FID-Chromatogramm einer Mischung aus 5,5 $\mu\text{g/mL}$ Erythrodiol und 2,17 $\mu\text{g/mL}$ OA in Chloroform. 5 μL einer Mischung aus 5,5 $\mu\text{g/mL}$ Erythrodiol und 2,17 $\mu\text{g/mL}$ OA wurde mit einer Split-Ratio von 20:1 eingespritzt.

3.8.2 Faktorbestimmung in einer biologischen Matrix

Die Quantifizierung der OA in einer biologischen Matrix erfolgte ebenfalls mithilfe des internen Standards Erythrodiol. Die Wiederfindungsrate von $97,89 \pm 9,47 \%$ für das Erythrodiol wurde im Serum durch fünf verschiedene Proben mit jeweiliger Dreifachmessung bestimmt. Das Serum stammte von verschiedenen unbehandelten NSG-Mäusen und entsprach der Probenmatrix. Das Mitführen des internen Standards erlaubte zusätzlich eine Überwachung der Probenaufarbeitung. Die Berechnung der Wiederfindungsrate erfolgte mittels externer Kalibrierung von fünf verschiedenen Proben im Konzentrationsbereich von 0,8–4,8 $\mu\text{g/mL}$. Eine gute Linearität mit einem Korrelationskoeffizienten von 0,9955 war gegeben. Die Konzentration der OA wurde ebenfalls über das Flächenverhältnis von Probe und internem Standard (siehe Kapitel 3.8.1) berechnet. Der Faktor ergab den Wert von 2,29 und wurde durch fünf verschiedene Mischungen aus OA und Erythrodiol im Serum mit jeweiliger Dreifachmessung bestimmt.

3.8.3 Validierungsergebnisse im organischen Lösungsmittel

Im Rahmen der Validierung wurden die Parameter Selektivität, Präzision, Robustheit, Richtigkeit, Genauigkeit, Nachweis- und Bestimmungsgrenze untersucht. Alle Ergebnisse beziehen sich auf die Messungen von unbehandelten Proben.

Selektivität

Der Peak von OA war basisliniengetrennt und die Auflösung im Bezug zum Erythrodiol war größer 1,5 (8,02).

Präzision

Um die Wiederholpräzision der Methode zu ermitteln, wurde der Mittelwert und die Standardabweichung der OA-Konzentration bestimmt ($n = 9$). Die Proben enthielten $2,11 \pm 0,12 \mu\text{g/mL}$ OA (Tab. 37). Der Variationskoeffizient lag bei 5,84 %. Es lag kein Ausreißer nach Dixon vor ($Q_{\text{klein}} = 0,29106$; $Q_{\text{groß}} = 0,06692$), da Q kleiner als die Prüfgröße Q (0,51200) war. Nach Durchführung des einseitigen Trendtests nach Neumann konnte kein Trend festgestellt werden, da Testgröße W von 1,08580 größer als Tabellenwert W 1,02440 ($\alpha \leq 5 \%$) war.

Tab. 37: Bestimmung der Präzision

Probennummer	OA [$\mu\text{g/mL}$]
1	2,07
2	2,07
3	2,28
4	2,19
5	2,16
6	2,26
7	2,01
8	2,01
9	1,91

OA-Bestimmung von neun Proben mittels GC / FID-Methode. Jede Probe wurde dreifach vermessen und der Mittelwert gebildet.

Robustheit

Für die Bestimmung der Laborpräzision wurde der Gehalt an zwei verschiedenen Tagen bestimmt ($n = 3$, Tab. 38). Die Prüfung auf Varianzhomogenität ergab einen F-Wert von 2,4194 und war kleiner als der Tabellenwert von 19 (einseitig, $\alpha \leq 5 \%$). Die untersuchte Stichprobe erwies sich somit als homogen. Die Robustheit ergab einen t-Wert von 0,03698. Im Vergleich zum Tabellenwert von 2,77600 (zweiseitig, $\alpha \leq 5 \%$) war die Prüfgröße kleiner und die Methode laut t-Test robust.

Tab. 38: Laborpräzision

Probennummer	OA [$\mu\text{g/mL}$]	
	Analyse 04.08.2015	Analyse 06.08.2015
1	3,39	3,18
2	2,94	2,86
3	3,43	3,69

OA-Quantifizierung von drei Proben mittels GC / FID-Methode. Jede Probe wurde dreifach vermessen und der Mittelwert gebildet.

Richtigkeit

Für die Ermittlung der Richtigkeit wurde die gleiche Stichprobe, wie in Tabelle 37 angegeben, verwendet. Es wurden neun verschiedene Proben mit der OA-Konzentration von 2,18 µg/mL verwendet. Der Mittelwert der wahren Werte betrug $2,11 \pm 0,12$ µg/mL und der Sollwert 2,18 µg/mL. Eine Übereinstimmung von $96,72 \pm 5,65$ % wurde dementsprechend ermittelt. Nach dem Wilcoxon-Test wurde der Sollwert eingehalten, ein systematischer Fehler war nicht nachweisbar. Die Prüfgröße lag mit dem Wert von 22 in den Prüfkriterien von $6 \leq \text{Prüfgröße} \leq 38$ (zweiseitiger Wilcoxon-Test, $\alpha \leq 5$ %).

Genauigkeit

Dieser Validierungspunkt wurde durch die Vermessung von sieben verschiedenen Proben mit unterschiedlicher OA-Konzentration, die jeweils dreifach vermessen wurden, ermittelt. Die Übereinstimmung zwischen den jeweiligen wahren (ermittelten) Werten und den Referenzwerten lag bei OA zwischen 85,5 und 109,8 %.

Linearität

Die Prüfung auf Linearität der Methode erfolgte mit der Analyse von vier verschiedenen Proben. In Tabelle 39 sind die Soll- und Ist-Werte der OA-Konzentration gegenübergestellt.

Tab. 39: OA-Konzentration (Soll / Ist) für den Linearitätsnachweis

Probennummer	OA (Soll) [µg/mL]	OA (Ist) [µg/mL]
1	2,18	2,15
2	3,48	3,25
3	1,09	0,80
4	4,36	4,83

OA-Quantifizierung von vier Proben. Jede Probe wurde dreifach vermessen und der Mittelwert gebildet.

Der ermittelte Wert (y) wurde gegen den berechneten Wert (x) aufgetragen (Abb. 72). Die Linearregression ergab folgende Geradengleichung mit einem Regressionskoeffizienten von 0,99038:

$$y = 1,1771x - 0,5116$$

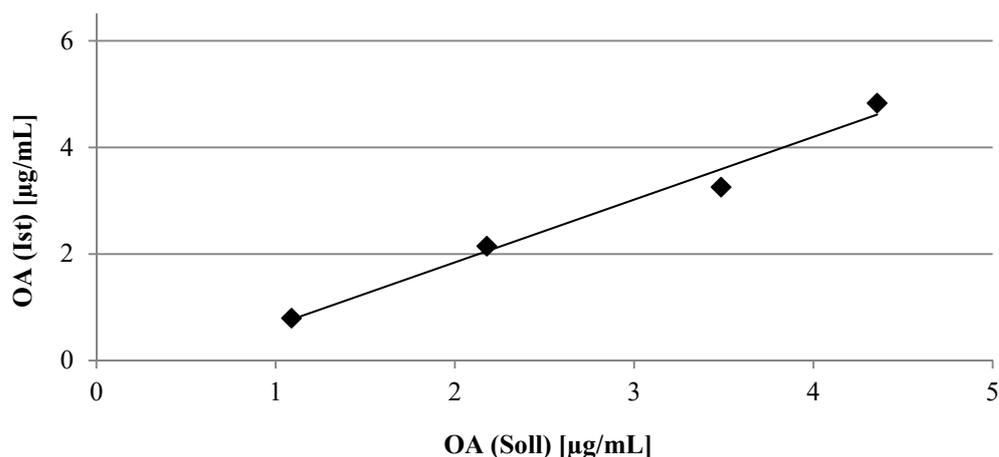


Abb. 72: Linearität der GC / FID-Methode

Der OA-Ist-Wert wurde gegen den OA-Soll-Wert aufgetragen. Die Linearregression erfolgte und wurde in die Grafik übernommen.

Nachweis- und Bestimmungsgrenze

Die Ermittlung der Grenzen erfolgte über das Signal-Rausch-Verhältnis mithilfe folgender Gleichung:

$$\text{LOD} = h_{(R)} + 3 \times \text{sdv}$$

$$\text{LOQ} = h_{(R)} + 10 \times \text{sdv}$$

LOD	Nachweisgrenze
LOQ	Bestimmungsgrenze
$h_{(R)}$	Höhe des Rauschen
sdv	Standardabweichung des Rauschens

Das Rauschen wurde durch zehn verschiedene Messungen ermittelt.

Durch die Vermessung von OA-Proben im organischen Lösungsmittel ergaben sich folgende Grenzen bei $n = 5$ (Tab. 40):

Tab. 40: Nachweis- und Bestimmungsgrenze

	LOD [ng/mL]	LOQ [ng/mL]
CHCl ₃	320	400

Die Nachweis- und Bestimmungsgrenze wurde durch die Messung verschiedener OA-Proben im organischen Lösungsmittel (Chloroform – CHCl₃) bestimmt ($n = 5$).

3.8.4 Validierungsergebnisse im Serum

Im Rahmen der Validierung wurden die Parameter Selektivität, Präzision, Richtigkeit, Genauigkeit, Nachweis- und Bestimmungsgrenze untersucht. Das Charakteristikum Robustheit konnte leider

aufgrund der geringen Menge an Serum nicht überprüft werden. Alle Ergebnisse beziehen sich auf die Messungen von ausgeschüttelten Serumproben, denen zuvor der Standard OA hinzugesetzt wurde.

Selektivität

Der Peak von OA war basisliniengetrennt und die Auflösung im Bezug auf Erythrodiol war größer 1,5 (7,02).

Präzision

Um die Wiederholpräzision der Methode zu ermitteln, wurde der Mittelwert und die Standardabweichung der OA-Konzentration bestimmt ($n = 7$). Die Probe enthielt $0,87 \pm 0,07 \mu\text{g/mL}$ (Tab. 41). Der Variationskoeffizient lag bei 7,65 %. Es lag kein Ausreißer nach Dixon vor ($Q_{\text{klein}} = 0,2081$; $Q_{\text{groß}} = 0,4293$), da Q kleiner als die Prüfgröße Q (0,507) war. Nach Durchführung des einseitigen Trendtests nach Neumann konnte kein Trend festgestellt werden, da Testgröße W von 3,0989 größer als Tabellenwert W 0,9359 ($\alpha \leq 5 \%$) war.

Tab. 41: Bestimmung der Präzision (Serum)

Probennummer	OA [$\mu\text{g/mL}$]
1	0,88
2	0,87
3	0,78
4	0,99
5	0,83
6	0,82
7	0,90

OA-Bestimmung von sieben Proben mittels GC / FID-Methode. Jede Probe wurde dreifach vermessen und der Mittelwert gebildet.

Richtigkeit

Für die Ermittlung der Richtigkeit wurde die gleiche Stichprobe, wie in Tabelle 41 angegeben, verwendet. Es wurden sieben verschiedene Proben mit der OA-Soll-Konzentration von $0,93 \mu\text{g/mL}$ verwendet. Der Mittelwert der wahren Werte betrug $0,87 \pm 0,07 \mu\text{g/mL}$ und der Sollwert $0,93 \mu\text{g/mL}$. Eine Übereinstimmung von $92,91 \pm 7,11 \%$ wurde ermittelt. Nach dem Wilcoxon-Test wurde der Sollwert eingehalten, ein systematischer Fehler war nicht nachweisbar. Die Prüfgröße lag mit dem Wert von 3 in den Prüfkriterien von $3 \leq \text{Prüfgröße} \leq 24$ (zweiseitiger Wilcoxon-Test, $\alpha \leq 5 \%$).

Genauigkeit

Dieser Validierungspunkt wurde durch die Vermessung von sieben verschiedenen Proben mit unterschiedlicher OA-Konzentration, die jeweils dreifach eingespritzt wurden, ermittelt. Die

Übereinstimmung zwischen den jeweiligen wahren (ermittelten) Werten und den Referenzwerten lag bei OA zwischen 88,32 und 112,52 %.

Linearität

Die Prüfung auf Linearität der Methode erfolgte mit der Analyse von vier verschiedenen Proben. In Tabelle 42 sind die Soll- und Ist-Werte der OA-Konzentration gegenübergestellt.

Tab. 42: OA-Konzentration (Soll / Ist) für den Linearitätsnachweis (Serum)

Probennummer	OA (Soll) [$\mu\text{g/mL}$]	OA (Ist) [$\mu\text{g/mL}$]
1	3,89	3,43
2	3,11	3,07
3	1,56	1,62
4	4,67	5,25
5	0,93	0,87

OA-Quantifizierung von vier Proben. Jede Probe wurde dreifach vermessen und der Mittelwert gebildet.

Der ermittelte Wert (y) wurde gegen den berechneten Wert (x) aufgetragen (Abb. 73). Die Linearregression ergab folgende Geradengleichung mit einem Regressionskoeffizienten von 0,9775:

$$y = 1,0638x - 0,1642$$

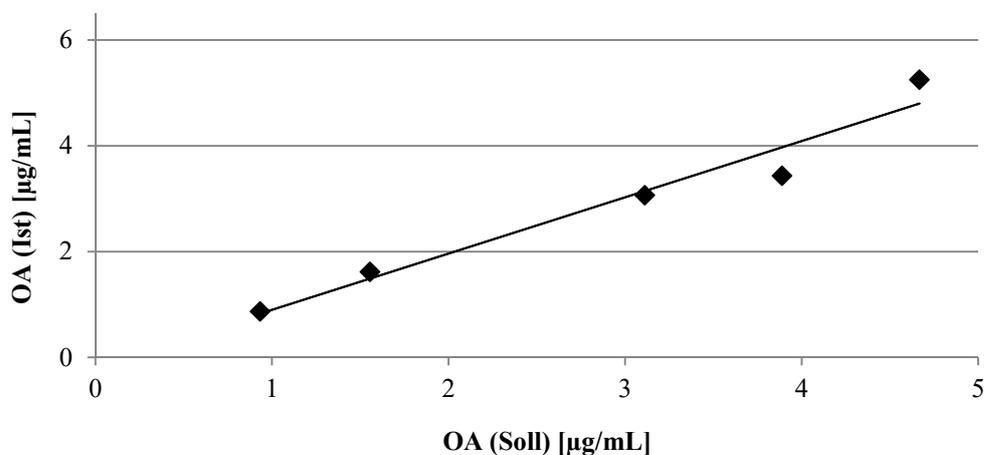


Abb. 73: Linearität der GC / FID-Methode im Serum

Der OA-Ist-Wert wurde gegen den OA-Soll-Wert aufgetragen. Die Linearregression erfolgte und wurde in die Grafik übernommen.

Nachweis- und Bestimmungsgrenze

Die Ermittlung der Grenzen erfolgte über das Signal–Rausch-Verhältnis mithilfe folgender Gleichung:

$$\text{LOD} = h_{(R)} + 3 \times \text{sdv}$$

$$\text{LOQ} = h_{(R)} + 10 \times \text{sdv}$$

LOD	Nachweisgrenze
LOQ	Bestimmungsgrenze
$h_{(R)}$	Höhe des Rauschen
sdv	Standardabweichung des Rauschens

Das Rauschen wurde durch zehn verschiedene Messungen ermittelt.

Durch die Vermessung von den OA-Proben im Serum ergaben sich folgende Grenzen bei $n = 5$ (Tab. 43):

Tab. 43: Nachweis- und Bestimmungsgrenze im Serum

	LOD [ng/mL]	LOQ [ng/mL]
Serum	310	460

Die Nachweis- und Bestimmungsgrenze wurde durch die Messung verschiedener OA-Proben im Serum bestimmt ($n = 5$).

3.8.5 Oleanolsäure-Quantifizierung *in vivo*

Die validierte GC / FID-Methode wurde in gleicher Weise für die OA-Bestimmung im Rahmen eines Tierversuchs verwendet. Als Versuchstiere hat die Firma EPO Berlin-Buch GmbH NSG-Mäuse verwendet. Die Tiere wurden in eine Kontrollgruppe und in sechs Verumgruppen eingeteilt. Bei der Kontrollgruppe A handelte es sich um Mäuse, die als Puffersubstanz das 2-HP- β -CD verabreicht bekommen haben. Die Gruppen B, C und D erhielten jeweils 80 mg OA je kg Körpergewicht, die TT-Extrakt-Charge 161 wurde verwendet. Die Dosis wurde intravenös verabreicht und der Versuch wurde nach 30 (Gruppe B), 60 (C) und 120 Minuten (D) durch die Gewinnung des kompletten Serums beendet. Ebenfalls wurde ein Kombinationsversuch ViscumTT durchgeführt, das heißt, es wurde sowohl ML als auch OA verabreicht (Viscum- und TT-Extrakt-Charge 161). Die Tiere der Gruppe E, F und G bekamen die gleiche Dosis an OA, wie die anderen drei Gruppen, und zusätzlich eine ML-Dosis von 6 μ g je kg Körpergewicht. Der Versuch wurde ebenfalls nach 30 (E), 60 (F) oder 120 Minuten (G) beendet (Tab. 44).

Für die Berechnung der initialen ML- und OA-Konzentrationen im Blut wurde ein mittleres Blutvolumen von 67,5 mL pro kg Körpergewicht angenommen.

Tab. 44: Daten des *In-vivo*-Modells (Mono- und Kombinationsversuch mit *Viscum*- und TT-Extrakt-Charge 161)

Gruppe	Tier	m [g]	ML [ng]	ML (initial) [ng/ml]	OA [mg]	OA (initial) [mg/ml]
Kontrolle (A)	A1	24,1				
	A2	25,42	-	-	-	-
	A3	25,96				
30 min (B)	B1	27,86			2,23	
	B2	25,94	-	-	2,08	1,2
	B3	26,06			2,08	
60 min (C)	C1	25,74			2,06	
	C2	24,85	-	-	1,99	1,2
	C3	25,08			2,01	
120 min (D)	D1	24,74			1,98	
	D2	24,31	-	-	1,94	1,2
	D3	22,74			1,82	
30 min (E)	E1	22,69	136,14		1,82	
	E2	25,52	153,12	88,9	2,04	1,2
	E3	25,7	154,2		2,06	
60 min (F)	F1	25,73	154,38		2,06	
	F2	21,75	130,5	88,9	1,74	1,2
	F3	24,2	145,2		1,94	
120 min (G)	G1	24,7	148,2		1,98	
	G2	24,46	146,76	88,9	1,96	1,2
	G3	23,43	140,58		1,87	

Die NSG-Mäuse der Verumgruppen erhielten eine intravenöse Injektion von 6 µg ML und 80 mg OA je kg Körpergewicht, dabei wurde die *Viscum*-, TT-Extrakt-Charge 161 und die Kombination beider verwendet. Die Kontrollmäuse erhielten 2-HP-β-CD einmalig. Die ML- und TT-Dosierung wurde dem Gewicht des Tieres angepasst. Bei einem durchschnittlichen Blutvolumen von 67,5 mL je kg Körpergewicht ergaben sich folgende initial berechnete ML- und OA-Konzentrationen im Blut. Die Inkubation erfolgte 30, 60 und 120 Minuten lang (n = 3).

3.8.5.1 Mono-Versuch (TT-Extrakt)

Die Bestimmung der durchschnittlichen *In-vivo*-OA-Konzentration nach dem Mono-Versuch erfolgte durch Dreifachmessung der jeweiligen derivatisierten Seren mittels GC / FID-Methode (Tab. 45).

Im durchgeführten Tierexperiment konnte in jeder Verumgruppe eine OA-Konzentration bestimmt werden. In der Kontrollgruppe dagegen, in der die Mäuse das 2-HP-β-CD verabreicht bekommen haben, konnte keine OA nachgewiesen werden. Für jede Inkubationszeit wurden drei Tiere verwendet (n = 3) und bei der Verumgruppe B (30 Minuten) konnte eine Maus (B2) als Ausreißer identifiziert werden, deren ermittelter Wert stark von den anderen zwei abwich. Dieses Tier wurde dementsprechend nicht in die Gruppenbestimmung miteinbezogen. Innerhalb von 120 Minuten war eine Abnahme der OA-Konzentration im Serum erkennbar, wobei der größte Anteil bereits innerhalb der ersten 30 Minuten eliminiert wurde.

Tab. 45: Ermittelte OA-Konzentration im *In-vivo*-Modell (Mono-Versuch)

Gruppe	Tier	OA (initial) [mg/mL]	OA (Serum) [µg/mL]	Serum-OA- Anteil [%]	Serum-OA- Anteil pro Gruppe [%]
Kontrolle (A)	A1		< LOQ	-	
	A2	0,0	< LOQ	-	-
	A3		< LOQ	-	
30 min (B)	B1		30,7 ± 2,3	2,6 ± 0,2	
	B2	1,2	8,9 ± 1,7	0,7 ± 0,1	2,5 ± 0,1
	B3		29,2 ± 4,1	2,4 ± 0,3	
60 min (C)	C1		13,6 ± 2,5	1,1 ± 0,2	
	C2	1,2	7,9 ± 0,1	0,7 ± 0,1	1,1 ± 0,4
	C3		16,4 ± 3,3	1,4 ± 0,3	
120 min (D)	D1		1,5 ± 0,2	0,1 ± 0,0	
	D2	1,2	1,9 ± 0,6	0,2 ± 0,0	0,2 ± 0,1
	D3		3,4 ± 0,3	0,3 ± 0,0	

Den NSG-Mäusen wurde 80 mg OA je kg Körpergewicht gespritzt, die Kontrollmäuse bekamen 2-HP-β-CD verabreicht und nach 30, 60 und 120 Minuten wurde von allen Tieren das Serum gewonnen (n = 3). Die initiale OA-Konzentration wurde rechnerisch ermittelt. Die OA-Serum-Konzentration ± Standardabweichung wurde über eine Dreifachmessung mittels GC / FID-Methode im Serum bestimmt. Die Werte der Kontrollen waren unter der Bestimmungsgrenze (LOQ). Die OA-Serum-Konzentration von Tier B2 wurde als Ausreißer identifiziert und in den prozentualen Serum-OA-Anteil der Gruppe nicht miteinbezogen.

3.8.5.2 Kombinationsversuch (ViscumTT-Extrakt)

Die Mauseren des Kombinationsversuches konnten ebenfalls dreifach mittels GC / FID-Methode hinsichtlich der OA-Konzentration analysiert werden (Tab. 46).

In jeder Behandlungsgruppe konnte eine OA-Konzentration im Serum detektiert werden. Die Kontrollgruppe (A) wurde bereits beim Mono-Versuch beschrieben (3.8.5.1), da beide Versuche parallel verliefen, war keine zweite Kontrollgruppe notwendig. Für jede Inkubationszeit und Dosierung wurden gleichermaßen drei Tiere verwendet (n = 3). Bei der Verumgruppe E (30 Minuten) konnte eine Maus (E3) als Ausreißer identifiziert werden, deren ermittelter Wert stark von den anderen zwei abwich. Dieses Tier wurde dementsprechend nicht in die Gruppenbestimmung miteinbezogen. Der OA-Anteil im Serum war sehr gering und unterschied sich nicht signifikant von den Ergebnissen des Mono-Versuchs. Eine tendenzielle Abnahme über den beobachteten Zeitraum konnte nicht festgestellt werden. Eine rasche Eliminierung der OA erfolgte im Organismus bereits in den ersten 30 Minuten.

Tab. 46: Ermittelte OA-Konzentration im *In-vivo*-Modell (Kombinationsversuch)

Gruppe	Tier	OA (initial) [mg/mL]	OA (Serum) [µg/mL]	Serum-OA- Anteil [%]	Serum-OA- Anteil pro Gruppe [%]
30 min (E)	E1		3,9 ± 0,9	0,3 ± 0,1	
	E2	0,0	4,1 ± 0,0	0,3 ± 0,0	0,3 ± 0,0
	E3		54,8 ± 4,2	4,6 ± 0,4	

Gruppe	Tier	OA (initial) [mg/mL]	OA (Serum) [µg/mL]	Serum-OA- Anteil [%]	Serum-OA- Anteil pro Gruppe [%]
60 min (F)	F1		15,4 ± 0,5	1,3 ± 0,0	
	F2	1,2	36,1 ± 1,2	3,0 ± 0,1	2,0 ± 0,9
	F3		21,0 ± 1,6	1,8 ± 0,1	
120 min (G)	G1		9,9 ± 0,2	0,8 ± 0,0	
	G2	1,2	12,1 ± 0,3	1,0 ± 0,0	0,9 ± 0,1
	G3		10,7 ± 2,1	0,9 ± 0,2	

Den NSG-Mäusen wurde 80 mg OA je kg Körpergewicht und zusätzlich 6 µg ML je kg Körpergewicht gespritzt. Die Kontrollmäuse bekamen das 2-HP-β-CD verabreicht. Nach 30, 60 und 120 Minuten wurde das Serum gewonnen (n = 3). Die initiale OA-Konzentration wurde rechnerisch ermittelt. Die OA-Serum-Konzentration ± Standardabweichung wurde über eine Dreifachmessung mittels GC / FID-Methode im Serum bestimmt. Die OA-Serum-Konzentration von Tier E3 wurde als Ausreißer identifiziert und in den prozentualen Serum-OA-Anteil der Gruppe nicht miteinbezogen.

In Abbildung 74 ist ein Chromatogrammausschnitt der Serumprobe des Tiers F3 mit Zuordnung des OA-Peaks dargestellt.

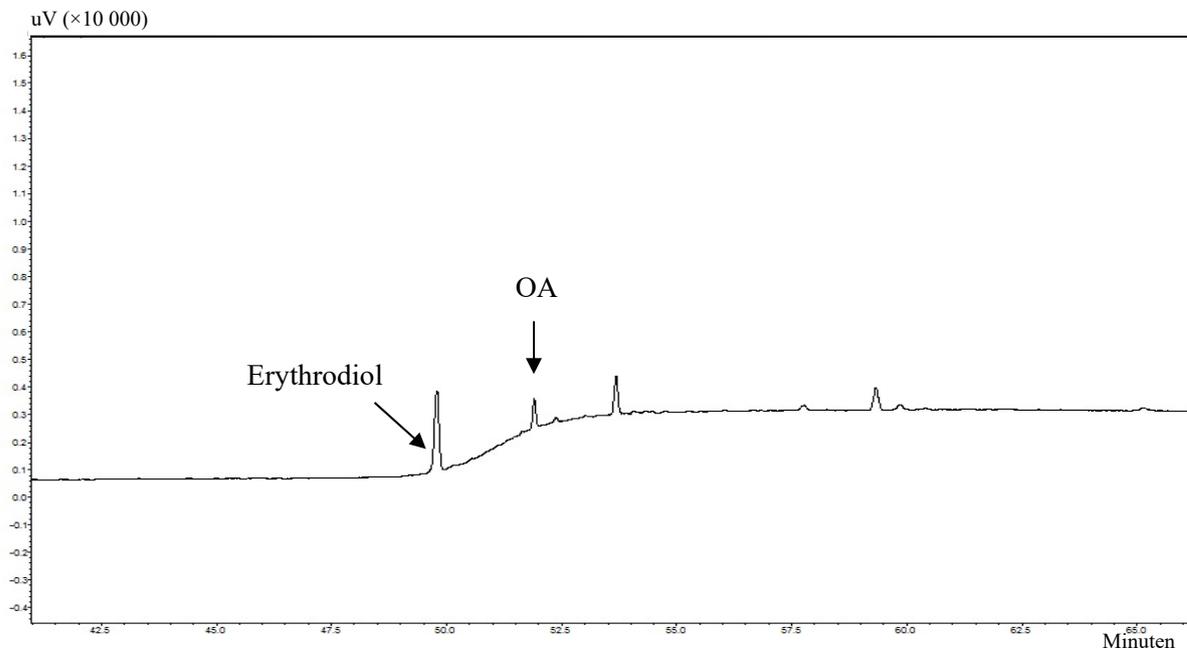


Abb. 74: GC / FID-Chromatogrammausschnitt der Serumprobe des Tiers F3 mit zugesetztem 6,1 µg/mL Erythrodiol
5 µL von der Serumprobe des Tiers F3, der 6,1 µg/mL Erythrodiol zugesetzt wurde, wurden mit einer Split-Ratio von 20:1 eingespritzt.

4 Diskussion

Mistel-Präparate werden gegenwärtig in der komplementären Krebstherapie ohne Beachtung klassischer pharmakokinetischer Kenngrößen angewendet. Um überhaupt eine Dosis-Wirkungs-Beziehung in der Therapie aufstellen zu können, ist die Analytik des MLs sowohl in den Ausgangslösungen als auch in einer biologischen Matrix notwendig und wurde in Rahmen dieser Arbeit durchgeführt. Die matrixbezogene Analytik von TT-Säuren, die auch in der Mistel vorhanden sind, schloss sich ebenfalls an. Eine Kombination der TT mit den hydrophilen Mistelbestandteilen könnte eine Bereicherung für die adjuvante Tumortherapie sein. Um die Einflüsse der TT auf die Wirkung des MLs zu beurteilen und um einen möglichen Synergismus festzustellen, wurden sowohl Aufnahmestudien durch vier verschiedene Zelllinien als auch Zytotoxizitätsuntersuchungen an der Osteosarkomzelllinie 143B durchgeführt.

4.1 Mistellektin-Quantifizierung mittels ELISA

Um ML zu quantifizieren, wurde im Rahmen dieser Arbeit zwei ELISA-Methoden A- und A-B-Ketten-ELISA etabliert. Es konnte festgestellt werden, dass der A-B-Ketten-ELISA lediglich zur Analyse von wässrigen Extrakten und Fertigarzneimitteln im Ursprungszustand geeignet ist. Eine Untersuchung in der biologischen Matrix war mit einer stark erhöhten LOD und LOQ verbunden, sodass der Einsatz im Zell- oder Tiermodell eine zu hohe Initialgabe fordert. Des Weiteren ergab der A-B-Ketten-ELISA eine hohe Inter- und Intraassay-Variabilität von $< 20\%$ (Kapitel 3.1). Diese Schwankungen sind vermutlich durch den Einsatz des Glykoproteins ASF aus fötalen Kälberserum zu begründen. Die bessere Variabilität beim A-Ketten-ELISA ($< 10\%$) (Kapitel 3.1) ist im Gegensatz dazu darauf zurückzuführen, dass zum Binden der A-Kette des MLs ein monoklonaler Maus-Antikörper 5F5 (Immunglobulin G I) benutzt wurde, der spezifisch auf ML-I–III reagiert. Eine separate Quantifizierung des MLs-I war jedoch nicht möglich, da der Antikörper eine gewisse Kreuzreaktivität hinsichtlich der beiden anderen Lektinarten besitzt (Jaeggy et al., 1995). Da es sich um einen Antikörper der Maus handelt, konnten bei der Untersuchung in Seren von nicht immunsupprimierten Mäusen (keine NSG-Mäuse) ebenfalls starke Kreuzreaktivitäten beobachtet werden, sodass die Erstellung einer Kalibrierung für den Tierversuch ebenfalls mit Serum von NSG-Mäusen erfolgen musste. Kreuzreaktionen im FBS-haltigem Medium konnten nicht festgestellt werden. Aufgrund dessen, dass die ML-Konzentration in verschiedenen Systemen (wässrig, FBS-haltig, Serum) bestimmt wurde, war es notwendig, für jede Grundlage eine Bestimmungs- und Nachweisgrenze zu ermitteln (siehe Kapitel 3.1.3). Bei der Untersuchung des Ricins, ebenfalls ein

RIP Typ-II, konnte die Matrix-Abhängigkeit von LOD und LOQ mithilfe eines ELISAs bereits festgestellt werden (He et al., 2012). In dieser Arbeit konnte in jedem Milieu der ML-Gehalt ermittelt werden. Trotz der Komplexität der biologischen Matrix konnte aufgrund der Verwendung von NSG-Mäusen eine relativ niedrige LOD und LOQ im Serum bestimmt werden.

4.1.1 Mistellektin-Gehalt verschiedener Fertigarzneimittel und Extrakte der Birken AG

Mithilfe der zwei etablierten ELISA-Methoden (A- und A-B-Ketten-ELISA) konnte die ML-Konzentration von vierzehn verschiedenen Arzneimitteln bestimmt werden. Es handelte sich dabei um die gängigsten Präparate der vier führenden Arzneimittelfirmen im Bereich der Misteltherapie. Je nach Wirtsbaum bzw. Hersteller konnten starke Unterschiede im ML-Gehalt festgestellt werden. Bei dem Präparat AbnobaViscum® Fraxini konnte die höchste ML-Konzentration sowohl im A- als auch im A-B-Ketten-ELISA von $15,29 \pm 2,61 \mu\text{g/mL}$ und $12,98 \pm 1,52 \mu\text{g/mL}$ in der Ampulle ermittelt werden (Tab. 19). Bei der Betrachtung der Wirtsbäume konnte die Kiefer (Pinus) als der Wirtsbaum, der mit dem geringsten ML-Gehalt korreliert, identifiziert werden. Betrachtet man die ML-Konzentration bei den Abietis-Präparaten, scheint der Herstellungsprozess einen großen Einfluss auf die Ausbeute zu haben. Bei gleicher Menge von 20 mg Extrakt konnte bei dem AbnobaViscum®-Präparat eine ML-Konzentration von $1,09 \pm 0,14 \mu\text{g/mL}$ ermittelt werden im Gegensatz zu $0,01 \pm 0,003 \mu\text{g/mL}$ bei dem Iscador®-Präparat (A-Ketten-ELISA). Der Unterschied könnte im Herstellungsprozess, wie im Kapitel 1.1.2.4 bereits beschrieben, begründet liegen. Die AbnobaViscum®-Präparate werden in einem speziellen Pressverfahren im wässrigen Milieu hergestellt. Die Iscador®-Präparate sind dagegen wässrige Extrakte, die zusätzlich durch misteleigene kultivierte Milchsäurebakterien fermentiert werden. Durch den modifizierten A-B-Ketten-ELISA konnte mithilfe des Glykoproteins ASF die B-Kette des MLs im Experiment gebunden werden und anschließend in einem „Sandwich-Komplex“ mit dem A-Ketten-spezifischen Antikörper ML-5H8, der mit der Peroxidase markiert ist, die A-Kette detektiert werden. Eine Bestimmung des intakten MLs war durch diese Methode möglich. Bei dem A-Ketten-ELISA dagegen wurde im ersten Schritt die A-Kette mithilfe des Antikörpers ML-5F5 gefangen und abschließend wurde die A-Kette durch den, mit der Peroxidase markierten, Antikörper ML-5H8 detektiert. Das Vorhandensein einer B-Kette war dementsprechend für die Quantifizierung nicht notwendig. Bei der Betrachtung der Wirkungsweise des MLs als RIP Typ-II, das durch die Bindung der B-Kette an Rezeptoren der Zelloberfläche, vor allem D-Galaktose-Strukturen (Franz et al., 1981, Ziska et al., 1981, Franz, 1986, Mengers et al., 2002, Muething et al., 2002, Muething et al., 2004), von der Zelle endozytiert wird und schließlich mittels der A-Kette in der Zelle eine N-Glykosidase-Aktivität auf die Ribosomen ausübt (Van Damme et al., 2001, Polito et al., 2009, de Virgilio et al.,

2010), wird deutlich, dass ein Effekt auf die Zellen ausschließlich durch ein intaktes ML erzielt werden kann (Vervecken et al., 2000). Im Idealfall sollte dementsprechend für die höchst mögliche Wirksamkeit des wässrigen Mistelextraktes das Verhältnis der ML-Gehalte zwischen A–B- und A-Ketten-ELISA-Bestimmung eins betragen (wie zum Beispiel beim Iscador® Abietis 20 mg-Präparat). Durch die Anwendung beider ELISA-Methoden konnte bestätigt werden, dass der Zusatz der misteleigenen Milchsäurebakterien in den Iscador®-Präparaten die Stabilität des MLs erhöht (größerer Anteil an intaktem ML). Bei den Arzneimitteln von Iscucin® konnte ebenfalls ein hohes Verhältnis von mehr als 0,82 (A–B-Ketten-ELISA zu A-Ketten-ELISA) bestimmt werden. Da sich die Firma jedoch nicht zum genauen Herstellungsprozess äußerte, können bloß Vermutungen über spezielle Zusätze aufgestellt werden. Gemessen wurden jedoch ausschließlich die Präparate mit der höchsten ML-Konzentration, d.h. die in der Stärke H vorlagen. Durch die Anwendung beider ELISA-Methoden konnte zusätzlich die Koexistenz von frei vorliegender A-Kette bestätigt werden, was durch eine Selbstspaltung des Moleküls durch intramolekular auftretende Thiol-Disulfidaustausch-Reaktionen im Molekül möglich ist (Pfueller et al., 2007, Pfueller et al., 2009). Bei den Präparaten von Helixor® zeigte sich tendenziell das größte Vorkommen freier A-Ketten. Da keine detaillierte Beschreibung des Herstellungsverfahrens vorliegt, scheint vermutlich die Einwirkung größerer Temperaturen oder die Minderung von Stabilisatoren die Zerstörung des MLs vorangetrieben zu haben.

Abschließend ist festzuhalten, dass die Werte an ML stark schwankend sind und sowohl vom Wirtsbaum als auch von dem Herstellungsprozess abhängig sind. Die Wahl des Präparates erfolgt ausschließlich aufgrund des Wirtsbaums und nicht nach dem ermittelten ML-Gehalt (AbnobaGmbH, 2008). Eine „schulmedizinische“ Anwendung dieser Fertigarzneimittel, d.h. eine dosisangepasste Therapie, ist dementsprechend nicht möglich.

Bei der ML-Konzentrationsbestimmung verschiedener Extraktpräparationen der Firma Birken AG, die auch im Rahmen dieser Arbeit verwendet wurden, konnten Verhältnisse zwischen A–B- und A-Ketten-ELISA von 0,58 bis 0,71 ermittelt werden. Alle Chargen enthielten einen relativ konstanten ML-Gehalt ($0,62 \pm 0,05 \mu\text{g/mL}$ – $2,50 \pm 0,10 \mu\text{g/mL}$), der verglichen mit den anderen untersuchten Fertigarzneimitteln, im mittleren Konzentrationsbereich der wässrigen Apfelmistel lag. Eine Überlegenheit des Herstellungsprozesses gegenüber den anderen, auf dem Markt befindlichen Präparaten, die sich etwa durch einen erhöhten ML-Gehalt oder ein erhöhtes Verhältnis der Konzentrationen nach A–B- und A-Ketten-ELISA ausdrücken würde, konnte nicht belegt werden.

4.1.2 Mistellektin-Quantifizierung *ex vivo*

Ein deutlicher Unterschied im ermittelten ML-Gehalt konnte zwischen den im Vollblut inkubierten und im Serum inkubierten Proben festgestellt werden: Erfolgte die Inkubation im Vollblut, war der bestimmte ML-Gehalt signifikant niedriger.

Eine Bindung und eine Aufnahme des MLs durch die Blutzellen (Franz et al., 1981, Ziska et al., 1981, Franz, 1986, Buessing et al., 1999, Mikeska et al., 2005) wird durch diese Beobachtung untermauert. Die konstant bleibenden Wiederfindungsraten im Serum über einen Beobachtungszeitraum von 120 Minuten (Tab. 21) zeigen wiederum, dass im Serum selbst keine Prozesse stattfanden, die den ML-Gehalt verändern.

4.1.3 Mistellektin-Quantifizierung *in vivo*

Im Rahmen dieser Arbeit erfolgte eine ML-Quantifizierung *in vivo*, dazu wurde ML NSG-Mäusen injiziert und das gewonnene Serum bestimmt. Den Mäusen wurde die Viscum-Extrakt-Charge 161 einzeln und in Kombination mit der TT-Extrakt-Charge 161 verabreicht. Es handelte sich um eine kleine Studie, die die ML-Aufnahme innerhalb der ersten 120 Minuten nach der Substanzzugabe zum Gegenstand hatte. Die Quantifizierung erfolgte mithilfe des A-Ketten-ELISAs, da die Bestimmung des intakten MLs mit dem A-B-Ketten-ELISA aufgrund der vorhandenen Interaktionen des MLs mit den Serumbestandteilen und vor allem mit Galaktose-Strukturen (Ribereau-Gayon et al., 1995, Ledesma-Osuna et al., 2008) in diesem unteren Konzentrationsbereich nicht möglich war. Durch diese Wechselwirkungen kam es zum Abfall des Signals (der Absorption) und die Bestimmungsgrenze stieg an (Adler et al., 2003).

Trotz intravenöser Applikation konnte lediglich ein geringer Anteil des MLs im Serum quantifiziert werden. Im Vergleich zur kombinierten Gabe der ViscumTT-Extrakt-Charge 161 konnte weniger ML bei der reinen Viscum-Gabe im Serum bestimmt werden. Dies könnte daran liegen, dass Bindungsstellen im Blut durch die TT-Säuren blockiert werden könnten, denn TT-Säuren, vor allem OA, bindet nach intravenöser Applikation sehr stark an Plasmaproteine (Ying et al., 1991, Udeani et al., 1999, Jeong et al., 2007). Die geringe Serum-ML-Konzentration sowohl im Mono- als auch im Kombinationsversuch bestätigte einen schnellen Abtransport des MLs, der durch Bindung an Galaktose-Strukturen von Zellen im Blut ermöglicht werden könnte, was eine schnelle Aufnahme des MLs in die Zellen zur Folge hätte (Moisenovich et al., 2002). Eine zuvor bestimmte Halbwertszeit von intravenös verabreichtem rekombinantem Viscumin von dreizehn Minuten im Mausmodell bestätigte diese Vermutung ebenfalls (Schoeffski et al., 2004).

Eine Analyse weiterer Serumproben nach längerer Inkubationszeit, z. B. während einer Langzeittherapie über 4 Wochen, ist mit dem A-Ketten-ELISA nicht möglich, wenn davon

auszugehen ist, dass die ML-Serum-Konzentration unter 500 pg absinken sollte. Die Analyse in diesem Bereich (selbst unter 1 pg/mL) ist bisher bei dem rekombinanten ML mithilfe einer kombinierten Immuno-PCR gelungen, einem Verfahren, das eine antikörperspezifische Erkennung mit der Polymerase-Kettenreaktion kombiniert und schließlich durch einen fluorogenen ELOSA (Enzyme linked oligosorbent assay) quantifiziert wird (Adler et al., 2003, Schoeffski et al., 2004).

4.2 Liposomen

Im Rahmen dieser Arbeit wurde eine zweite Formulierungsart sowohl des MLs als auch der TT-Säuren in Form von Liposomen untersucht. Liposomen besitzen viele Vorteile gegenüber frei vorliegenden Arzneistoffen, unter anderem soll die Bioverfügbarkeit und die Selektivität erhöht und dadurch die unspezifische Toxizität reduziert werden. Ein weiterer Vorteil der Liposomen ist ihre biologische Degradierbarkeit, die eine unproblematische Anwendung aufgrund der nicht vorhandenen Toxizität gewährleistet. Durch den Zusatz von 2-HP- β -CD konnte bereits eine Möglichkeit der Solubilisation von TT-Säuren erreicht werden (Strueh et al., 2012), jedoch ist der Einsatz des 2-HP- β -CDs nicht das Mittel der Wahl (Strickley, 2004). Als Alternative wurde somit die Liposomen-Formulierung als Vehikel für die Lösungsvermittlung der TT-Säuren verwendet. Da sich die TT-Säuren aufgrund ihrer Lipophilie nicht in den kommerziell erhältlichen Extrakten befinden, muss zuerst eine separate Extraktion erfolgen. Die Endanwendung sollte jedoch gemeinsam mit der wässrigen Fraktion erfolgen. Bei der Verpackung als Liposomen ist dies möglich, da sie sich aufgrund ihrer lipophilen Struktur in die Phospholipid-Doppelschicht einlagern können (Soica et al., 2014), das Triterpen Actein wurde bereits dadurch erfolgreich im Zellversuch getestet (Einbond et al., 2013). Die OA wurde ebenfalls schon erfolgreich in Liposomen verkapselt und sowohl *in vitro* als auch *in vivo* eingesetzt (Zhang et al., 2012, Bao et al., 2015, Man et al., 2015).

Bei der Verwendung von PC konnte in dieser Arbeit ebenfalls die Einlagerung von TT bestätigt werden. Bei einem ersten Screening der möglichen TT-Konzentration (berechnet als OA) konnte jedoch festgestellt werden, dass eine Konzentration von 640 μ g/mL OA sich nicht mehr in die Membran der Liposomen mit 2 mg PC integrieren ließ. Ein komplett inhomogenes Zetapotential ($-7,88 \pm 6,67$ mV) wurde gemessen und es wurde keine OA-Konzentration in der Liposomenlösung bestimmt (Kapitel 3.3.1.1 und 3.3.2.1). Die eingesetzte Menge an TT war zu hoch für die verwendete Lipidmenge, was zur Folge hatte, dass das PC keine stabile Phospholipid-Doppelschicht ausbilden konnte und es zu keiner spontanen Zusammenlagerung zu sphärischen Vesikeln kam. Die verwendeten OA-Konzentrationen von 5, 10 und 20 μ g/mL ergaben dagegen stabile Liposomen mit einem Zetapotential von ungefähr $-3,8$ mV, jedoch war die Einschlusseffizienz der OA sehr gering, sodass kein OA-Gehalt ermittelt werden konnte. Eine Nanosuspension ist umso stabiler, je höher bzw. je niedriger das Zetapotential ist. Ein guter Wert für kommerziell verwendete Nanopartikel liegt

unter -25 mV oder über $+25$ mV (nanoComposix, 2012). Im Bereich der Forschung sind jedoch auch Werte unter bzw. über 6 mV ermittelt worden, die bis zu einem Zeitraum von mindestens drei Wochen stabil sind (Zhang et al., 2012, Bao et al., 2015, Grimm, 2016). Bei den eingesetzten TT-Konzentrationen von 40 , 80 , 160 und 320 $\mu\text{g/mL}$ OA konnte sowohl ein konstantes Zetapotential, eine Partikelgröße kleiner als 140 nm und ein hinreichender Gehalt an OA bestimmt werden. Die relativ niedrige Verkapselungseffizienz (Kapitel 3.3.2.1) im Vergleich zu anderen Veröffentlichungen bei sonst gleicher Hüllsubstanz konnte jedoch nicht geklärt werden (Zhang et al., 2012, Bao et al., 2015, Man et al., 2015). In diesen Arbeiten, die jeweils auch die Ultraschallung zur Liposomenherstellung anwendeten, konnten je nach verwendeter Hüllsubstanz Werte von über 80 % Verkapselungseffizienz erzielt werden.

Bei der erneuten Herstellung von Liposomen im Hinblick auf mögliche Zellversuche wurde sich auf eine OA-Konzentration von 160 $\mu\text{g/mL}$ und 2 mg PC einer neuen PC-Lösung beschränkt. Im Kapitel 3.3.1.1 und 3.3.2.1 sind die jeweils neu gemessenen Partikelgrößen, Zetapotentiale und Verkapselungseffizienzen dargestellt. Ein deutlich größeres Zetapotential von $-11,22 \pm 0,40$ mV zeigt eine deutlich erhöhte Stabilität der Liposomen bei geringer Partikelgröße von $91,15 \pm 19,54$ nm. Die neu ermittelte, zufriedenstellende Verkapselungseffizienz von $100,1 \pm 5,3$ % entspricht den Werten in vergleichbaren Arbeiten (Zhang et al., 2012, Bao et al., 2015, Man et al., 2015). Die Verwendung von frisch gelöstem PC ist demnach essentiell für die Herstellung von Liposomen aus PC. Des Weiteren konnte eine bessere Filmbildung und eine höhere Filtrationsleistung während der Durchführung beobachtet werden.

Bei der Verkapselung des MLs im inneren, wässrigen Milieu der Liposomen (Manojlovic et al., 2008, Bunjes, 2009, Soga et al., 2014) konnte im Gegensatz zu dem TT-Säuren-Einschluss beim ersten Screening eine relativ konstante Verkapselungseffizienz von $4 \pm 0,9$ % ermittelt werden. Zum Vergleich konnte bei der Verkapselung von einem RIP Typ-I (Dianthin-30) (Grimm, 2016) mit der gleichen Methode eine Einschlusseffizienz von $18,7 \pm 1,6$ % ermittelt werden. Die Verkapselung von ML-I wurde im Jahr 2008 publiziert, bei dieser Herstellung von ML-Liposomen wurde ebenfalls die Filmmethode angewendet, die jedoch vor der Extrusion mit verschiedenen Frier-Tau-Zyklen kombiniert wurde (Manojlovic et al., 2008). Die höchste Einschlusseffizienz von $3,11 \pm 0,45$ % konnte dabei mit dem Lipidgemisch aus 1,2-Dioleoyl-sn-glycero-3-phosphatidylcholin (DOPC), Cholesterol und 1,2-Dipalmitoyl-sn-glycero-3-phosphatidylcholin (DPPC) im Verhältnis von 40:30:30 bei dem Einsatz einer ML-Ursprungskonzentration von 50 $\mu\text{g/mL}$ erreicht werden. Die beschriebenen Liposomen haben zwar eine niedrigere Verkapselungseffizienz und einen größeren Partikeldurchmesser von $146,2 \pm 3,5$ nm, jedoch ist die Größenverteilung homogener als bei den in dieser Arbeit für die Zellversuche verwendeten ML-Liposomen 520 $\mu\text{g/mL}$. Dies zeigt sich im geringen PDI von $0,12 \pm 0,2$ (Manojlovic et al., 2008). Für die in den Zellversuchen verwendeten Liposomen dieser Arbeit, ohne Anwendung mehrerer Frier-Tau-Zyklen, wurde ein PDI von $0,26 \pm 0,00$ bei einer Größe von $112,10 \pm 1,84$ nm ermittelt.

Im Vergleich mit einer weiteren Arbeit, in der ML-Liposomen mittels analogem Herstellungsverfahren (Filmmethode und Extrusion) erzeugt wurden, konnte im Rahmen dieser Arbeit eine deutlich höhere ML-Einschlusseffizienz ($4 \pm 0,9 \%$ statt $0,3 \pm 0,5 \%$) erreicht werden (Bunjes, 2009). Die höhere Verkapselungsrate könnte ein Resultat der längeren Rotation sein, da sowohl die Trocknung des Films als auch das Resuspendieren und das Bilden der Liposomen unregelmäßiger Größe über einen deutlich längeren Zeitraum von insgesamt sieben Stunden durchgeführt wurde.

Zusätzlich zeigte sich eine Adsorption des MLs an die Liposomen. Bei den ML-Liposomen 130 und 260 $\mu\text{g}/\text{mL}$ wurde mehr ML adsorbiert als eingeschlossen, bei den anderen hergestellten ML-Liposomen konnte eine minimal größere Verkapselung erreicht werden.

Eine simultane Verkapselung von TT und ML in denselben Liposomen wurde nicht durchgeführt, experimentell wäre dies jedoch machbar. Da allerdings aufgrund der einzusetzenden Konzentrationen in den anschließenden Zellversuchen eine gemeinsame Anwendung nicht sinnvoll erscheint, wurde auf die Herstellung von kombinierten Liposomen verzichtet. Die ML-Liposomen müssten in einem größeren Umfang verdünnt werden als die TT-Liposomen. Des Weiteren ist eine vorherige Reduktion der ML-Konzentration zwar möglich, jedoch kann aufgrund der geringen und schwankenden Verkapselungseffizienz auf keine Konzentration genau eingestellt werden, welches ebenfalls eine gemeinsame Endverdünnung erschwert.

4.3 Mistellektinaufnahme

4.3.1 Mistellektin-Standard, Viscum-Extrakte mit und ohne Triterpen-Extrakte

Mithilfe der durchflusszytometrischen Messungen konnte die Viabilität der Zellen nach erfolgter Inkubation mit dem ML-Standard und den Viscum-Extrakten einzeln und in Kombination (ML+TT und ViscumTT) analog zu den Aufnahmestudien bestimmt werden und bestätigte den Einsatz der gewählten Konzentrationen. Für die Aufnahmestudien musste eine ML-Konzentration gewählt werden, die sowohl mit dem A-Ketten-ELISA quantifiziert werden konnte als auch tolerabel für die Tumorzellen war. Da in den durchgeführten Experimenten keine erhebliche Reduktion der Zellviabilität durch den Einsatz der untersuchten Substanzen festgestellt worden war (Abb. 12, Abb. 14, Abb. 15, Abb. 16), war die anschließende intrazelluläre ML-Konzentration in den ausgewählten Tumorzelllinien das Ergebnis einer Aufnahme durch intakte Zellen und nicht von apoptotischen Zellen, in die aufgrund ihrer löchrigen Membran das ML eindringen konnte. Bei den Leukämie-Zelllinien konnte lediglich tendenziell eine höhere Toleranz gegenüber den eingesetzten Stoffen mit

einer durchschnittlichen Viabilität von $98,7 \pm 13,5$ % im Gegensatz zu $90,7 \pm 7,4$ % bei den Sarkomzelllinien beobachtet werden, jedoch waren die Viabilitäten nicht signifikant verschieden. Der geringere Wert für die 143B- und TC-71-Zelllinie könnte ein Indiz für ein gesteigertes Ansprechen auf das ML sein und könnte zu einer höheren Toxizität über einen längeren Zeitpunkt mit dieser ML-Konzentration führen. Bei der TC-71-Zelllinie konnte die Kombination ViscumTT bereits nach 30 Minuten ein signifikantes Absinken der Zellviabilität hervorrufen, bei der 143B-Zelllinie wurde das erst nach einer Inkubation von 60 Minuten beobachtet. Die niedrigste Viabilität von $72,6 \pm 1,5$ % wurde bei den TC-71-Zellen nach 120-minütiger Inkubation bestimmt (Abb. 15) und wurde für die anschließenden Aufnahmeexperimente als tolerabel deklariert, um vergleichende Betrachtungen zwischen den Zelllinien durchführen zu können.

Bei den Aufnahmestudien konnte festgestellt werden, dass die ML-Aufnahme aus den Viscum-Extrakten durch die THP-1-, HL-60- und TC-71-Zellen größer war als die Aufnahme des isolierten ML-Standards (Tab. 33, Tab. 34, Abb. 22). Diese Beobachtung begründet die Hypothese, dass die höhere intrazelluläre ML-Konzentration aus den Viscum-Extrakten zu einer gesteigerten Zytotoxizität der Viscum-Extrakte führt (Franz et al., 1981, Edlund et al., 2000, Elsasser-Beile et al., 2000). Dies bestätigt erneut, dass die Gesamtwirkung eines Pflanzenextrakts über eine formelle Addition der Wirkungen der Einzelsubstanzen nicht möglich ist und dass die jeweiligen Komponenten miteinander interagieren können (Williamson, 2001, Wagner et al., 2009, Rather et al., 2013). Geringfügige Unterschiede im Herstellungsverfahren der Viscum-Extrakte hatten keinen Einfluss auf die ML-Aufnahme durch die kultivierten Tumorzellen und die erhaltenen Werte wurden entsprechend auf die jeweils verwendeten drei Viscum-Extrakt-Chargen gemittelt.

Der Zusatz von TT-Extrakten hatte ebenfalls keine Auswirkungen auf die ML-Aufnahme durch die Leukämie- und Ewing's Sarkom-Zelllinien (Abb. 19, Abb. 21, Abb. 22). Die Ursache dafür könnte die Vielzahl an D-Galaktose-Strukturen auf der Zellmembranoberfläche sein, die die anschließende Aufnahme des MLs entsprechend seiner Struktur mithilfe der B-Kette ermöglichen (Franz et al., 1981, Ziska et al., 1981, Franz, 1986, Mengs et al., 2002, Muething et al., 2002, Muething et al., 2004).

Bei den Experimenten mit der Osteosarkom-Zelllinie 143B konnte dagegen erst eine ML-Konzentration intrazellulär bestimmt werden, wenn die TT-Extrakte hinzugefügt wurden (ML+TT und ViscumTT – Abb. 23). Um den Einfluss von 2-HP- β -CD, der für die Solubilisierung der TT verwendet wurde (Laszczyk et al., 2006, Delebinski et al., 2012), auf die ML-Aufnahme beurteilen zu können, wurde die ML-Aufnahme aus der Viscum-Extrakt-Charge 161 und die Aufnahme des ML-Standards in Gegenwart von 2-HP- β -CD (Tab. 36) bzw. einer methanolischen TT-Extrakt-Lösung (ohne 2-HP- β -CD) untersucht (Abb. 25). Diese experimentellen Studien bestätigten das vorherige Ergebnis, dass eine ML-Aufnahme ausschließlich in Kombination mit dem TT-Extrakt möglich war. Dabei war es unerheblich, ob es sich um den mit 2-HP- β -CD solubilisierten TT-Extrakt oder um die methanolische TT-Extrakt-Lösung handelte. Die Abwesenheit von Bindungsstellen für

das ML an der Zellmembranoberfläche, vor allem das Fehlen von D-Galaktose-Strukturen (Franz et al., 1981, Ziska et al., 1981, Franz, 1986, Muething et al., 2004), stellt eine Begründung dar. Der bisherige Wissenstand ist, dass ML in gleicher Weise an Zellmembranstrukturen bindet wie andere RIP Typ-II und nach erfolgter Bindung sich eine Rezeptor-vermittelte Endozytose anschließt (Kapitel 1.1.1.1) (Sandvig et al., 1994, Pohl et al., 1998, Moisenovich et al., 2002, Tonevitsky et al., 2003). Ohne Bindung der B-Kette an die Zelloberfläche ist keine Aufnahme des MLs möglich (Vervecken et al., 2000, Bunjes, 2009). Wenn beide Extrakte kombiniert werden (ViscumTT und ML+TT), ermöglicht der TT-Extrakt eine Aufnahme des MLs, die unabhängig von Bindungsstrukturen auf der Zelloberfläche für die B-Kette ist. Aufgrund ihrer Struktur sind Triterpene in der Lage, mit Membranen zu interagieren und diese durch Einlagerungen und durch Störung ihrer Struktur zumindest kurzfristig so zu verändern, dass eine Migration des MLs in das Zytoplasma ermöglicht wird (Sairafianpour et al., 2003, Prades et al., 2011, Gilibert-Oriol et al., 2013, Broniatowski et al., 2014, Han et al., 2015, Tsuchiya, 2015). Die Experimente mit unterschiedlichen TT-Konzentrationen (berechnet als OA) zeigten eine weitgehende Konzentrationsunabhängigkeit (Abb. 24), lediglich die Anwesenheit des TT-Extraktes ermöglichte im Fall von 143B die ML-Aufnahme. Bei einer therapeutischen Anwendung in der Therapie könnte somit die TT-Konzentration niedrig gewählt werden, da TT-Säuren selbst in der Lage sind, ab einer bestimmten Konzentration Membranstrukturen komplett zu zerstören und Zellen in die Apoptose zu zwingen (Safayhi et al., 1997, Fulda et al., 2000, Urech et al., 2005, Gilibert-Oriol et al., 2013). Ein interessanter Aspekt weiterführender Forschung könnte in diesem Zuge die Untersuchung des TT-Extrakt-Einflusses auf die Zellsensitivität gegenüber klassischen Zytostatika und dem ML selbst sein. Eine Überlegung könnte dabei sein, ob eine zuvor ML-resistente Zelle durch den Zusatz eines TT-Extraktes wieder sensibel auf ML reagiert.

4.3.2 Mistellektin-Liposomen mit und ohne Triterpen-Liposomen

Um die ML-Aufnahme aus den hergestellten ML-Liposomen zu untersuchen, wurde sowohl eine Leukämie- als auch eine Osteosarkom-Zelllinie ausgewählt. Die Beobachtung der ML-Aufnahme erfolgte aufgrund der geringen Liposomenausbeute nur bei 30 und 120 Minuten. Bei der durchflusszytometrischen Untersuchung konnte bei den eingesetzten Konzentrationen an ML und an TT-Säuren keine signifikanten Unterschiede zur unbehandelten Kontrolle festgestellt werden. Bei den THP-1-Zellen konnte eine durchschnittliche Viabilität von $98,7 \pm 2,6 \%$ und bei den 143B-Zellen von $96,0 \pm 2,3 \%$ ermittelt werden. Im Vergleich zu der unverkapselten ML-Zugabe, $97,3 \pm 8,5 \%$ Viabilität bei den THP-1-Zellen und $93,7 \pm 11,1 \%$ bei den 143B-Zellen, konnten höhere Viabilitätswerte mit geringerer Streuung ermittelt werden, jedoch sind diese Unterschiede nicht signifikant. Bei der Inkubation mit den ML-Liposomen zeigte sich bei der Leukämiezelllinie

ebenfalls eine geringfügig höhere Viabilität im Vergleich zu der 143B-Zelllinie, ähnlich zu den Ergebnissen bei den unverkapselten ML-Proben. Die anscheinend bessere Verträglichkeit der Liposomen konnte bereits im Jahr 2009 bei MOLT-4-Zellen detektiert werden (Bunjes, 2009).

Hinsichtlich der ML-Aufnahme aus der Liposomen-Formulierung konnte nach 120 Minuten bei den THP-1-Zellen eine intrazelluläre ML-Konzentration von $6,9 \pm 1,0$ % bestimmt werden, die jedoch deutlich geringer ausfiel als bei der Gabe von ML-Standard ($13,5 \pm 2,9$ %) (Abb. 31). Wie bereits im Kapitel 4.3.1 beschrieben, besitzt die THP-1-Zelllinie genügend Bindungsstrukturen auf der Zelloberfläche, die das Andocken der B-Kette und die anschließende Endozytose der A-Kette ermöglichen. Ein Verpacken des MLs in Liposomen führte in diesem Fall zu keiner Verbesserung der ML-Aufnahme, da die B-Kette nicht frei vorliegt und die Bindungsmöglichkeiten an der Zellmembran dadurch nicht erkannt und genutzt werden. Die Aufnahme von ML-Liposomen läuft dementsprechend anders ab, vermutlich durch Phagozytose, und führt nicht zur gleichen intrazellulären ML-Konzentration wie bei der Endozytose des freien MLs. Bei der Kombination mit den TT-Liposomen konnte kein Unterschied zur alleinigen Gabe festgestellt werden, verglichen mit den Reinstoffen (ML+TT) wurde ebenfalls eine geringere intrazelluläre ML-Konzentration ermittelt. Die hergestellten TT-Liposomen sind bezüglich der ML-Aufnahme dementsprechend wirkungslos. Bei der Betrachtung der ML-Aufnahme durch die 143B-Zellen konnte eine Steigerung der intrazellulären ML-Konzentration bei der Anwendung von ML-Liposomen ($6,0 \pm 0,5$ %) im Gegensatz zum freien ML-Standard ($0,7 \pm 1,4$ %) erreicht werden, die ohne den Zusatz von TT erfolgte (Abb. 31). Diese erhöhte Aufnahme des MLs ist direkt auf die Maskierung als Liposomen zurückzuführen, die dann wahrscheinlich durch Phagozytose in die Zelle gelangen. Ein Verschmelzen der Liposomen mit der Zellmembran wäre aufgrund ihrer Struktur ebenfalls denkbar, ist jedoch vermutlich in diesem kurzen Beobachtungszeitraum von 120 Minuten vernachlässigbar. Innerhalb von 30 Minuten konnte mit den ML-Liposomen die gleiche ML-Aufnahme erreicht werden wie durch die Kombination aus ML-Standard und TT-Extrakt-Charge 155 (ML+TT) (Abb. 27). Nach 120 Minuten konnte anschließend jedoch beobachtet werden, dass die Kombination der Einzelstoffe sowohl den reinen ML-Liposomen als auch der Kombination mit den TT-Liposomen überlegen war und zu einer höheren ML-Konzentration in den Zellen führte.

Zwischen den untersuchten Zelllinien konnten keine gravierenden Unterschiede bezüglich der ML-Aufnahme aus den ML-Liposomen festgestellt werden (Abb. 30), dies bestätigt die Aufnahme durch Phagozytose, die unabhängig von der Beschaffenheit der Zellmembranoberfläche der jeweiligen Zellen ist und durch die Liposomenstruktur hervorgerufen wird. Eine zelltypunabhängige ML-Aufnahme von ca. 5 % konnte dementsprechend durch die ML-Liposomen erreicht werden. Die ermittelte ML-Konzentration in den Zellen war jedoch relativ niedrig, selbst ein Koppeln der Liposomenoberfläche mit der isolierten B-Kette konnte zu keiner gesteigerten Aufnahme durch MOLT4-Zellen im Vergleich zum freien ML führen (Bunjes, 2009).

4.4 Echtzeitanalyse

4.4.1 Einzelkomponenten Mistellektin-Standard, Viscum-Extrakt-Charge 155 und Triterpen-Extrakt-Charge 155

Bei der zellindex-basierten Betrachtung des Einflusses der Einzelkomponenten auf die Osteosarkom-Zelllinie 143B zeigte sich eine größere Zytotoxizität des Viscum-Extraktes im Vergleich zum ML-Standard. Mithilfe des Parameters Zellindex werden Impedanzänderungen, die durch eine sich verändernde Adhärenz der 143B-Zellen hervorgerufen werden, ausgedrückt. Durch die Untersuchung des Zellindexes können Aussagen sowohl über das Wachstum der Zellen als auch über die Toxizität der zugesetzten Substanzen getroffen werden. Die identisch eingesetzte ML-Konzentration führte bei Anwendung der Viscum-Extrakt-Charge 155 zu einem Abfall des Zellindexes, während der ML-Standard kein Absinken bewirkte (Abb. 37). Betrachtet man jedoch nur den MTT-Endpunktassay, konnte auch für jede untersuchte Konzentration des ML-Standards eine Toxizität gegenüber der Kontrolle festgestellt werden (Abb. 38), die aber im Vergleich zum Viscum-Extrakt signifikant geringer war. Die stärkere Toxizität auf die 143B-Zellen durch den Viscum-Extrakt kommt vermutlich durch die Begleitstoffe, vor allem den Viscotoxinen, zustande, da diese ebenfalls mit Zellmembranen interagieren können und so durch Membrandestabilisierung bzw. Porenbildung ML in die Zelle eingeschleust wird (Schaller et al., 1996, Caaveiro et al., 1998, Hughes et al., 2000, Winkler et al., 2008). Durch die Begleitstoffe ist dementsprechend bei längerer Inkubationszeit die ML-Aufnahme auch ohne den TT-Zusatz möglich. Für die Viscum-Extrakt-Charge 155 konnten im MTT-Assay die ML-Konzentrationen von 22, 33 und 44 ng/mL als zytotoxisch identifiziert werden (Abb. 36), was im Verlauf des normalisierten Zellindex durch einen Abfall nach acht, zehn und 18 Stunden zum Ausdruck kam (Abb. 34). Die apoptotische Wirkung der eingesetzten ML-Konzentrationen wurde bereits für die Leukämie-Zelllinie MOLT-4 und NALM-6 und für die Ewing-Sarkom-Zelllinien TC-71 und MHH-ES-1 bestätigt (Bunjtes, 2009, Delebinski et al., 2012, Twardziok, 2016), wobei ebenfalls eine höhere Konzentration an ML-Standard (Bunjtes, 2009) eingesetzt werden musste als beim Extrakt (Delebinski et al., 2012, Twardziok, 2016).

Die ermittelte Zytotoxizität des ML-Standards ist durch eine geringfügige Aufnahme des MLs mittels spontaner Vesikelbildung, ähnlich der Aufnahme von RIP Typ-I, erklärbar. Diese Zytotoxizität ist jedoch im Vergleich zum Viscum-Extrakt deutlich geringer, was durch das Fehlen von Begleitstoffen, die die Aufnahme triggern können, zustande kommen dürfte.

Die TT-Extrakt-Charge 155 zeigte bereits ab einer OA-Konzentration von 21 µg/mL einen signifikanten Unterschied zur Zellviabilität der Kontrolle im MTT-Assay. In der Betrachtung des Zellindex-Verlaufs konnte festgestellt werden, dass die OA-Konzentrationen 55 und 110 µg/mL zu einer zytotoxischen Reaktion führten und die Apoptose der 143B-Zellen auslösten (Martin et al.,

2007, Zhang et al., 2007, Yan et al., 2010, Strueh et al., 2012, Strueh et al., 2013). Die anderen untersuchten Konzentrationen führten ebenfalls zuerst zu einem Abfall des Zellindex in den ersten drei Stunden (Abb. 39), die Zellen konnten sich jedoch regenerieren und die Zellindices stiegen erneut an (Abb. 40). Diese OA-Konzentrationen zeigten somit lediglich einen zeitweiligen zytostatischen Effekt (Delebinski et al., 2012, Delebinski et al., 2015, Twardziok, 2016). Interessanterweise bewirkte jede Konzentration des TT-Extraktes ein initiales Absinken des Zellindex, bei niedrigen Konzentrationen hervorgerufen durch eine kurzfristige Interaktion mit der Zellmembran und vorübergehende Permeabilität. Diese Durchlässigkeit ist bei den geringeren Konzentrationen aufgrund möglicher Zellreparaturvorgänge reversibel. Dieser Sachverhalt wurde bereits 2013 bei anderen Triterpenen, insbesondere Triterpensaponinen (Gilabert-Oriol et al., 2013), entdeckt und spricht ebenfalls für die gesteigerte Aufnahme von ML durch die 143B-Zellen bei kombinierter Gabe mit dem TT-Extrakt (siehe Kapitel 3.5.4 und 4.3.1) aufgrund von möglichen Interaktionen mit der Zellmembran.

4.4.2 Kombinationen Mistellektin-Standard + Triterpen-Extrakt-Charge und Viscum- + Triterpen-Extrakt-Charge

Bei der kombinierten Gabe von ML-Standard mit unterschiedlichen ML-Konzentrationen und der TT-Extrakt-Charge 155 mit gleich bleibender OA-Konzentration konnte lediglich die Kombination aus 44 ng/mL ML und 14 µg/mL OA sowohl in der Echtzeitanalyse (Abb. 42) als auch im MTT-Assay (Abb. 43) als zytotoxisch identifiziert werden. Im direkten Vergleich der Einzel- und kombinierten Zugabe konnten lediglich geringfügig niedrigere Zellindices bei der Kombination beobachtet werden (Abb. 44), in der Endpunktbetrachtung war keine Differenzierung erkennbar (Abb. 45).

Bei der Kombination aus dem ML-Standard in einer gleichbleibenden ML-Konzentration von 11 ng/mL und der TT-Extrakt-Charge 155 mit einer OA-Konzentration von 14 bis 110 µg/mL zeigte sich eine Abstufung der Zellindices bezüglich der Kontrolle entsprechend den eingesetzten Konzentrationen (Abb. 46). Im MTT-Assay konnte jede Kombination als signifikant zytotoxisch nachgewiesen werden (Abb. 47). Dabei war der ML-Einfluss in der eingesetzten Konzentration von 11 ng/mL zu vernachlässigen. Lediglich die OA-Konzentration führte zu den entsprechenden Veränderungen der Zellindices.

Die Kombination der Viscum- und TT-Extrakt-Charge 155 zeigte für eine ML-Konzentration von 11 bis 44 ng/mL sowohl im Verlauf der Zellindices (Abb. 49) als auch im Endpunktassay (Abb. 50) signifikante Unterschiede zur Kontrolle. Im direkten Vergleich zur Gabe des Viscum-Extraktes allein konnte kein Unterschied im MTT-Assay festgestellt werden. Mithilfe der Echtzeitanalyse war es jedoch möglich, geringe Unterschiede beobachten zu können, die nach achtstündiger Inkubation

auftraten, und einen größeren Einfluss der Kombination ViscumTT auf die Zellen verdeutlichte (Abb. 51).

Des Weiteren konnte festgestellt werden, dass die Kombination ViscumTT der Kombination ML+TT überlegen war. Sie wirkte zytotoxischer und führte dadurch zu einem größeren Absinken der Zellindices (Abb. 53), was schließlich auch in der Bestimmung mithilfe des MTT-Assays (Abb. 54) bestätigt wurde.

Abschließend konnte jedoch keine deutlich erhöhte Zytotoxizität der Kombination gegenüber den Einzelkomponenten auf die 143B-Zellen beobachtet werden. Eine anfänglich nicht vorhandene ML-Aufnahme der 143B-Zellen (siehe Kapitel 3.5.4 und 4.3.1) muss bei längerem Inkubationszeitraum durch andere Transportmechanismen, wie spontane Vesikelbildung, und durch Effekte der Begleitstoffe aus dem wässrigen Extrakt, vor allem der Viscotoxine, ausgeglichen worden sein, um schließlich den gleichen Effekt auf die Osteosarkom-Zelllinie auslösen zu können wie die Kombinationen.

4.4.3 Mistellektin- und Triterpen-Liposomen

Bei der Betrachtung der Zellindices nach Zugabe des ML-Standards und der ML-Liposomen konnten keine Unterschiede untereinander und auch im Vergleich zur Kontrolle entdeckt werden (Abb. 55). Im anschließenden MTT-Assay konnte keine Zytotoxizität ermittelt werden. Festzuhalten ist, dass keine Differenzierung zwischen dem freien ML und dem verkapselten ML möglich war. Eine Formulierung als Liposomen hatte dementsprechend keine Auswirkung auf die Zytotoxizität.

Die TT-Liposomen zeigten bei einer OA-Konzentration von 55 µg/mL eine signifikant größere Zytotoxizität im Vergleich zur methanolischen TT-Lösung, sowohl in der Echtzeitanalyse als auch im Endpunktassay. Die zwei anderen ausgewählten Konzentrationen zeigten keine Unterschiede hinsichtlich ihrer Formulierung. Die OA-Konzentrationen 28 und 55 µg/mL zeigten im Vergleich zur Kontrolle Zytotoxizität, unabhängig von der Formulierung.

Die Kombinationen aus ML-Liposomen und TT-Liposomen oder der methanolischen TT-Lösung zeigten keine Abstufungen hinsichtlich der Zellindices im Vergleich zu den unverkapselten ML-Proben und ML+TT-Proben (Abb. 59). Ebenfalls wurden die TT-Liposomen mit den ML-Liposomen und mit dem ML-Standard untersucht, es ergaben sich ebenfalls keine Unterschiede zu den unverkapselten TT- und ML+TT-Proben (Abb. 60). Eine Verwendung des MLs und der TT als Liposomen brachte bezüglich der Zytotoxizität auf die 143B-Zellen aufgrund dieser Ergebnisse keinen Vorteil.

4.5 Konfokale Mikroskopie

Mithilfe der konfokalen Mikroskopie konnte die Dynamik des fluoreszenzmarkierten MLs in der Zelle über einen längeren Zeitraum detailliert verfolgt werden.

Aufgenommenes ML konnte vor allem in intrazellulären Vesikeln beobachtet werden, die durch Anfärbung mit pHrodo® red Dextran als Endosomen identifiziert werden konnten (Abb. 63). Zusätzlich konnte die Ansammlung von ML vermehrt in der Peripherie der Zelle beobachtet werden (Abb. 62), wie es bereits für die embryonale Mauszelllinie NIH-3T3 und für die menschliche Melanomzelllinie Fm3d beobachtet werden konnte (Moisenovich et al., 2002, Moisenovich et al., 2003).

Bei einer weiteren Untersuchung eines Zellausschnittes konnte durch die Zugabe von TT-Extrakt (in Methanol gelöst) eine Vesikelverschmelzung beobachtet werden (Abb. 64), die anschließend in einer sichtbaren Bläschenbildung endete (Abb. 64, Abb. 65). Die ausgelöste Verschmelzung von Vesikeln durch ML wurde 1998 ebenfalls beschrieben und ist auch bei dem RIP Typ-II Ricin beobachtet worden (Pohl et al., 1998).

Um mikroskopisch den Einfluss der TT zu untersuchen, wurde ebenfalls eine Aufnahme gestartet, bei der die TT-Extrakt-Charge in einer OA-Konzentration von 10 µg/mL nach der Inkubation mit 200 µg/mL ML hinzugefügt und der Zellausschnitt anschließend für eine Stunde beobachtet wurde (Abb. 66). In dieser Abbildung konnten mehrere Vesikel mit ML und ebenfalls eine diffuse Streuung des MLs beobachtet werden. In den Zellen mit einer diffusen ML-Verteilung konnte ferner keine scharf abgegrenzte Zellmembran (mit Cellmask® rot angefärbt) mehr beobachtet werden – ein Hinweis auf die porös werdende Zellmembran durch den Einfluss der TT-Säuren. Nach einer Stunde konnte der Untergang dieser Zellen und vor allem die Auflösung der Zellmembranen durch die Einwanderung des roten Farbstoffes in das Zytoplasma beobachtet werden. Dies bestätigte die durchgeführten Untersuchungen bezüglich der Impedanz (Abb. 39) und die Diskussion ihrer Ergebnisse (Kapitel 4.4.1). Bei der Betrachtung des Zellausschnitts mit 100 µg/mL fluoreszenzmarkierten ML konnte nach der Zugabe der methanolischen TT-Extrakt-Lösung die beginnende Lyse der Vesikel in den Zellen beobachtet werden (Abb. 67) und resultierte ebenfalls in einer diffusen Verteilung des fluoreszenzmarkierten MLs. Die Einwanderung des Zellmembranfarbstoffs war jedoch nicht im gleichen Maße erkennbar wie bei Abbildung 66. Die Ursache dafür könnte einerseits sein, dass mit einer geringen Konzentration an ML (100 µg/mL statt 200 µg/mL) über einen längeren Zeitpunkt inkubiert wurde, bevor die methanolische TT-Extrakt-Lösung hinzugegeben wurde, andererseits wurde eben die methanolische TT-Extrakt-Lösung statt der TT-Extrakt-Charge 155 verwendet. Die Verwendung der TT-Extrakt-Charge zeigte einen größeren Effekt auf die Zellmembran als die Verwendung der methanolischen TT-Extrakt-Lösung.

Um den Einfluss von 2-HP- β -CD, das zur Solubilisierung des TT-Extraktes verwendet wurde, auf die Zellen und die Verteilung von 2-HP- β -CD in den Zellen zu untersuchen, wurden die 143B-Zellen mit fluoreszenzmarkiertem CD inkubiert. Bei einer kurzfristigen Inkubation von 20 Minuten mit fluoreszenzmarkiertem CD (40 $\mu\text{g}/\text{mL}$) konnte eine Aufnahme des CDs beobachtet werden, das lediglich diffus in der kompletten Zelle vorlag (Abb. 68). Eine Interaktion des 2-HP- β -CDs mit der Zellmembran konnte nicht beobachtet werden. Bei der Beobachtung des Verhaltens des fluoreszenzmarkierten CDs (40 $\mu\text{g}/\text{mL}$) über den gleichen Inkubationszeitraum wie beim ML (100 $\mu\text{g}/\text{mL}$) über 22 Stunden zeigte sich ebenfalls eine diffuse Verteilung des CDs, jedoch von geringerem Ausmaß (Abb. 69). Weiterhin konnte eine gemeinsame Vesikelbildung des MLs und des CDs beobachtet werden, jedoch war nicht jeder Vesikel, der ML beinhaltete, zusätzlich mit CD bestückt. Diese gemeinsame Anordnung in Endosomen scheint daher möglicherweise eine zufällige Anordnung zu sein, da sie sehr unregelmäßig ausfiel. Zusammengefasst ergaben diese Beobachtungen keinen Hinweis auf einen Einfluss von 2-HP- β -CD auf die ML-Aufnahme.

4.6 Oleanolsäure-Quantifizierung

Die Quantifizierung der OA mittels der GC / FID-Methode konnte sowohl im organischen Lösungsmittel als auch in einer biologischen Matrix etabliert werden (Kapitel 3.8). Alle Validierungsparameter ließen keinen systematischen Fehler erkennen. Die Berechnung der OA-Konzentration erfolgte jeweils über den Zusatz des internen Standards Erythrodiol und des zuvor ermittelten Faktors.

In den Tierstudien konnte für jedes behandelte Tier eine OA-Konzentration im Serum ermittelt werden, da die Serumkonzentrationen über der Bestimmungsgrenze lagen. Im Verhältnis zur berechneten initialen OA-Konzentration konnte 30 Minuten nach der intravenösen Gabe lediglich ein geringer Gehalt an OA bestimmt werden. Ein rascher Abtransport von OA in andere Kompartimente durch die starke Bindung an Plasmaproteine ist eine Erklärung für die geringen Serumwerte, da die Halbwertszeit von OA mit 41,9–52,7 Minuten keine Begründung für den bestimmten Gehalt liefert (Jeong et al., 2007). Des Weiteren erfolgt der Transport von OA ins Zellinnere durch passive Diffusion (Jeong et al., 2007), was ebenfalls zur Elimination aus dem Serum beiträgt. Im direkten Vergleich des Mono- und Kombinationsversuches mit OA bzw. OA und ML konnte kein Unterschied festgestellt werden. Bei den Gruppen mit der kurzen Anwendungsdauer von 30 Minuten zeigte sich bei den Mäusen mit OA als Einzelgabe ein schwach höherer OA-Gehalt (2,5 statt 0,3 %), was sich jedoch nach 120-minütiger Inkubation umkehrte (0,2 statt 0,9 %). Anhand der ermittelten Werte könnte man von einer Plateau-Bildung des OA-Serumspiegels bei der kombinierten Gabe sprechen, während bei den Seren der Einzelgabe an OA ein deutlicher Abfall der OA-Konzentration innerhalb von 120 Minuten erkennbar war. Jedoch war der Anteil an OA im

Serum bei allen Tieren sehr gering im Vergleich zur theoretisch ermittelten initialen OA-Konzentration, sodass nicht eindeutig von Abstufungen und Unterschieden gesprochen werden kann.

5 Zusammenfassung

Die Nachfrage nach alternativen Behandlungsmöglichkeiten für verschiedenste Krebserkrankungen steigt aufgrund der vielfachen Nebenwirkungen der klassischen Therapie stetig an. Wässrige Mistelpräparate (*Viscum album* L. (Santalaceae)) werden bereits vielfach als komplementäre Behandlungsmethode eingesetzt.

Zu den Hauptinhaltsstoffen zählen die Mistellektine, die zu der Gruppe der Ribosomeninaktivierenden Proteine Typ-II gehören und aufgrund ihrer N-Glykosidase-Aktivität das hauptsächlich wirksame zytotoxische Prinzip der Anwendung darstellen. Des Weiteren sind zahlreiche lipophile Substanzen in der Mistel vorhanden, von denen vor allem die Triterpensäuren, hauptsächlich Oleanolsäure, aufgrund ihrer antitumoralen und antiinflammatorischen Eigenschaften von besonderem Interesse sind. Eine Kombination beider Stoffklassen könnte dementsprechend eine Bereicherung auf den Arzneimittelmarkt im Bereich der adjuvanten Tumorthherapie sein.

Die Quantifizierung der Mistellektine konnte mithilfe zweier etablierter ELISA-Methoden sowohl im wässrigen als auch im serumhaltigen Medium erfolgen. Die Triterpensäuren, vor allem Oleanolsäure, konnten mit einer validierten GC / FID-Methode ebenfalls im lösungsmittel- und im serumhaltigen Milieu bestimmt werden.

Der A-Ketten-ELISA ermöglichte zudem die Ermittlung der intrazellulären Mistellektinkonzentration in Leukämie- und Sarkom-Zellen. Eine Aufnahme von Mistellektinen wurde in jeder kultivierten Tumorzelllinie detektiert. Bei der Osteosarkomzelllinie 143B konnte jedoch eine Mistellektin-Aufnahme erst durch den Zusatz des Triterpensäure-haltigen Extraktes nachgewiesen werden. Eine unterschiedliche Konzentration an Oleanolsäure spielte bezüglich der Mistellektinaufnahme jedoch keine Rolle.

Die kombinierte Gabe der hydrophilen und lipophilen Stoffgruppen wurde durch den Zusatz von 2-Hydroxypropyl- β -Cyclodextrin ermöglicht, der für die Solubilisierung der stark lipophilen Triterpensäuren verantwortlich ist. Eine methanolische Lösung des Triterpensäuren-Extraktes lieferte das gleiche Ergebnis wie der solubilisierter Triterpensäure-Extrakt. Die Formulierung als Liposomen (verkapselter Triterpenextrakt) ermöglichte zwar auch eine Aufnahme der Mistellektine, die aber deutlich geringer ausfiel als der Effekt des in Methanol gelösten bzw. mit 2-Hydroxypropyl- β -Cyclodextrin solubilisierten Triterpensäure-Extraktes.

Die Formulierung von Mistellektinen in Liposomen bewirkte eine geringere Aufnahme durch die kultivierten Tumorzellen, die allerdings rezeptor-unabhängig verläuft. Zusätzlich konnte festgestellt werden, dass bei der Gabe des wässrigen *Viscum*-Extraktes ein höherer Anteil an Mistellektin aufgenommen wurde als bei der Gabe des Mistellektin-Standards.

Bei den Untersuchungen bezüglich der Zytotoxizität konnte mithilfe sowohl eines Endpunktassays als auch einer Echtzeitanalyse mittels Impedanzmessung der wässrige *Viscum*-Extrakt als toxischer eingestuft werden als der Mistellektin-Standard. Die jeweiligen Kombinationen mit dem Triterpensäure-haltigen Extrakt führten jedoch schließlich zu keiner signifikant erhöhten Zytotoxizität, verglichen mit den Einzelkomponenten. Die Verkapselungen der Einzelkomponenten waren ebenfalls nicht stärker zytotoxisch.

Mithilfe der konfokalen Laser-Scanning-Mikroskopie wurde der Verlauf von fluoreszenzmarkiertem Mistellektin-Standard innerhalb der Zelle verdeutlicht, die Lokalisation in Endosomen, Vesikelverschmelzungen und Bläschenbildung in der Zelle wurden beobachtet. Die Lyse von Vesikeln durch den Zusatz von triterpensäurehaltigen Extrakten konnte punktuell hervorgerufen und beobachtet werden.

6 Summary

Complementary treatment possibilities for cancer diseases are increasing in demand due to the severe side effects of the standard first-line therapy. A common approach as a complementary treatment is the use of aqueous extracts of *Viscum album* L. (Santalaceae).

The therapeutic activity of the extracts is attributed to the N-glycosidase-activity of the mistletoe lectins which are ribosome-inactivating proteins type II. Besides these constituents, the spectrum of *Viscum album* L. comprises also a mixture of lipophilic ingredients, mainly triterpene acids, like oleanolic acid which have antitumor and antiinflammatory effects. The combined application of both substance classes could be an enrichment for the adjuvant chemotherapy.

The mistletoe lectins could be quantified by two ELISAs in aqueous and in serum containing media. A validated GC / FID-method was used to quantify the triterpene acids, especially oleanolic acid, in organic solvents and also in serum containing media.

The intracellular uptake of the mistletoe lectin by leukemia and sarcoma cell lines was analyzed by the A-chain-ELISA. The uptake of mistletoe lectins was determined in all cultured tumor cells. For the 143B osteosarcoma cell line, only the addition of triterpene acids resulted in a measurable intracellular mistletoe lectin concentration. The examination of the impact of the triterpene acid concentration (calculated as oleanolic acid) on the uptake of mistletoe lectin has shown no higher uptake with increasing triterpene acid concentration.

The combined application of the hydrophilic and lipophilic substance classes becomes feasible by solubilization of the triterpene acids using 2-hydroxypropyl- β -cyclodextrin. The addition of a non-solubilized lipophilic extract (without 2-hydroxypropyl- β -cyclodextrin) resulted in the same intracellular mistletoe lectin concentration. The modeling as liposomes was enabled a smaller mistletoe lectin uptake than by using the triterpene acid containing extract in methanol or with 2-hydroxypropyl- β -cyclodextrin. The uptake of mistletoe lectin I from liposomes was also limited. Furthermore, the mistletoe lectin uptake from the viscum extracts by the cells was higher than the uptake of the isolated mistletoe lectin.

The examinations of the cytotoxicity using endpoint determinations and real-time analysis has also shown a higher toxicity of the viscum extracts in comparison to the mistletoe lectin standard. The addition of the triterpene acid containing extract or the application as liposomes did not significantly enhance the cytotoxicity. Using confocal laser scanning microscopy, the intracellular transport of fluorescence labeled mistletoe lectin could be analyzed. Vesiculations, localization in endosomes and fusions of vesicles were recognized. The lysis of vesicles could be selectively observed after addition of triterpene acids.

7 Literaturverzeichnis

- AbnobaGmbH (2008). ABNOBA Anwendungsempfehlungen.
- ACEA Biosciences, I. (2013). The xCELLigence System - Discover what you've been missing.
- Adler, M. and Eisenbraun, J. (2009). Immuno-PCR - highly sensitive protein detection: results of the detection of native mistletoe lectin in human serum samples.
- Adler, M., Langer, M., Witthohn, K., Eck, J., Blohm, D. and Niemeyer, C. M. (2003). "Detection of rViscumin in plasma samples by immuno-PCR." Biochem. Biophys. Res. Commun. **300**(3): 757-763.
- Agapov, I. I., Tonevitsky, A. G., Maluchenko, N. V., Moisenovich, M. M., Bulah, Y. S. and Kirpichnikov, M. P. (1999). "Mistletoe lectin A-chain unfolds during the intracellular transport." FEBS Lett. **464**(1,2): 63-66.
- Agapov, I. I., Tonevitsky, A. G., Shamshiev, A. T., Pohl, E., Pohl, P., Palmer, R. A. and Kirpichnikov, M. P. (1997). "The role of structural domains in RIP II toxin model membrane binding." FEBS Lett. **402**(1): 91-93.
- Alami, M., Taupiac, M.-P. and Beaumelle, B. (1997). "Ricin-binding proteins along the endocytic pathway: the major endosomal ricin-binding protein is endosome-specific." Cell Biol. Int. **21**(3): 145-150.
- Allayee, H., Laffitte, B. A. and Lusic, A. J. (2000). "Biochemistry. An absorbing study of cholesterol." Science **290**(5497): 1709-1711.
- Ammon, H. P. T. and Hunnius, C. (2004). Hunnius Pharmazeutisches Wörterbuch. 9. Auflage. H. P. T. Ammon. Berlin, Walter de Gruyter Verlag. **9**.
- Assefa, H., Nimrod, A., Walker, L. and Sindelar, R. (1999). "Synthesis and evaluation of potential complement inhibitory semisynthetic analogs of oleanolic acid." Bioorg. Med. Chem. Lett. **9**(14): 1889-1894.
- Bangham, A. D., Standish, M. M. and Watkins, J. C. (1965). "Diffusion of univalent ions across the lamellae of swollen phospholipids." J. Mol. Biol. **13**(1): 238-252.
- Bao, X., Gao, M., Xu, H., Liu, K.-X., Zhang, C.-H., Jiang, N., Chu, Q.-C., Guan, X. and Tian, Y. (2015). "A novel oleanolic acid-loaded PLGA-TPGS nanoparticle for liver cancer treatment." Drug Dev. Ind. Pharm. **41**(7): 1193-1203.
- Barbieri, L., Battelli, M. G. and Stirpe, F. (1993). "Ribosome-inactivating proteins from plants." Biochim. Biophys. Acta, Rev. Biomembr. **1154**(3-4): 237-282.
- Bausell, R. B., Lee, W. L. and Berman, B. M. (2001). "Demographic and health-related correlates to visits to complementary and alternative medical providers." Med. Care **39**(2): 190-196.

- Berridge, M. V., Herst, P. M. and Tan, A. S. (2005). "Tetrazolium dyes as tools in cell biology: new insights into their cellular reduction." *Biotechnol. Annu. Rev.* **11**: 127-152.
- Bopp, A. and Kienle, G. S. (2015). "Informationen zur Misteltherapie bei Krebs." from www.misteltherapie.de.
- Broniatowski, M., Flasiński, M., Zieba, K. and Miskowicz, P. (2014). "Interactions of pentacyclic triterpene acids with cardiolipins and related phosphatidylglycerols in model systems." *Biochim. Biophys. Acta, Biomembr.* **1838**(10): 2530-2538.
- Buessing, A. (1996). "Induction of apoptosis by the mistletoe lectins: a review on the mechanisms of cytotoxicity mediated by *Viscum album* L." *Apoptosis* **1**(1): 25-32.
- Buessing, A. (2000). Biological and pharmacological properties of *Viscum album* L. *Mistletoe. The Genus Viscum*. A. Buessing. Amsterdam, Harwood Academic Publishers. **64**: 123-183.
- Buessing, A. (2000). *History of mistletoe uses*. Amsterdam, Harwood Academic Publishers.
- Buessing, A., Schaller, G. and Pfueller, U. (1998). "Generation of reactive oxygen intermediates (ROI) by the thionins from *Viscum album* L." *Anticancer Res.* **18**(6a): 4291-4296.
- Buessing, A. and Schietzel, M. (1999). "Apoptosis-inducing properties of *Viscum album* L. extracts from different host trees, correlate with their content of toxic mistletoe lectins." *Anticancer Res.* **19**(1A): 23-28.
- Buessing, A., Stein, G. M., Pfueller, U. and Schietzel, M. (1999). "Differential binding of toxic lectins from *Viscum album* L., ML I and ML III, to human lymphocytes." *Anticancer Res.* **19**(6b): 5095-5099.
- Buessing, A., Suzart, K. and Schweizer, K. (1997). "Differences in the apoptosis-inducing properties of *Viscum album* L. extracts." *Anticancer Drugs* **8**(Suppl. 1, *Viscum album* L. Treatments in Cancer): S9-S14.
- Bunjes, V. J. (2009). *Funktionalisierung liposomaler Drug Carrier Systeme mit Mistellektin I: Verkapselung und aktives Targeting in vitro*. Dr. rer. nat., Albert-Ludwigs-Universität Freiburg.
- Caaveiro, J. M., Molina, A., Rodriguez-Palenzuela, P., Goni, F. M. and Gonzalez-Manas, J. M. (1998). "Interaction of wheat alpha-thionin with large unilamellar vesicles." *Protein Sci.* **7**(12): 2567-2577.
- Coulon, A., Berkane, E., Sautereau, A. M., Urech, K., Rouge, P. and Lopez, A. (2002). "Modes of membrane interaction of a natural cysteine-rich peptide: viscotoxin A3." *Biochim. Biophys. Acta* **1559**(2): 145-159.
- Coulon, A., Mosbah, A., Lopez, A., Sautereau, A. M., Schaller, G., Urech, K., Rouge, P. and Darbon, H. (2003). "Comparative membrane interaction study of viscotoxins A3, A2 and B from mistletoe (*Viscum album*) and connections with their structures." *Biochem. J.* **374**(Pt 1): 71-78.

- Day, P. J., Owens, S. R., Wesche, J., Olsnes, S., Roberts, L. M. and Lord, J. M. (2001). "An interaction between ricin and calreticulin that may have implications for toxin trafficking." J. Biol. Chem. **276**(10): 7202-7208.
- de Virgilio, M., Lombardi, A., Caliandro, R. and Fabbrini, M. S. (2010). "Ribosome-inactivating proteins: from plant defense to tumor attack." Toxins (Basel) **2**(11): 2699-2737.
- Deeks, E. D., Cook, J. P., Day, P. J., Smith, D. C., Roberts, L. M. and Lord, J. M. (2002). "The Low Lysine Content of Ricin A Chain Reduces the Risk of Proteolytic Degradation after Translocation from the Endoplasmic Reticulum to the Cytosol." Biochemistry **41**(10): 3405-3413.
- Delebinski, C. I., Jaeger, S., Kemnitz-Hassanin, K., Henze, G., Lode, H. N. and Seifert, G. J. (2012). "A new development of triterpene acid-containing extracts from *Viscum album* L. displays synergistic induction of apoptosis in acute lymphoblastic leukaemia." Cell Proliferation **45**(2): 176-187.
- Delebinski, C. I., Twardziok, M., Kleinsimon, S., Eggert, A., Seifert, G., Hoff, F., Mulsow, K., Rolff, J. and Jaeger, S. (2015). "A Natural Combination Extract of *Viscum album* L. Containing Both Triterpene Acids and Lectins Is Highly Effective against AML In Vivo." PLoS One **10**(8): e0133892.
- Eck, J., Langer, M., Mockel, B., Baur, A., Rothe, M., Zinke, H. and Lentzen, H. (1999). "Cloning of the mistletoe lectin gene and characterization of the recombinant A-chain." Eur. J. Biochem. **264**(3): 775-784.
- Edlund, U., Hensel, A., Frose, D., Pfueller, U. and Scheffler, A. (2000). "Polysaccharides from fresh *Viscum album* L. berry extract and their interaction with *Viscum album* agglutinin I." Arzneimittelforsch. **50**(7): 645-651.
- Einbond, L. S., Mighty, J., Redenti, S. and Wu, H.-a. (2013). "Actein induces calcium release in human breast cancer cells." Fitoterapia **91**: 28-38.
- Elluru, S., Duong Van Huyen, J. P., Delignat, S., Prost, F., Bayry, J., Kazatchkine, M. D. and Kaveri, S. V. (2006). "Molecular mechanisms underlying the immunomodulatory effects of mistletoe (*Viscum album* L.) extracts Iscador." Arzneimittelforsch. **56**(6a): 461-466.
- Elsasser-Beile, U., Voss, M., Schuhle, R. and Wetterauer, U. (2000). "Biological effects of natural and recombinant mistletoe lectin and an aqueous mistletoe extract on human monocytes and lymphocytes in vitro." J. Clin. Lab. Anal. **14**(6): 255-259.
- Endo, Y., Tsurugi, K. and Franz, H. (1988). "The site of action of the A-chain of mistletoe lectin I on eukaryotic ribosomes. The RNA N-glycosidase activity of the protein." FEBS Lett. **231**(2): 378-380.
- Fachinformationsverzeichnis (2016). Rote Liste, Rote Liste Service GmbH.
- Fischer, S. (1996). Stimulation der Immunabwehr durch Mistelinhaltsstoffe - In-vitro-Versuche zur T-Zellreaktivität. Carstens Stiftung.

- Fischer, S., Kabelitz, D., Musielski, H., Scheer, R. and Scheffler, A. (2002). "Synergism between lectins and vesicles of *Viscum album* L.: Detection by biochemical and immunological methods." J. Herb. Pharmacother. **2**(1): 7-22.
- Florack, D. E. and Stiekema, W. J. (1994). "Thionins: properties, possible biological roles and mechanisms of action." Plant Mol. Biol. **26**(1): 25-37.
- Franz, H. (1986). "Mistletoe lectins and their A and B chains." Oncology **43 Suppl 1**: 23-34.
- Franz, H., Kindt, A., Eifler, R., Ziska, P., Benndorf, R. and Junghahn, I. (1983). "Differences in toxicity and antigenicity between mistletoe lectin I and viscotoxin A3." Biomed. Biochim. Acta **42**: K21-K25.
- Franz, H., Ziska, P. and Kindt, A. (1981). "Isolation and properties of three lectins from mistletoe (*Viscum album* L.)." Biochem. J. **195**(2): 481-484.
- Fukunaga, T., Kajikawa, I., Nishiya, K., Watanabe, Y., Takeya, K. and Itokawa, H. (1987). "Studies on the Constituents of the European Mistletoe, *Viscum album* L." Chem. Pharm. Bull. **35**(8): 3292-3297.
- Fulda, S. and Debatin, K. M. (2000). "Betulinic acid induces apoptosis through a direct effect on mitochondria in neuroectodermal tumors." Med. Pediatr. Oncol. **35**(6): 616-618.
- Gardin, N. E. (2009). "Immunological response to mistletoe (*Viscum album* L.) in cancer patients: a four-case series." Phytother. Res. **23**(3): 407-411.
- Gheorgheosu, D., Duicu, O., Dehelean, C., Soica, C. and Muntean, D. (2014). "Betulinic Acid as a Potent and Complex Antitumor Phytochemical: A Minireview." Anti-Cancer Agents Med. Chem. **14**(7): 936-945.
- Gilabert-Oriol, R., Mergel, K., Thakur, M., von Mallinckrodt, B., Melzig, M. F., Fuchs, H. and Weng, A. (2013). "Real-time analysis of membrane permeabilizing effects of oleanane saponins." Bioorg. Med. Chem. **21**(8): 2387-2395.
- Giudici, M., Pascual, R., de la Canal, L., Pfueller, K., Pfueller, U. and Villalain, J. (2003). "Interaction of viscotoxins A3 and B with membrane model systems: implications to their mechanism of action." Biophys. J. **85**(2): 971-981.
- Grimm, C. (2016). Entwicklung und Untersuchung eines liposomalen Trägersystems für pflanzliche Proteintoxine und Triterpene. Dipl. pharm., Ernst-Moritz-Arndt-Universität Greifswald.
- Hajto, T., Fodor, K., Perjési, P. and Németh, P. (2012). "Difficulties and perspectives of immunomodulatory therapy with mistletoe lectins and standardized mistletoe extracts in evidence based medicine." Z. Phytother. **33**(S 01): P14.
- Hajto, T., Hostanska, K., Berki, T., Pálinkás, L., Boldizsár, F. and Németh, P. (2005). "Oncopharmacological Perspectives of a Plant Lectin (*Viscum album* Agglutinin-I): Overview of Recent Results from In vitro Experiments and In vivo Animal Models, and Their Possible Relevance for Clinical Applications." J. Evidence-Based Complementary Altern. Med. **2**(1): 59-67.

- Hajto, T., Hostanska, K., Fischer, J. and Saller, R. (1997). "Immunomodulatory effects of *Viscum album* agglutinin-I on natural immunity." Anti-Cancer Drugs **8**(Suppl. 1, *Viscum album* L. Treatments in Cancer): S43-S46.
- Hajto, T., Hostanska, K., Frei, K., Rordorf, C. and Gabius, H.-J. (1990). "Increased Secretion of Tumor Necrosis Factor α , Interleukin 1, and Interleukin 6 by Human Mononuclear Cells Exposed to β -Galactoside-specific Lectin from Clinically Applied Mistletoe Extract." Cancer Res. **50**(11): 3322-3326.
- Hajto, T., Hostanska, K. and Gabius, H. J. (1989). "Modulatory potency of the β -galactoside-specific lectin from mistletoe extract (Iscador) on the host defense system in vivo in rabbits and patients." Cancer Res. **49**(17): 4803-4808.
- Han, J.-H., Zhou, W., Li, W., Tuan, P. Q., Khoi, N. M., Thuong, P. T., Na, M. K. and Myung, C.-S. (2015). "Pentacyclic Triterpenoids from *Astilbe rivularis* that Enhance Glucose Uptake via the Activation of Akt and Erk1/2 in C2C12 Myotubes." J. Nat. Prod. **78**(5): 1005-1014.
- Han, S. K., Ko, Y. I., Park, S. J., Jin, I. J. and Kim, Y. M. (1997). "Oleanolic acid and ursolic acid stabilize liposomal membranes." Lipids **32**(7): 769-773.
- He, X., McMahon, S. and Rasooly, R. (2012). "Evaluation and comparison of three enzyme-linked immunosorbent assay formats for the detection of ricin in milk and serum." Biocatal. Agric. Biotechnol. **1**(2): 105-109.
- Helixor-HeilmittelGmbH&Co.KG. (2016). "Herstellung der Mistelprodukte." from <http://www.helixor.de/komplementaere-medizin/misteltherapie/herstellung/>.
- Horneber, M. A., Bueschel, G., Huber, R., Linde, K. and Rostock, M. (2008). "Mistletoe therapy in oncology." Cochrane Database Syst. Rev.(2): Cd003297.
- Huber, R., Rostock, M., Goedl, R., Luedtke, R., Urech, K., Buck, S. and Klein, R. (2005). "Mistletoe treatment induces GM-CSF- and IL-5 production by PBMC and increases blood granulocyte- and eosinophil counts: a placebo controlled randomized study in healthy subjects." Eur. J. Med. Res. **10**(10): 411-418.
- Hughes, P., Dennis, E., Whitecross, M., Llewellyn, D. and Gage, P. (2000). "The Cytotoxic Plant Protein, β -Purothionin, Forms Ion Channels in Lipid Membranes." J. Biol. Chem. **275**(2): 823-827.
- Jaeger, S., Trojan, H., Kopp, T., Laszczyk, M. N. and Scheffler, A. (2009). "Pentacyclic triterpene distribution in various plants - rich sources for a new group of multi-potent plant extracts." Molecules **14**(6): 2016-2031.
- Jaeger, S., Winkler, K., Pfueller, U. and Scheffler, A. (2007). "Solubility studies of oleanolic acid and betulinic acid in aqueous solutions and plant extracts of *Viscum album* L." Planta Med. **73**(2): 157-162.
- Jaeggy, C., Musielski, H., Urech, K. and Schaller, G. (1995). "Quantitative determination of lectins in mistletoe preparations." Arzneimittelforsch. **45**(8): 905-909.

- Jeong, D. W., Kim, Y. H., Kim, H. H., Ji, H. Y., Yoo, S. D., Choi, W. R., Lee, S. M., Han, C.-K. and Lee, H. S. (2007). "Dose-linear pharmacokinetics of oleanolic acid after intravenous and oral administration in rats." Biofarm. Drug Dispos. **28**(2): 51-57.
- Jonas, L. and Walzel, H. (1991). "Comparative studies on internalization of gold-labelled mistletoe lectin I, its subunits, as well as of an immunotoxin in murine L 1210 leukemia cells." Acta Histochem., Suppl. **41**: 73-79.
- Jung, M. L., Baudino, S., Ribereau-Gayon, G. and Beck, J. P. (1990). "Characterization of cytotoxic proteins from mistletoe (*Viscum album* L.)." Cancer Lett. (Shannon, Irel.) **51**(2): 103-108.
- Kienle, G. S., Glockmann, A., Schink, M. and Kiene, H. (2009). "Viscum album L. extracts in breast and gynaecological cancers: a systematic review of clinical and preclinical research." J. Exp. Clin. Cancer Res. **28**(1): 79-79.
- Kienle, G. S. and Kiene, H. (2003). Die Mistel in der Onkologie - Fakten und konzeptionelle Grundlagen. New York, Schattauer Verlag Stuttgart.
- Kienle, G. S. and Kiene, H. (2010). "Review article: Influence of *Viscum album* L (European mistletoe) extracts on quality of life in cancer patients: a systematic review of controlled clinical studies." Integr. Cancer Ther. **9**(2): 142-157.
- Krauspenhaar, R., Eschenburg, S., Perbandt, M., Kornilov, V., Konareva, N., Mikailova, I., Stoeva, S., Wacker, R., Maier, T., Singh, T., Mikhailov, A., Voelter, W. and Betzel, C. (1999). "Crystal Structure of Mistletoe Lectin I from *Viscum album*." Biochem. Biophys. Res. Commun. **257**(2): 418-424.
- Lange-Lindberg, A.-M., Velasco-Garrido, M. and Busse, R. (2006). Misteltherapie als begleitende Behandlung zur Reduktion der Toxizität der Chemotherapie maligner Erkrankungen Schriftenreihe Health Technology Assessment in der Bundesrepublik Deutschland. DIMDI. Köln.
- Laszczyk, M., Jaeger, S., Simon-Haarhaus, B., Scheffler, A. and Schempp, C. M. (2006). "Physical, chemical and pharmacological characterization of a new oleogel-forming triterpene extract from the outer bark of birch (*Betulae Cortex*)." Planta Med. **72**(15): 1389-1395.
- Laszczyk, M. N. (2009). "Pentacyclic triterpenes of the lupane, oleanane and ursane group as tools in cancer therapy." Planta Med. **75**(15): 1549-1560.
- Ledesma-Osuna, A. I., Ramos-Clamont, G. and Vazquez-Moreno, L. (2008). "Characterization of bovine serum albumin glycosylated with glucose, galactose and lactose." Acta Biochim. Pol. **55**(3): 491-497.
- Lee, C. H., Kim, J. K., Kim, H. Y., Park, S. M. and Lee, S. M. (2009). "Immunomodulating effects of Korean mistletoe lectin in vitro and in vivo." Int. Immunopharmacol. **9**(13-14): 1555-1561.
- Lee, J. Y., Kim, J. Y., Lee, Y. G., Byeon, S. E., Kim, B. H., Rhee, M. H., Lee, A., Kwon, M., Hong, S. and Cho, J. Y. (2007). "In vitro immunoregulatory effects of Korean mistletoe lectin on

- functional activation of monocytic and macrophage-like cells." Biol. Pharm. Bull. **30**(11): 2043-2051.
- Legnani, W. (2008). "Mistletoe in conventional oncological practice: exemplary cases." Integr. Cancer Ther. **7**(3): 162-171.
- Lenartz, D., Dott, U., Menzel, J., Schierholz, J. M. and Beuth, J. (2000). "Survival of glioma patients after complementary treatment with galactoside-specific lectin from mistletoe." Anticancer Res. **20**(3B): 2073-2076.
- Llorente, A., van Deurs, B. and Sandvig, K. (1998). "Transport of apically but not basolaterally internalized ricin to the Golgi apparatus is stimulated by 8-Br-cAMP in MDCK cells." FEBS Lett. **431**(2): 200-204.
- Lutsch, G., Noll, F., Ziska, P., Kindt, A. and Franz, H. (1984). "Electron microscopic investigations on the structure of lectin I from *Viscum album* L." FEBS Lett. **170**(2): 335-338.
- Lyu, S. Y. and Park, W. B. (2007). "Effects of Korean mistletoe lectin (*Viscum album coloratum*) on proliferation and cytokine expression in human peripheral blood mononuclear cells and T-lymphocytes." Arch. Pharm. Res. **30**(10): 1252-1264.
- Man, D. K. W., Casettari, L., Cespi, M., Bonacucina, G., Palmieri, G. F., Sze, S. C. W., Leung, G. P. H., Lam, J. K. W. and Kwok, P. C. L. (2015). "Oleanolic Acid Loaded PEGylated PLA and PLGA Nanoparticles with Enhanced Cytotoxic Activity against Cancer Cells." Mol. Pharmaceutics **12**(6): 2112-2125.
- Manojlovic, V., Winkler, K., Bunjes, V., Neub, A., Schubert, R., Bugarski, B. and Leneweit, G. (2008). "Membrane interactions of ternary phospholipid/cholesterol bilayers and encapsulation efficiencies of a RIP II protein." Colloids Surf., B **64**(2): 284-296.
- Martin, R., Carvalho, J., Ibeas, E., Hernandez, M., Ruiz-Gutierrez, V. and Nieto, M. L. (2007). "Acidic Triterpenes Compromise Growth and Survival of Astrocytoma Cell Lines by Regulating Reactive Oxygen Species Accumulation." Cancer Res. **67**(8): 3741-3751.
- Marvibaigi, M., Supriyanto, E., Amini, N., Jaganathan, S. K. and Abdul, M. F. A. (2014). "Preclinical and clinical effects of mistletoe against breast cancer." Biomed. Res. Int. **2014**: 785479.
- Mengs, U., Goethel, D. and Leng-Peschlow, E. (2002). "Mistletoe extracts standardized to mistletoe lectins in oncology: review on current status of preclinical research." Anticancer Res. **22**(3): 1399-1407.
- Mikeska, R., Wacker, R., Arni, R., Singh, T. P., Mikhailov, A., Gabdoulkhakov, A., Voelter, W. and Betzel, C. (2005). "Mistletoe lectin I in complex with galactose and lactose reveals distinct sugar-binding properties." Acta Crystallogr., Sect. F: Struct. Biol. Cryst. Commun. **61**(1): 17-25.
- Moisenovich, M., Agapov, I., Marx, U., Bereiter-Hahn, J. and Tonevitsky, A. (2003). "Intracellular transport of plant toxins ricin and Viscumin from different plasma membrane sites." Arzneimittelforsch. **53**(6): 470-475.

- Moisenovich, M., Tonevitsky, A., Agapov, I., Niwa, H., Schewe, H. and Bereiter-Hahn, J. (2002). "Differences in endocytosis and intracellular sorting of ricin and viscumin in 3T3 cells." Eur. J. Cell Biol. **81**(10): 529-538.
- Mosmann, T. (1983). "Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays." J. Immunol. Methods **65**(1-2): 55-63.
- Muething, J., Burg, M., Mockel, B., Langer, M., Metelmann-Strupat, W., Werner, A., Neumann, U., Peter-Katalinic, J. and Eck, J. (2002). "Preferential binding of the anticancer drug rViscumin (recombinant mistletoe lectin) to terminally α 2-6-sialylated neolacto-series gangliosides." Glycobiology **12**(8): 485-497.
- Muething, J., Meisen, I., Bulau, P., Langer, M., Witthohn, K., Lentzen, H., Neumann, U. and Peter-Katalinic, J. (2004). "Mistletoe Lectin I Is a Sialic Acid-Specific Lectin with Strict Preference to Gangliosides and Glycoproteins with Terminal Neu5Ac α 2-6Gal β 1-4GlcNAc Residues." Biochemistry **43**(11): 2996-3007.
- Mulsow, K., Enzlein, T., Delebinski, C., Jaeger, S., Seifert, G. and Melzig, M. F. (2016). "Impact of Mistletoe Triterpene Acids on the Uptake of Mistletoe Lectin by Cultured Tumor Cells." PLoS One **11**(4): e0153825.
- Mundy, D. I., Machleidt, T., Ying, Y. S., Anderson, R. G. and Bloom, G. S. (2002). "Dual control of caveolar membrane traffic by microtubules and the actin cytoskeleton." J. Cell Sci. **115**(Pt 22): 4327-4339.
- Musielski, H. and Rüger, K. (1996). Verfahren zur quantitativen Bestimmung von Mistellektin I und Mistellektin II und/oder Mistellektin III in Mistelextrakten unter Verwendung monoklonaler Antikörper, die spezifisch mit Mistellektin reagieren. Grundlagen der Misteltherapie. Aktueller Stand der Forschung und klinische Anwendung. R. Scheer, H. Becker and P. A. Berg. Stuttgart, Hippokrates Verlag: 95-104.
- Nabrotzki, M. and Scheffler, A. (2001). Komplette Remission nach intratumoraler Misteltherapie eines Duodenum-Karzinom-Rezidivs. Die Mistel in der Tumorthherapie. Grundlagenforschung und Klinik. R. Scheer, H. Becher, P. A. Berg and V. Fintelman. Essen, KVC Verlag: 413-422.
- nanoComposix. (2012). "Zeta Potential Analysis of Nanoparticles." from <http://50.87.149.212/sites/default/files/nanoComposix%20Guidelines%20for%20Zeta%20Potential%20Analysis%20of%20Nanoparticles.pdf>.
- Nazaruk, J. and Orlikowski, P. (2016). "Phytochemical profile and therapeutic potential of *Viscum album* L." Nat. Prod. Res. **30**(4): 373-385.
- Nhiem, N. X., Kiem, P. V., Minh, C. V., Kim, N., Park, S. J., Lee, H. Y., Kim, E. S., Kim, Y. H., Kim, S., Koh, Y.-S. and Kim, S. H. (2013). "Diarylheptanoids and flavonoids from *Viscum album* inhibit LPS-stimulated production of pro-inflammatory cytokines in bone marrow-derived dendritic cells." J. Nat. Prod. **76**(4): 495-502.

- Niwa, H., Tonevitsky, A. G., Agapov, I. I., Saward, S., Pfueller, U. and Palmer, R. A. (2003). "Crystal structure at 3 Å of mistletoe lectin I, a dimeric type-II ribosome-inactivating protein, complexed with galactose." Eur. J. Biochem. **270**(13): 2739-2749.
- Olsnes, S., Stirpe, F., Sandvig, K. and Pihl, A. (1982). "Isolation and characterization of viscummin, a toxic lectin from *Viscum album* L. (mistletoe)." J. Biol. Chem. **257**(22): 13263-13270.
- Orange, M., Lacey, A., Fonseca, M. P., von Laue, B. H., Geider, S. and Kienle, G. S. (2012). "Durable Regression of Primary Cutaneous B-Cell Lymphoma Following Fever-inducing Mistletoe Treatment: Two Case Reports." Glob. Adv. Health Med. **1**(1): 18-25.
- Orhan, D. D., Kupeli, E., Yesilada, E. and Ergun, F. (2006). "Anti-inflammatory and antinociceptive activity of flavonoids isolated from *Viscum album* ssp. *album*." Z. Naturforsch., C: J. Biosci. **61**(1/2): 26-30.
- Parton, R. G., Joggerst, B. and Simons, K. (1994). "Regulated internalization of caveolae." J. Cell Biol. **127**(5): 1199-1215.
- Pfueller, U. and Pfueller, K. (2007). "Self-cleavage of mistletoe lectin I into the A and the B subunit by thiol-disulfide exchange reaction." Phytomedicine **14**: 45.
- Pfueller, U. and Pfueller, K. (2009). Selbstspaltung von Mistellektin I in die A- und B-Kette durch die Thiol-Disulfid-Austauschreaktion. Die Mistel in der Tumorthherapie 2. Aktueller Stand der Forschung und klinische Anwendung. R. Scheer, S. Alban, H. Becker et al. Essen, KVC Verlag: 91-98.
- Pohl, P., Antonenko, Y. N., Evtodienko, V. Y., Pohl, E. E., Saparov, S. M., Agapov, I. I. and Tonevitsky, A. G. (1998). "Membrane fusion mediated by ricin and viscummin." Biochim. Biophys. Acta, Biomembr. **1371**(1): 11-16.
- Pohl, P., Saparov, S. M., Pohl, E. E., Evtodienko, V. Y., Agapov, I. I. and Tonevitsky, A. G. (1998). "Dehydration of model membranes induced by lectins from *Ricinus communis* and *Viscum album*." Biophys. J. **75**(6): 2868-2876.
- Polito, L., Bortolotti, M., Farini, V., Battelli, M. G., Barbieri, L. and Bolognesi, A. (2009). "Saporin induces multiple death pathways in lymphoma cells with different intensity and timing as compared to ricin." Int. J. Biochem. Cell Biol. **41**(5): 1055-1061.
- Prades, J., Vögler, O., Alemany, R., Gomez-Florit, M., Funari, S. S., Ruiz-Gutiérrez, V. and Barceló, F. (2011). "Plant pentacyclic triterpenic acids as modulators of lipid membrane physical properties." Biochim. Biophys. Acta, Biomembr. **1808**(3): 752-760.
- Rather, M. A., Bhat, B. A. and Qurishi, M. A. (2013). "Multicomponent phytotherapeutic approach gaining momentum: Is the "one drug to fit all" model breaking down?" Phytomedicine **21**(1): 1-14.
- Rentzsch, J. L. (2007). Endotheliale Vorläuferzellen beim Mammakarzinom Ph. D., Charité – Universitätsmedizin Berlin.

- Ribereau-Gayon, G., Dumont, S., Muller, C., Jung, M. L., Poindron, P. and Anton, R. (1996). "Mistletoe lectins I, II and III induce the production of cytokines by cultured human monocytes." Cancer Lett. (Shannon, Irel.) **109**(1,2): 33-38.
- Ribereau-Gayon, G., Jung, M.-L., Beck, J.-P. and Anton, R. (1995). "Effect of fetal calf serum on the cytotoxic activity of mistletoe (*Viscum album* L.) lectins in cell culture." Phytother. Res. **9**(5): 336-339.
- Ribereau-Gayon, G., Jung, M. L. and Beck, J. P. (1989). "Die Proteine, Alkaloide und Polysaccharide der Mistel (*Viscum album* L.)." Therapeutikon **3**: 22-26.
- Robert Koch Institute. (2015). "Health in Germany." Federal Health Reporting Joint Service by RKI and Destatis, from http://www.rki.de/EN/Content/Health_Monitoring/Health_Reporting/HealthInGermany/Health-in-Germany_short_summary.pdf?__blob=publicationFile.
- Rostock, M., Huber, R., Greiner, T., Fritz, P., Scheer, R., Schueler, J. and Fiebig, H. H. (2005). "Anticancer activity of a lectin-rich mistletoe extract injected intratumorally into human pancreatic cancer xenografts." Anticancer Res. **25**(3B): 1969-1975.
- Safayhi, H. and Sailer, E. R. (1997). "Anti-inflammatory actions of pentacyclic triterpenes." Planta Med. **63**(6): 487-493.
- Sairafianpour, M., Bahreininejad, B., Witt, M., Ziegler, H. L., Jaroszewski, J. W. and Staerk, D. (2003). "Terpenoids of *Salvia hydrangea*: Two new, rearranged 20-norabietanes and the effect of oleanolic acid on erythrocyte membranes." Planta Med. **69**(9): 846-850.
- Sandvig, K., Torgersen, M. L., Raa, H. A. and van Deurs, B. (2008). "Clathrin-independent endocytosis: from nonexisting to an extreme degree of complexity." Histochem. Cell Biol. **129**(3): 267-276.
- Sandvig, K. and van Deurs, B. (1994). "Endocytosis and intracellular sorting of ricin and Shiga toxin." FEBS Lett. **346**(1): 99-102.
- Sandvig, K. and van Deurs, B. (1999). "Endocytosis and intracellular transport of ricin: recent discoveries." FEBS Lett. **452**(1-2): 67-70.
- Schaller, G., Urech, K. and Giannattasio, M. (1996). "Cytotoxicity of different viscotoxins and extracts from the European subspecies of *Viscum album* L." Phytother. Res. **10**(6): 473-477.
- Scheffler, A., Musielski, H. and Scheer, R. (1995). "Synergismus zwischen Lektinen und Vesikeln von *Viscum album* L." Dtsch. Zschr. Onkol. **27**: 72-75.
- Scheffler, A., Richter, C., Beffert, M., Errenst, M. and Scheer, R. (1996). Differenzierung der Mistelinhaltsstoffe nach Zeit und Ort. Grundlagen der Misteltherapie. Aktueller Stand der Forschung und klinische Anwendung., Hippokrates Verlag Stuttgart: 49-76.
- Schink, M. and Mechelke, F. (1989). "Sex-correlated differences in the protein pattern of *Viscum album* L. revealed by two-dimensional gel electrophoresis." Naturwissenschaften **76**(1): 29-30.

- Schink, M. and Moser, D. (1996). Das Isolektinmuster der Mistellektine. Grundlagen der Misteltherapie. Aktueller Stand der Forschung und klinische Anwendung., Hippokrates Verlag Stuttgart: 77-84.
- Schink, M., Moser, D. and Mechelke, F. (1992). "Two-dimensional isoelectin patterns of the lectins from *Viscum album* L. (mistletoe)." Naturwissenschaften **79**(2): 80-81.
- Schoeffski, P., Riggert, S., Fumoleau, P., Campone, M., Bolte, O., Marreaud, S., Lacombe, D., Baron, B., Herold, M., Zwierzina, H., Wilhelm-Ogunbiyi, K., Lentzen, H. and Twelves, C. (2004). "Phase I trial of intravenous aviscumine (rViscumin) in patients with solid tumors: a study of the European Organization for Research and Treatment of Cancer New Drug Development Group." Ann. Oncol. **15**(12): 1816-1824.
- Schrot, J., Weng, A. and Melzig, M. F. (2015). "Ribosome-inactivating and related proteins." Toxins **7**(5): 1556-1615.
- Seifert, G., Jesse, P., Laengler, A., Reindl, T., Lueth, M., Lobitz, S., Henze, G., Prokop, A. and Lode, H. N. (2008). "Molecular mechanisms of mistletoe plant extract-induced apoptosis in acute lymphoblastic leukemia in vivo and in vitro." Cancer Lett. (Shannon, Irel.) **264**(2): 218-228.
- Shapovalov, Y., Benavidez, D., Zuch, D. and Eliseev, R. A. (2010). "Proteasome inhibition with bortezomib suppresses growth and induces apoptosis in osteosarcoma." Int. J. Cancer **127**(1): 67-76.
- Simpson, J. C., Roberts, L. M., Romisch, K., Davey, J., Wolf, D. H. and Lord, J. M. (1999). "Ricin A chain utilises the endoplasmic reticulum-associated protein degradation pathway to enter the cytosol of yeast." FEBS Lett. **459**(1): 80-84.
- Soga, H., Fujii, S., Yomo, T., Kato, Y., Watanabe, H. and Matsuura, T. (2014). "In Vitro Membrane Protein Synthesis Inside Cell-Sized Vesicles Reveals the Dependence of Membrane Protein Integration on Vesicle Volume." ACS Synth. Biol. **3**(6): 372-379.
- Soica, C., Danciu, C., Savoiu-Balint, G., Borcan, F., Ambrus, R., Zupko, I., Bojin, F., Coricovac, D., Ciurlea, S., Avram, S., Dehelean, C. A., Olariu, T. and Matusz, P. (2014). "Betulinic acid in complex with a gamma-cyclodextrin derivative decreases proliferation and in vivo tumor development of non-metastatic and metastatic B164A5 cells." Int. J. Mol. Sci. **15**(5): 8235-8255, 8221.
- Soica, C., Trandafirescu, C., Danciu, C., Muntean, D., Dehelean, C. and Simu, G. (2014). "New Improved Drug Delivery Technologies for Pentacyclic Triterpenes: A Review." Protein Pept. Lett. **21**(11): 1137-1145.
- Stein, G. M., Pfueller, U., Schietzel, M. and Buessing, A. (2000). "Expression of interleukin-4 in apoptotic cells: stimulation of the type-2 cytokine by different toxins in human peripheral blood mononuclear and tumor cells." Cytometry **41**(4): 261-270.

- Stein, G. M., Schaller, G., Pfueller, U., Wagner, M., Wagner, B., Schietzel, M. and Buessing, A. (1999). "Characterisation of granulocyte stimulation by thionins from European mistletoe and from wheat." Biochim. Biophys. Acta **1426**(1): 80-90.
- Steiner, R. (1976). Geisteswissenschaft und Medizin. Dornach, Rudolf Steiner Verlag.
- Stirpe, F., Sandvig, K., Olsnes, S. and Pihl, A. (1982). "Action of viscum, a toxic lectin from mistletoe, on cells in culture." J. Biol. Chem. **257**(22): 13271-13277.
- Stockert, J. C., Blazquez-Castro, A., Canete, M., Horobin, R. W. and Villanueva, A. (2012). "MTT assay for cell viability: Intracellular localization of the formazan product is in lipid droplets." Acta Histochem. **114**(8): 785-796.
- Strickley, R. G. (2004). "Solubilizing Excipients in Oral and Injectable Formulations." Pharm. Res. **21**(2): 201-230.
- Strueh, C. M., Jaeger, S., Kersten, A., Schempp, C. M., Scheffler, A. and Martin, S. F. (2013). "Triterpenoids amplify anti-tumoral effects of mistletoe extracts on murine B16.F10 melanoma in vivo." PLoS One **8**(4): e62168.
- Strueh, C. M., Jaeger, S., Schempp, C. M., Scheffler, A. and Martin, S. F. (2012). "A novel triterpene extract from mistletoe induces rapid apoptosis in murine B16.F10 melanoma cells." Phytother. Res. **26**(10): 1507-1512.
- Teuscher, E. (1994). Hagers Handbuch der Pharmazeutischen Praxis. Heidelberg, Springer Verlag.
- Thies, A., Dautel, P., Meyer, A., Pfueller, U. and Schumacher, U. (2008). "Low-dose mistletoe lectin-I reduces melanoma growth and spread in a scid mouse xenograft model." Br. J. Cancer **98**(1): 106-112.
- Tonevitsky, A. G., Agapov, I. I., Moisenovich, M. M., Maluchenko, N. V., Pashkov, V. S., Balashova, T. A. and Kirpichnikov, M. P. (2003). "A New Antigenic Epitope Appears in the Catalytic Subunit of Viscumin during Intracellular Transport." Biochemistry (Moscow, Russ. Fed.) **68**(3): 275-285.
- Tsuchiya, H. (2015). "Membrane interactions of phytochemicals as their molecular mechanism applicable to the discovery of drug leads from plants." Molecules **20**(10): 18923-18966.
- Twardziok, M. (2016). Mechanism of action of Viscum album L. extracts in Ewing sarcoma. Dr. rer. nat., Freie Universität Berlin.
- Udeani, G. O., Zhao, G.-M., Shin, Y. G., Cooke, B. P., Graham, J., Beecher, C. W. W., Kinghorn, A. D. and Pezzuto, J. M. (1999). "Pharmacokinetics and tissue distribution of betulinic acid in CD-1 mice." Biopharm. Drug Dispos. **20**(8): 379-383.
- Urech, K., Schaller, G. and Jaggy, C. (2006). "Viscotoxins, mistletoe lectins and their isoforms in mistletoe (*Viscum album* L.) extracts Iscador: Analytical results on pharmaceutical processing of mistletoe." Arzneimittelforsch. **56**(6a): 428-434.

- Urech, K., Schaller, G., Ziska, P. and Giannattasio, M. (1995). "Comparative study on the cytotoxic effect of viscotoxin and mistletoe lectin on tumor cells in culture." Phytother. Res. **9**(1): 49-55.
- Urech, K., Scher, J. M., Hostanska, K. and Becker, H. (2005). "Apoptosis inducing activity of viscin, a lipophilic extract from *Viscum album* L." J. Pharm. Pharmacol. **57**(1): 101-109.
- Valentiner, U., Pfueller, U., Baum, C. and Schumacher, U. (2002). "The cytotoxic effect of mistletoe lectins I, II and III on sensitive and multidrug resistant human colon cancer cell lines in vitro." Toxicology **171**(2-3): 187-199.
- Van Damme, E. J. M., Hao, Q., Chen, Y., Barre, A., Vandebussche, F., Desmyter, S., Rougé, P. and Peumans, W. J. (2001). "Ribosome-Inactivating Proteins: A Family of Plant Proteins That Do More Than Inactivate Ribosomes." Crit. Rev. Plant Sci. **20**(5): 395-465.
- Vervecken, W., Kleff, S., Pfueller, U. and Buessing, A. (2000). "Induction of apoptosis by mistletoe lectin I and its subunits. No evidence for cytotoxic effects caused by isolated A- and B-chains." Int. J. Biochem. Cell Biol. **32**(3): 317-326.
- Wagner, H. and Ulrich-Merzenich, G. (2009). "Synergy research: approaching a new generation of phytopharmaceuticals." Phytomedicine **16**(2-3): 97-110.
- Weng, A. (2009). Untersuchungen zur Wirkung von Saponinen als Verstärker der Penetration von Proteinen im Zellmodell. Dr. rer. nat., Freie Universität Berlin.
- Wesche, J., Rapak, A. and Olsnes, S. (1999). "Dependence of ricin toxicity on translocation of the toxin A-chain from the endoplasmic reticulum to the cytosol." J. Biol. Chem. **274**(48): 34443-34449.
- Williamson, E. M. (2001). "Synergy and other interactions in phytomedicines." Phytomedicine **8**(5): 401-409.
- Winkler, K., Jaeger, S., Lenewit, G. and Schubert, R. (2008). "Interactions of viscotoxins with vesicles of genuine plant membranes." Planta Med. **74**(2): 163-167.
- Wollenweber, E., Wieland, A. and Haas, K. (2000). "Epicuticular waxes and flavonol aglycones of the European mistletoe, *Viscum album* L." Z. Naturforsch., C: J. Biosci. **55**(5-6): 314-317.
- Yan, S.-l., Huang, C.-y., Wu, S.-t. and Yin, M.-c. (2010). "Oleanolic acid and ursolic acid induce apoptosis in four human liver cancer cell lines." Toxicol. in Vitro **24**(3): 842-848.
- Ying, Q. L., Rinehart, A. R., Simon, S. R. and Cheronis, J. C. (1991). "Inhibition of human leucocyte elastase by ursolic acid. Evidence for a binding site for pentacyclic triterpenes." Biochem. J. **277** (Pt 2): 521-526.
- Zhang, K., Lv, S., Li, X., Feng, Y., Li, X., Liu, L., Li, S. and Li, Y. (2012). "Preparation, characterization, and in vivo pharmacokinetics of nanostructured lipid carriers loaded with oleanolic acid and gentiopicrocin." Int. J. Nanomed. **8**: 3227-3239.

- Zhang, P., Li, H., Chen, D., Ni, J., Kang, Y. and Wang, S. (2007). "Oleanolic acid induces apoptosis in human leukemia cells through caspase activation and poly(ADP-ribose) polymerase cleavage." Acta Biochim. Biophys. Sin. **39**(10): 803-809.
- Zhang, W., Men, X. and Lei, P. (2014). "Review on anti-tumor effect of triterpene acid compounds." J. Cancer Res. Ther. (Mumbai, India) **10**(Suppl.5): 14-19, 19 pp.
- Ziska, P. and Franz, H. (1981). "Studies on the interaction of the mistletoe lectin I with carbohydrates." Experientia **37**(3): 219.
- Zuco, V., Supino, R., Righetti, S. C., Cleris, L., Marchesi, E., Gambacorti-Passerini, C. and Formelli, F. (2002). "Selective cytotoxicity of betulinic acid on tumor cell lines, but not on normal cells." Cancer Lett. (Shannon, Irel.) **175**(1): 17-25.

8 Abbildungsverzeichnis

Abb. 1: <i>Viscum album</i> L.....	1
Abb. 2: Oleanen-Grundkörper.....	5
Abb. 3: Lupan-Grundkörper.....	5
Abb. 4: Ursen-Grundkörper	6
Abb. 5: ELISA-Schema (nach (Rentzsch, 2007), modifiziert)	20
Abb. 6: Schematische Darstellung der Partikelgrößenbestimmung durch die PCS.....	23
Abb. 7: Schematische Darstellung der FL-2 / FL-4-Kanal-Auswertung	28
Abb. 8: Schematische Darstellung der Impedanzmodifikationen (nach ACEA Biosciences, 2013, modifiziert).....	33
Abb. 9: Strukturformeln von MTT und Formazan (nach Stockert et al., 2012).....	34
Abb. 10: Wiederfindungsrate des MLs im Blutserum	44
Abb. 11: HPLC-Chromatogramm von OA mit einer Konzentration von 50 µg/mL	50
Abb. 12: Zellviabilität der THP-1-Zelllinie (1).....	53
Abb. 13: Zellviabilität der THP-1-Zelllinie (2).....	53
Abb. 14: Viabilität der HL-60-Zellen	54
Abb. 15: Viabilität der TC-71-Zellen.....	55
Abb. 16: Viabilität der 143B-Zellen (1).....	56
Abb. 17: Viabilität der 143B-Zellen (2).....	56
Abb. 18: Viabilität der 143B-Zellen mit dem TT-Trockenextrakt (in MeOH gelöst)	57
Abb. 19: ML-Aufnahme durch die THP-1-Zelllinie	58
Abb. 20: ML-Aufnahme aus den ML-Liposomen durch die THP-1-Zelllinie.....	59
Abb. 21: ML-Aufnahme durch die HL-60-Zelllinie	60
Abb. 22: ML-Aufnahme durch die TC-71-Zelllinie	60
Abb. 23: ML-Aufnahme durch die 143B-Zelllinie	61
Abb. 24: Einfluss der TT-Extrakt-Konzentration auf die ML-Aufnahme durch die 143B-Zelllinie.....	62
Abb. 25: Vergleich zwischen dem mit 2-HP-β-CD solubilisierten und dem in Methanol gelösten TT-Trockenextrakt	63
Abb. 26: ML-Aufnahme aus ML-Liposomen durch die 143B-Zelllinie.....	64
Abb. 27: ML-Aufnahme aus den Kombinationen ML-Standard mit der TT-Extrakt-Charge 155, aus den ML-Liposomen und in Kombination mit den TT-Liposomen durch die 143B-Zelllinie	64
Abb. 28: ML-Aufnahme aus den <i>Viscum</i> -Extrakten ohne Zugabe von den TT-Extrakten	65
Abb. 29: ML-Aufnahme aus dem <i>Viscum</i> -Extrakt mit dem TT-Extrakt-Zusatz (<i>Viscum</i> TT).....	65
Abb. 30: ML-Aufnahme aus den ML-Liposomen	66

Abb. 31: ML-Aufnahme aus dem ML-Standard und den ML-Liposomen.....	66
Abb. 32: Echtzeitanalyse der 143B-Zellen mit dem ML-Standard über 52 Stunden.....	68
Abb. 33: Zytotoxizitätsuntersuchung nach der Inkubation mit dem ML-Standard.....	68
Abb. 34: Echtzeitanalyse der 143B-Zellen mit der Viscum-Extrakt-Charge 155 über 52 Stunden.	69
Abb. 35: Das Zellwachstum auf der iCelligence®-Platte	70
Abb. 36: Zytotoxizitätsuntersuchung nach der Inkubation mit der Viscum-Extrakt-Charge 155....	70
Abb. 37: Echtzeitanalyse der 143B-Zellen mit dem ML-Standard und mit der Viscum-Extrakt-Charge 155	71
Abb. 38: Zytotoxizitätsuntersuchung nach der Inkubation mit dem ML-Standard und mit der Viscum-Extrakt-Charge 155	72
Abb. 39: Echtzeitanalyse von 143B-Zellen mit dreistündiger Inkubation mit der TT-Extrakt-Charge 155.....	73
Abb. 40: Echtzeitanalyse der 143B-Zellen mit der TT-Extrakt-Charge 155 über 80 Stunden	73
Abb. 41: Zytotoxizitätsuntersuchung nach der Inkubation mit der TT-Extrakt-Charge 155	74
Abb. 42: Echtzeitanalyse der 143B-Zellen mit erfolgter Inkubation mit der Kombination ML+TT75	
Abb. 43: Zytotoxizitätsuntersuchung nach der Inkubation mit der Kombination ML+TT.....	75
Abb. 44: Echtzeitanalyse der 143B-Zellen mit erfolgter Inkubation aus ML und ML+TT	76
Abb. 45: Zytotoxizitätsuntersuchung nach der Inkubation mit ML und ML+TT	76
Abb. 46: Echtzeitanalyse der 143B-Zellen mit erfolgter Inkubation mit der Kombination ML (11 ng/mL ML) + TT	77
Abb. 47: Zytotoxizitätsuntersuchung nach der Inkubation mit ML+TT (konstante ML-Konzentration).....	78
Abb. 48: Echtzeitanalyse der 143B-Zellen mit erfolgter Inkubation mit ML, TT oder ML+TT (bei konstanter ML-Konzentration von 11 ng/mL)	78
Abb. 49: Echtzeitanalyse der 143B-Zellen mit Inkubation mit der Kombination ViscumTT	79
Abb. 50: Zytotoxizitätsuntersuchung nach der Inkubation mit ViscumTT.....	80
Abb. 51: Echtzeitanalyse der 143B-Zellen mit erfolgter Inkubation mit Viscum und ViscumTT ..	80
Abb. 52: Zytotoxizitätsuntersuchung nach der Inkubation mit Viscum und ViscumTT	81
Abb. 53: Echtzeitanalyse der 143B-Zellen mit erfolgter Inkubation mit ML+TT und ViscumTT..	82
Abb. 54: Zytotoxizitätsuntersuchung nach der Inkubation mit ML+TT und ViscumTT.....	82
Abb. 55: Echtzeitanalyse der 143B-Zellen mit erfolgter Inkubation mit ML und ML-Liposomen.	83
Abb. 56: Zytotoxizitätsuntersuchung nach der Inkubation mit ML und ML-Liposomen.....	84
Abb. 57: Echtzeitanalyse der 143B-Zellen mit erfolgter Inkubation mit TT und TT-Liposomen...	85
Abb. 58: Zytotoxizitätsuntersuchung nach der Inkubation mit TT und TT-Liposomen	85
Abb. 59: Echtzeitanalyse der 143B-Zellen mit erfolgter Inkubation mit ML, TT, ML- und TT-Liposomen (1)	86

Abb. 60: Echtzeitanalyse der 143B-Zellen mit erfolgter Inkubation mit ML, TT, ML- und TT-Liposomen (2)	86
Abb. 61: Zytotoxizitätsuntersuchung nach der Inkubation mit ML, TT, ML- und TT-Liposomen.	87
Abb. 62: Fluoreszenzmikroskopische Bilder von 143B-Zellen nach der Inkubation mit dem fluoreszenzmarkiertem ML-Standard	88
Abb. 63: Fluoreszenzmikroskopische Bilder von 143B-Zellen nach 45-minütiger Inkubation mit dem ML-Standard	89
Abb. 64: Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen der Vesikelverschmelzung und anschließenden Lyse in 143B-Zellen.....	90
Abb. 65: Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen von 143B-Zellen mit ML-Bläschen-Bildung...	90
Abb. 66: Fluoreszenzmikroskopische Bilder von 143B nach 45-minütiger Inkubation mit dem ML-Standard und einem TT-Extrakt-Zusatz.....	91
Abb. 67: Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen von 143B-Zellen über 70 Minuten mit erhöhter TT-Zugabe.....	92
Abb. 68: Fluoreszenzmikroskopische Bilder von 143B nach 4,5-stündiger Inkubation mit dem ML-Standard.....	93
Abb. 69: Fluoreszenzmikroskopische Bilder von 143B nach 22-stündiger Inkubation mit dem ML-Standard und mit β -CD	94
Abb. 70: Strukturformeln von Erythrodiol (A) und Oleanolsäure (B).....	95
Abb. 71: GC / FID-Chromatogramm einer Mischung aus 5,5 μ g/mL Erythrodiol und 2,17 μ g/mL OA in Chloroform	96
Abb. 72: Linearität der GC / FID-Methode.....	99
Abb. 73: Linearität der GC / FID-Methode im Serum	101
Abb. 74: GC / FID-Chromatogrammausschnitt der Serumprobe des Tiers F3 mit zugesetztem 6,1 μ g/mL Erythrodiol	105

9 Tabellenverzeichnis

Tab. 1: Eigenschaften von ML-I–III	2
Tab. 2: TT der Mistel mit dem Oleanen-Grundkörper	5
Tab. 3: TT der Mistel mit dem Lupan-Grundkörper	5
Tab. 4: TT der Mistel mit dem Ursen-Grundkörper.....	6
Tab. 5: Untersuchte Fertigarzneimittel.....	16
Tab. 6: Extrakte der Birken AG	17
Tab. 7: Fließmittelgradient der HPLC-Methode	25
Tab. 8: Verwendete ML- und OA-Konzentrationen im THP-1-Zellmodell	29
Tab. 9: Verwendete ML- und OA-Konzentrationen im HL-60-Zellmodell.....	30
Tab. 10: Verwendete ML- und OA-Extrakt-Konzentrationen im TC-71- und 143B-Zellmodell....	30
Tab. 11: Verwendete OA- und 2-HP- β -CD-Konzentrationen im 143B-Zellmodell.....	31
Tab. 12: Verwendete ML- und OA-Konzentrationen der ML- und der TT-Liposomen im THP-1- und 143B-Zellmodell	32
Tab. 13: Verwendete ML-Standard-Konzentrationen und die dazugehörigen Inkubationszeiten ...	37
Tab. 14: Temperaturgradient des Säulenofens (Methodensequenz)	38
Tab. 15: Temperaturgradient des Säulenofens (Spülsequenz)	39
Tab. 16: Nachweis- und Bestimmungsgrenze der ELISA-Methoden in PBST	41
Tab. 17: Nachweis- und Bestimmungsgrenze des A-Ketten-ELISAs im FBS-haltigem Medium ..	41
Tab. 18: Nachweis- und Bestimmungsgrenze des A-Ketten-ELISAs im Tiermodell.....	41
Tab. 19: Quantifizierung der Fertigarzneimittel.....	42
Tab. 20: Quantifizierung der Viscum-Extrakt-Chargen.....	43
Tab. 21: Wiederfindungsrate des MLs im Schweineserum.....	44
Tab. 22: Daten des In-vivo-Modells (Mono-Versuch mit der Viscum-Extrakt-Charge 161).....	45
Tab. 23: Ermittelte ML-Konzentration im <i>In-vivo</i> -Modell (Mono-Versuch)	46
Tab. 24: Daten des <i>In-vivo</i> -Modells (Kombinationsversuch mit der Viscum- und der TT-Extrakt-Charge 161).....	46
Tab. 25: Ermittelte ML-Konzentration im <i>In-vivo</i> -Modell (Kombinationsversuch)	47
Tab. 26: Partikelgröße, Polydispersitätsindex und Zetapotential der leeren und der TT-Liposomen (1).....	48
Tab. 27: Partikelgröße, Polydispersitätsindex und Zetapotential der TT-Liposomen (2).....	49
Tab. 28: Partikelgröße, Polydispersitätsindex und Zetapotential der ML-Liposomen.....	49
Tab. 29: OA-Gehalt und Verkapselungseffizienz der TT-Liposomen (1)	50
Tab. 30: OA-Gehalt und Verkapselungseffizienz der TT-Liposomen (2)	51

Tab. 31: ML-Gehalt, Beladung und Verkapselungseffizienz der ML-Liposomen	51
Tab. 32: Adsorption und Verkapselungseffizienz der ML-Liposomen.....	52
Tab. 33: ML-Aufnahme durch die THP-1-Zellen	58
Tab. 34: ML-Aufnahme durch die HL-60-Zellen	59
Tab. 35: ML-Aufnahme durch die TC-71-Zellen	61
Tab. 36: Einfluss von 2-HP- β -CD auf die ML-Aufnahme durch die 143B-Zellen.....	62
Tab. 37: Bestimmung der Präzision	97
Tab. 38: Laborpräzision	97
Tab. 39: OA-Konzentration (Soll / Ist) für den Linearitätsnachweis	98
Tab. 40: Nachweis- und Bestimmungsgrenze	99
Tab. 41: Bestimmung der Präzision (Serum)	100
Tab. 42: OA-Konzentration (Soll / Ist) für den Linearitätsnachweis (Serum)	101
Tab. 43: Nachweis- und Bestimmungsgrenze im Serum	102
Tab. 44: Daten des <i>In-vivo</i> -Modells (Mono- und Kombinationsversuch mit <i>Viscum</i> - und TT- Extrakt-Charge 161).....	103
Tab. 45: Ermittelte OA-Konzentration im <i>In-vivo</i> -Modell (Mono-Versuch).....	104
Tab. 46: Ermittelte OA-Konzentration im <i>In-vivo</i> -Modell (Kombinationsversuch).....	104

10 Publikationsverzeichnis

Veröffentlichungen in Fachzeitschriften

Mulsow K, Enzlein T, Delebinski C, Jaeger S, Seifert G, Melzig MF (2016) Impact of mistletoe triterpene acids on the uptake of mistletoe lectin by cultured tumor cells. PLoS ONE 11(4): e0153825

Mulsow K, Eidenschink J, Melzig MF (2015) FT-IR Method for the Quantification of Isoflavonol Glycosides in Nutritional Supplements of Soy (*Glycine max* (L.) MERR.) Sci Pharm. 83: 377-386

Delebinski CI, Twardziok M, Kleinsimon S, Hoff F, Mulsow K, Rolff J, Jäger S, Eggert A, Seifert G (2015) A Natural Combination Extract of *Viscum album* L. Containing Both Triterpene Acids and Lectins Is Highly Effective against AML *In Vivo*. PLoS ONE 10(8): e0133892

Vorträge

Mulsow K, Enzlein T, Delebinski C, Jaeger S, Seifert G, Melzig MF (2015) Study of the time-dependent uptake of mistletoe lectin by cultured tumor cells. 6. Mistelsymposium, Nonnweiler, 12.–14. 11. 2015

Arbeiten in Buchform

Mulsow K, Enzlein T, Delebinski C, Jaeger S, Seifert G, Melzig MF (2016) Untersuchung der zeitabhängigen Aufnahme von Mistellektin durch kultivierte Tumorzellen. Die Mistel in der Tumorthherapie – 4, aktueller Stand der Forschung und klinische Anwendung. Im Druck

Mulsow K (2012) IR-Untersuchungen von Nahrungsergänzungsmitteln mit Soja (*Glycine max* (L.) MERR.). Diplomarbeit Ernst-Moritz-Arndt-Universität Greifswald

Poster

Mulsow K, Rolff J, Jaeger S, Melzig MF (2015) GC / FID-Quantification of Oleanolic acid in mouse serum after treatment with mistletoe extract. 9th Joint Natural Products Conference 2016, Kopenhagen, Dänemark, 24.–27. 07. 2016, Im Druck

Mulsow K, Enzlein T, Delebinski C, Jaeger S, Seifert G, Melzig MF (2015) Investigation of the triterpene-dependent uptake of mistletoe lectin by adherent and suspension cells. Havel Spree Colloquium 2015, Berlin, 24. 11. 2015

Mulsow K, Enzlein T, Delebinski C, Jaeger S, Seifert G, Melzig MF (2015) Untersuchung der zeitabhängigen Aufnahme von Mistlektin durch kultivierte Tumorzellen. Kongress 2015 der Gesellschaft für Phytotherapie e.V.: „Die Phytotherapie im therapeutischen Konzert“, Rostock-Warnemünde, 08.–10. 10. 2015

Mulsow K, Enzlein T, Delebinski C, Jaeger S, Seifert G, Melzig MF (2015) Study of the time-dependent uptake of mistletoe lectin by cultured tumor cells. 63rd International Congress and Annual Meeting of the Society for Medicinal Plant and Natural Product Research, Budapest, Ungarn, 23.–27. 08. 2015

Mulsow K, Melzig MF (2014) Mistletoe lectin quantification by two different enzyme linked immunosorbent assays. 62nd International Congress and Annual Meeting of the Society for Medicinal Plant and Natural Product Research, Guimaraes, Portugal, 31. 08.–04. 09. 2014

Mulsow K, Melzig MF (2014) Mistletoe lectin I quantification by two different enzyme linked immunosorbent assays. Deutsche Pharmazeutische Gesellschaft (DPhG), Landesgruppe Berlin-Brandenburg: „Der wissenschaftliche Nachwuchs stellt sich vor.“, Berlin, 04. 07. 2014

11 Lebenslauf

Der Lebenslauf ist in der Online-Version aus Gründen des Datenschutzes nicht enthalten.

Der Lebenslauf ist in der Online-Version aus Gründen des Datenschutzes nicht enthalten.

12 Danksagung

Mein besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr. M. F. Melzig für die Ermöglichung dieser Arbeit und die Bereitstellung des sehr interessanten, anwendungsnahen Themas. Ich danke ihm für sein Engagement, für die wissenschaftliche und praktische Unterstützung sowie für seine ständige Ansprechbereitschaft. Stets war er an meinem Fortschritt interessiert, ließ mir die erforderlichen experimentellen Freiräume, forderte und förderte mich kontinuierlich durch neue wissenschaftliche Herausforderungen.

Herrn Prof. Dr. H. Fuchs (Charité Berlin) möchte ich meinen Dank für die Erstellung des Zweitgutachtens aussprechen.

Dr. A. Weng (FU Berlin) danke ich sehr für zahlreiche nützliche Tipps und Anregungen sowie für die Zusammenarbeit beim Live-Cell-Imaging.

Ein besonderer Dank gilt ebenfalls Dr. S. Jäger (Birken AG), der stets für Nachschub an Mistelextrakten sorgte und für mich immer ein offenes Ohr hatte und sich gerne mit mir in die Analytik vertiefte. Weiterer Dank gilt Herrn Prof. Dr. G. Seifert (Charité Berlin) und seiner Arbeitsgruppe für die Unterstützung bei der Durchflusszytometrie und den wissenschaftlichen Austausch über die Mistel und ihre Anwendung. Des Weiteren möchte ich mich bei Herrn Dr. B. Wiesner (FMP Berlin) und seiner Gruppe für die Verwendung des konfokalen Laser Scanning Mikroskops LSM 710 bedanken.

Bei Herrn Prof. Dr. H. Pertz (FU Berlin) möchte ich mich bedanken für die Herstellung des Kontaktes zum Schlachthof in Rüdersdorf und vor allem für die gemeinsame Zeit im biochemischen Praktikum Biologie III, das sowohl mit diversen wissenschaftlichen Gesprächen als auch mit viel Humor gefüllt wurde.

In besonderem Maße möchte ich mich bei Frau Dr. J. Lazar-Schurreit (FU Berlin) bedanken, die es u. a. durch ihre verständnisvolle und fürsorgliche Art verstand, mich besonders in schwierigen Situationen zu motivieren. Ebenfalls bedanken möchte ich mich bei C. Grimm und T. Enzlein für ihre Unterstützung bei der Durchführung einiger Vorversuche und die Generierung von Ergebnissen.

Mein Dank gilt dem gesamten Arbeitskreis für die fachkundige Hilfsbereitschaft und die freundschaftliche Arbeitsatmosphäre. Bei Frau C. Görick (FU Berlin) möchte ich mich bedanken, da ihre Unterstützung und Hilfsbereitschaft während der gesamten Phase, insbesondere bei der GC / FID-Analytik, stets präsent war. In besonderem Maße möchte ich mich bei Frau T. Buchholz (FU Berlin) für die gemeinsame Laborzeit, konstruktive Gespräche und für die gewonnene Freundschaft bedanken.

Ebenfalls bedanken möchte ich mich bei meinem besten Freund, Robert, der mir stets zur Seite stand und durch seine Korrekturen sowohl im englischen als auch im deutschen Bereich in der gesamten Promotionszeit eine sehr große Hilfe war.

Ein besonderer Dank gilt meinen Großeltern, meinem Bruder und vor allem meinen Eltern! Die gesamte Zeit über wart ihr für mich da und habt den Glauben an mich nie verloren. Vielen Dank für euer Vertrauen, eure Hilfsbereitschaft und eure unendliche Liebe!

13 Eidesstattliche Erklärung

Hiermit erkläre ich, dass ich die vorliegende Arbeit selbständig und nur unter Verwendung der angegebenen Literatur und Hilfsmittel angefertigt habe.

Berlin, den 10.05.2016

Katharina Mulsow