

8. Diskussion

8.1. Phytochemische Bearbeitung

In der vorliegenden Arbeit konnte ein Beitrag geleistet werden, das Spektrum der bekannten Verbindungen aus *Pelargonium sidoides* zu erweitern. Dabei wurde ein Schwerpunkt auf die Bearbeitung der oberirdischen Pflanzenteile gelegt, da die Extraktion der Wurzeln bereits Teil einer früheren Arbeit war. Ebenso ist das Inhaltsstoffspektrum der nah verwandten Art *P. reniforme* durch eine frühere Arbeit grundlegend bekannt, so dass durch die vorliegenden Ergebnisse ein chemotaxonomischer Vergleich beider Arten möglich wird.

Mit Fraxetin konnte aus den oberirdischen Pflanzenteilen ein weiteres, für die Pflanze typisches hochoxygeniertes Cumarin isoliert werden, das dc-Tests zufolge ebenfalls in den Wurzeln zu finden ist. Es konnten aus dem oberirdischen Pflanzenmaterial die Cumarinykoside Fraxetin-7- β -glucopyranosid und Magnoliosid sowie das Cumarinsulfat 6,7-Dihydroxy-8-cumarinsulfat erstmals isoliert werden. Dc-Untersuchungen zufolge sind diese Verbindungen ebenfalls im Wurzelmaterial der Pflanze enthalten, fehlen jedoch weitgehend in der nah verwandten Art *P. reniforme*. Scopoletin und Umckalin, die aus den Wurzeln schon bekannt sind, finden sich auch im Kraut in größeren Mengen wieder. Das Vorliegen der auf DC-Platten leicht nachzuweisenden Cumarine Umckalin, Fraxetin-7- β -glucopyranosid und Magnoliosid ermöglichen demnach eine eindeutige Abgrenzung von der nah verwandten Art *P. reniforme*, die aus dem oberirdischen und damit nachwachsenden Pflanzenmaterial durchgeführt werden kann. Diese Abgrenzung beider Arten voneinander hat in der Vergangenheit Probleme bereitet, und konnte vor allem durch den gezielten Anbau in den letzten Jahren umgangen werden, so dass diese Erkenntnis eine einfache Möglichkeit bietet, die Artzuordnung mit Hilfe von dc-Tests des oberirdischen Pflanzenmaterials vorzunehmen.

Im Kraut sind Flavonoide und Flavonoidglykoside und -glykosyle enthalten, die nach dc-Vergleichen im Wurzelmaterial fehlen. Es konnten im Rahmen dieser Arbeit (+)-(2*R*,3*R*)-Dihydrokämpferol-3- β -glucopyranosid, Orientin, Orientin-2''-gallat, Isoorientin-2''-gallat sowie (-)-Epigallocatechin-3-gallat erstmals aus dieser Pflanzenquelle isoliert werden. Die Konfiguration des schon bekannten Taxifolin-3- β -glucopyranosid wie auch des neuen Dihydrokämpferol-3- β -glucopyranosids an den Atomen 2 und 3 konnte durch CD

Messung eindeutig mit *2R,3R* bestimmt worden. Für das hier isolierte (+)-(*2R,3R*)-Taxifolin-3- β -glucopyranosid konnte durch die CD Messung und die Bestimmung der optischen Drehung eine völlige Übereinstimmung mit Literaturwerten für dieses Taxifolinderivat [(*2R,3R*)-(+)-Glucodistylin, (Dübeler *et al.*, 1996)] gefunden werden. Die Datenlage für das strukturverwandte Dihydrokämpferol-3- β -glucopyranosid beweist ebenfalls das Vorliegen des (*2R,3R*)-(+)-Dihydrokämpferol-3- β -glucopyranosids, dessen Aglykon Dihydro-kämpferol bereits in *P. reniforme* gefunden wurde (Latté, 2000). Bei Taxifolin handelt es sich um einen weit verbreiteten Naturstoff, das Dihydrokämpferolderivat hingegen, welches sich nur durch Fehlen einer OH-Gruppe am B-Ring davon unterscheidet, kommt seltener vor, allerdings eignen sich beide aufgrund der weiten Verbreitung innerhalb des Pflanzenreiches nicht für chemotaxonomische Betrachtungen (Harborne, 1994).

Die galloylierten Verbindungen Orientin und Isoorientin sind bisher nur aus der nah verwandten Art *P. reniforme* isoliert worden (Latté, 1999). Allgemein sind solche über die OH-Gruppe am C-2 des Zucker acylierten Verbindungen in der Natur sehr selten und nur aus wenigen Quellen bekannt (Sood *et al.*, 1976; Chopin *et al.*, 1984). Es wäre also interessant zu sehen, ob und in welchen anderen Pflanzenvertretern der Untergattung *Pelargonium*, der Sektion *Peristera* oder auch der Untersektion *Reniformia* diese Verbindungsklasse ebenfalls anzutreffen ist. In einem dc-Screening mit dem Ziel der taxonomischen Einordnung der *Pelargonium* Arten wurde bislang nicht auf galloylierte Vertreter geprüft (Williams, 2000; Dreyer *et al.*, 1992). Die Sektion *Reniformia* wurde erst vor kurzem aufgrund unterschiedlicher Inhaltsstoffmuster ihrer Vertreter aus der Sektion *Cortusina* als eigene Sektion ausgegliedert (Dreyer *et al.*, 1992), nun jedoch aufgrund neuerer Untersuchungen der Sektion *Peristera* als Untersektion unterstellt. Die Sektion *Cortusina* wurde der Sektion *Otidia* als Untersektion zugeordnet (Bakker *et al.*, 2000). Die Vielzahl von Untersuchungen an *Pelargonium* Arten in den letzten Jahren, die eine Neuordnung der Systematik zur Folge hatten, machen deutlich, dass auf diesem Gebiet noch etliche Untersuchungen auf chemotaxonomischer oder auch genetischer Ebene nötig sind, um die Verwandtschaftsbeziehungen eindeutig zu klären.

(-)-(*2R,3R*)-Epigallocatechin-3-gallat konnte hier erstmals aus der Pflanze isoliert werden; dc-Untersuchungen zufolge kommt es weder in den Wurzeln, noch in der verwandten Art *P. reniforme* in größeren Mengen vor. (-)-(*2R,3R*)-Epigallocatechin-3-gallat wird als Hauptbestandteil des grünen Tees und auch der Polyphenolfractionen des Rotweins beschrieben (Nonaka, 1984). Es liegen etliche Untersuchungen zur biologischen Aktivität

der Substanz vor, welche die bekannten positiven Effekte (Vinson *et al.*, 2001; da Luz *et al.*, 1999; Rimm *et al.*, 1999; Renaud *et al.*, 1998; Hayek *et al.*, 1997; Uchida *et al.*, 1992; Zhu und Xiao, 1991) wie antioxidative Potenz und Verminderung von Krebsentstehung (Hibasami *et al.*, 1996, 1998; Yang *et al.*, 1998; Achiwa *et al.*, 1997) bis zur gefäßprotektiven bzw. gefäßerweiternden Wirkung (Sanae *et al.*, 2002), die dem Konsum von grünem Tee und von Rotwein nachgesagt werden, belegen. Bei Watt und Breyer-Brandwyk (1962) findet sich ein Hinweis auf die traditionelle Verwendung von Pelargonium-Blättern zur Teebereitung, was möglicherweise eine Parallele zur Anwendung des grünen Tees in Asien darstellt.

8.2. Biologische Aktivitäten

Aufgrund der traditionellen Verwendung von *Pelargonium* Arten aus dem südlichen Afrika gegen Tuberkulose, wurden die Extrakte der ober- und unterirdischen Pflanzenteile sowie die durch Ausschütteln daraus erhaltener Fraktionen beider dort verwendeten Drogen *P. reniforme* und *P. sidoides* in einem MTT-Viabilitätstest *in vitro* gegen zwei Mykobakterienstämme getestet. Es konnte weder bei den Extrakten noch bei den Fraktionen eine signifikante Hemmung des Mykobakterienwachstums festgestellt werden. In dem hier angewandten Testmodell kann jedoch nur die direkte Wirkung der Testsubstanzen auf die Mykobakterien bestimmt werden. Da Mykobakterien intrazelluläre Erreger mit Makrophagen als Wirtszellen sind, spielt bei der Tuberkuloseabwehr vor allem das unspezifische Immunsystem des Körpers, nämlich die cytokinvermittelte Aktivierung von Makrophagen, eine große Rolle (Flesch und Kaufmann, 1993). Es konnte in der Vergangenheit gezeigt werden (Kayser *et al.*, 2001; Kolodziej, 2002), dass *Pelargonium* Extrakte und Einzelsubstanzen einen Effekt auf die Cytokinproduktion und damit auf die Aktivierung von Makrophagen haben, so dass sich über diesen Mechanismus die traditionell beschriebene Anwendung der Droge gegen Tuberkulose erklären ließe. In Screenings zur Identifizierung von antituberkulotisch wirksamen Pflanzen werden jedoch ebenfalls routinemässig direkte Viabilitätstests eingesetzt (van den Berghe und Vlietinck, 1991), ohne zu berücksichtigen, dass die Pflanzenextrakte bzw. Wirkstoffe normalerweise gar nicht direkt in Kontakt mit den Mykobakterien kommen. Es handelt sich also bei dem einfachen Viabilitäts-Assay um ein Standardverfahren, das sich aber für die hier bearbeitete Pflanze nicht zu eignen scheint, da kein signifikanter direkter Effekt auf die Bakterien zu

erkennen war. Bei der *in vitro* Prüfung der traditionellen Anwendungsgebieten von Pflanzen muss also vor allem auch auf die Auswahl des Testsystems geachtet werden, mit dem man arbeiten kann. So scheint hier die Pflanze zwar einen Effekt auf die cytokinvermittelte Makrophagenaktivierung zu besitzen, jedoch keinen direkten Effekt auf das Mykobakterien Wachstum.

Eine weitere traditionelle Anwendung der oberirdischen Pflanzenteile zur Förderung der Wundheilung könnte ebenfalls auf einen modulierenden Effekt auf das Immunsystem hinweisen. Pflanzen mit einem vergleichbaren Wirkspektrum, das Infektionsabwehr wie auch Wundheilung beinhaltet, wurden in einer Arbeit von Diallo *et al.* (2001) ausgewählt und deren Effekt auf das Komplement-System getestet. Das Komplement-System ist ein weiterer Ansatzpunkt für Substanzen oder Pflanzenextrakte, einen Effekt auf das unspezifische Immunsystem auszuüben. Es handelt sich dabei um ein komplexes System, dessen Bestandteile Entzündungsreaktionen hervorrufen aber auch Makrophagen aktivieren können. Es bietet prinzipiell viele Angriffspunkte für mechanistische Studien zur Wirkweise von Extrakten oder Substanzen (Wagner *et al.*, 1999).

Der Praktikabilität wegen werden solche Untersuchungen zunächst mit einem einfachen Anti-Komplement-Assay durchgeführt, das hemmende, wie auch aktivierende Effekte von Proben auf das Komplement-System ausschließlich in Form einer Hemmung der komplementinduzierten Hämolyse von Schaferythrozyten ausdrücken kann. Es erlaubt also keine Aussage darüber, ob eine Probe das Komplement-System aktiviert oder hemmt. Dies ist durch die 30 minütige Präinkubation der Proben mit dem Komplement-Serum und der kurzen Halbwertszeit der aktivierten Komplement-Faktoren bedingt, wodurch aktivierte Komplement-Faktoren nach 30 Minuten Inkubation nicht mehr zur Verfügung stehen und so ebenfalls eine Hemmung der Hämolyse induziert wird.

Von den im Rahmen der Arbeit getesteten Extrakten und Fraktionen zeigten der Gesamtextrakt der oberirdischen Pflanzenteile, die Wasser- sowie die Dichlormethan-Fraktion im Testsystem einen starken hemmenden Effekt auf das Komplement-System. Unter den getesteten Substanzen konnten jedoch nur für Isoorientin-2''-gallat und für (-)-Epigallocatechin-3-gallat ein moderater Effekt gefunden werden. Diese Ergebnisse korrelieren auch mit Untersuchungen, die Polysaccharide oder Polysaccharidfraktionen als aktive Komponenten von Pflanzenextrakten beschreiben (Alban *et al.*, 2002; Diallo *et al.*, 2001). Pieters *et al.* (1999) haben für eine Reihe von pflanzlichen Sekundärstoffen die Aktivität auf das Komplement-System bestimmt und für (-)-Epigallocatechin einen

IC₅₀-Wert von 18 µM beschrieben, während (-)-Epicatechin und (+)-Catechin nur Werte von >600 µM zeigten. Demnach scheinen drei OH-Gruppen am B-Ring für die Aktivität nötig zu sein, der Gallussäure-Rest in 3-Position jedoch wieder zu einem Aktivitätsverlust zu führen [(-)-Epigallocatechin-3-gallat, IC₅₀=71µM]. Außerdem haben Pieters *et al.* (1999) eine Reihe von Flavonoiden untersucht. Für die getesteten Flavone zeigten Quercetin (IC₅₀=53 µM) und Myricetin (IC₅₀=68 µM) einen mit dem hier getesteten Isoorientin-2''-gallat (IC₅₀=54 µM) vergleichbaren moderaten Effekt auf den klassischen Aktivierungsweg, während die an Position 3 glucosidierten Vertreter Quercitrin, Rutin und Hyperosid Werte >350 µM aufwiesen. Demnach scheint eine dritte OH-Gruppe am B-Ring, eine OH-Gruppe an Position 3 sowie der galloylierte Glucose-Rest an Position 6 keinen Einfluss auf die Wirkung der Substanz auf den klassischen Aktivierungsweg des Komplement-Systems zu haben.

Diese Ergebnisse ermöglichen allerdings nicht, zu entscheiden, welchen Effekt die Extrakte und Substanzen aus *P. sidoides* auf das Komplement-System ausüben. Die traditionelle Anwendung der oberirdischen Pflanzenteile bei der Wundheilung sprechen allerdings für eine Aktivierung des Komplement-Systems. Die Wundheilung gliedert sich in drei Phasen, wovon die erste auch inflammatorische Phase genannt wird und zunächst der Blutungsstillung dient und nachfolgend die Bildung von Narbengewebe einleitet. Der Hageman Faktor der Blutgerinnungskaskade wird durch Oberflächenstrukturen von verletztem Gewebe aktiviert und leitet zum einen die intrinsische Blutgerinnungskaskade ein, zum anderen aktiviert er den klassischen Weg des Komplement-Systems. Die Komplement-Faktoren C5a und C567 wirken chemotaktisch auf Neutrophile Granulozyten, die Faktoren C3a, C4a und C5a bewirken die Degranulation von Mastzellen und sorgen über die Histaminfreisetzung für eine verstärkte Durchblutung des geschädigten Gewebes und leiten so eine Entzündung ein. Komplementaktivierende Substanzen können somit den Prozess der Wundheilung beschleunigen. Die in *P. sidoides* in größeren Mengen enthaltenen Gerbstoffe könnten zusätzlich einen antiseptischen Effekt ausüben. Die traditionelle wie auch aktuell durch klinische Studien an einem Spezial-Extrakt (Eps® 7630) belegte Anwendung der Wurzeln von *P. sidoides* bei Infektionen des Respirationstraktes (Bereznoy *et al.*, 2003; Matthys *et al.*, 2003; Berber und Del-Rio-Navarro, 2001) sowie auch traditionell bei Tuberkulose deuten ebenfalls auf eine Komplement-Aktivierung hin. Allerdings sind im Rahmen der Arbeit keine Untersuchungen an Extrakten aus dem Wurzelmaterial der Pflanzen durchgeführt worden. Um den hier gefundenen Effekt der oberirdischen Extrakte auf das Komplement-System

eindeutig zu definieren, sind weitere Untersuchungen nötig, die eine Unterscheidung zwischen aktivierenden und hemmenden Effekten ermöglichen.

Dazu schlägt Alban *et al.* (2002) eine Modifikation in der Durchführung des Anti-Komplement-Assays vor, mit dessen Hilfe einfach zwischen echten Aktivatoren und Inhibitoren unterschieden werden kann. Dazu muss für eine Probe der Test sowohl mit einer Präinkubation von 30 Minuten wie auch ohne durchgeführt werden. Echte Aktivatoren des Komplement-Systems weisen dann ohne Präinkubationszeit wesentlich höhere IC_{50} -Werte auf als im klassischen Assay mit 30 minütiger Inkubation vor Zugabe der Schaferythrozyten, während Inhibitoren keinen unterschiedlichen IC_{50} -Werte in beiden Assays zeigen. Es wäre also sinnvoll, mit Hilfe dieses modifizierten Assays, Extrakte und Fraktionen sowohl aus den oberirdischen wie auch den unterirdischen Pflanzenteilen von *P. sidoides* erneut auf einen Effekt auf das Komplement-System hin zu untersuchen, speziell vor dem Hintergrund, dass vor allem Polysaccharide oft als aktive Komponenten in Pflanzenextrakten identifiziert werden konnten.

Im Born-Test können direkte Effekte von Testsubstanzen auf die Thrombozyten-Aggregation festgestellt werden. Die Thrombozytenfunktion, die letztlich über die Aktivierung des GP-IIa/lib-Rezeptors auf der Thrombozytenmembran die Bindung von Fibrinogen ermöglicht, wird durch eine Reihe von Substanzen beeinflusst, vermittelt über deren Bindung an spezifische Rezeptoren auf der Membran. Die Hemmung der Thrombozytenaggregation kann demnach durch Blockade der entsprechenden Rezeptoren auf den Thrombozyten oder durch verminderte Bildung der Mediatorsubstanzen (z.B. ASS) erreicht werden. Die im Rahmen der Arbeit getesteten einfachen Cumarine zeigten keinen Effekt auf die Thrombozytenfunktion.

Weitere Vertreter aus der Substanzklasse der Cumarine wie Warfarin und Phenprocoumon werden als sogenannte Vitamin-K-Antagonisten medizinisch zur Hemmung der Blutgerinnung eingesetzt. Diese können aufgrund struktureller Verwandtschaft zum Vitamin-K an das regenerierende Enzym binden und so die Vitamin-K abhängige Produktion einiger Gerinnungsfaktoren in der Leber langfristig verhindern. Einfache Cumarine, wie sie aus *P. sidoides* isoliert wurden, bringen jedoch diese strukturellen Voraussetzungen für die Hemmung der Vitamin-K-Reduktase nicht mit (Substitution an den Positionen 3 und 4 des Cumarinringsystems), so dass von ihnen kein solcher, indirekter Effekt auf die Blutgerinnung zu erwarten ist (Silverman, 1980).