

**Beitrag zur Kenntnis
der Inhaltsstoffe und der Wirkung
des *Pelargonium sidoides* Spezialextraktes
EPs[®] 7630**



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
Aneta Janecki
aus Siemianowice Śląskie**

2012

Diese Arbeit wurde vom Dezember 2005 bis Mai 2012 angefertigt unter der Leitung von Professor Dr. H. Kolodziej am Institut für Pharmazie, Pharmazeutische Biologie, Freie Universität Berlin.

1. Gutachter: Herr Professor Dr. H. Kolodziej, Freie Universität Berlin,
Fachbereich Biologie, Chemie, Pharmazie
2. Gutachter: Herr Professor Dr. Oliver Kayser, Technische Universität
Dortmund, FK Bio- & Chemieingenieurwesen

Disputation am 09.07.2012

Danksagung

Für die Überlassung des Themas, wertvolle Diskussionen und Geduld möchte ich mich ganz herzlich bei Prof. H. Kolodziej bedanken.

Darüber hinaus gilt mein Dank

- der Firma Dr. Willmar Schwabe & Co KG, Karlsruhe, für die Bereitstellung von Extrakten und die Ermöglichung von Experimenten mit L-MUNNANA,
- Herrn Prof Dr. R. Burger und Dr. A.F. Kiderlen für die Ermöglichung von immunologischen Arbeiten am Robert Koch Institut, Berlin, sowie den Mitarbeitern Dr. C. Thäle, Frau U. Laube, Frau E. Radam und Frau P. Matzk für die tatkräftige Unterstützung,
- Herrn Prof. Dr. U. Frank für die Möglichkeit als Hospitant am Institut für Krankenhaushygiene und Umweltmedizin, Freiburg, Experimente zur Adhäsionshemmung durchführen zu können, außerdem seinen Mitarbeitern Dr. A. Conrad und Frau I. Engels, für die Unterstützung bei der praktischen Umsetzung sowie Auswertung der Versuche,
- Herrn Prof. Dr. L. Pieters, Departement Farmaceutische Wetenschappen Universität Antwerpen, für die Durchführung von NMR-Messungen,
- Herrn Prof. M.F. Melzig und Herrn S.M Schwerdtfeger, Institut für Pharmazie, Pharmazeutische Biologie, Freie Universität Berlin, für die Zusammenarbeit beim Neuraminidaseinhibitionsassay,
- der Firma Roche, Ludwigshafen, für die freundliche Bereitstellung von Oseltamivircarboxylat,
- meinen Doktorandenkollegen für den regen Austausch und die Diskussionsbereitschaft.

Teile der vorliegenden Dissertation wurden bereits veröffentlicht

Originalarbeiten

JANECKI A UND KOLODZIEJ H. **2010**. Anti-adhesive activities of flavan-3-ols and proanthocyanidins in the interaction of group A-streptococci and human epithelial cells. *Molecules* 15: 7139-7152.

JANECKI A, CONRAD A, ENGELS I, FRANK U UND KOLODZIEJ H. **2011**. Evaluation of an aqueous-ethanolic extract from *Pelargonium sidoides* (EPs® 7630) for its activity against group A-streptococci adhesion to human HEp-2 epithelial cells. *J Ethnopharmacol* 133: 147-152.

Poster

JANECKI A, KIDERLEN AF UND KOLODZIEJ H. **2007**. NO-, TNF-, and IL-12-inducing activity of fractions of EPs® 7630. 55th International Congress and Annual Meeting of the Society for Medicinal Plant and Natural Product Research. 02.-06. September, Graz, Österreich.

JANECKI A, SCHWERTFEGER S, MELZIG MF UND KOLODZIEJ H. **2008**. In vitro inhibition of neuraminidase by EPs® 7630. Tagung der Deutschen Pharmazeutischen Gesellschaft, Landesgruppe Berlin-Brandenburg, 04. Juli, Berlin.

JANECKI A UND KOLODZIEJ H. **2009**. In vitro evaluation of EPs® 7630 for its ability to inhibit neuraminidase using sodium (4-methyl-umbelliferyl- α -D-N-acetylneuraminate) as substrate. 57th International Congress and Annual Meeting of the Society for Medicinal Plant and Natural Product Research. 16-20. Aug. Genf, Schweiz.

JANECKI A, THÄLE C, KIDERLEN AF UND KOLODZIEJ H. **2009**. Antiviral activity of EPs® 7630 as assessed in a fibroblast-virus protection assay. 57th International Congress and Annual Meeting of the Society for Medicinal Plant and Natural Product Research. 16-20. Aug. Genf, Schweiz.

JANECKI A, CONRAD A, FRANK U UND KOLODZIEJ H. **2010**. Characterization of the anti-adhesive principle of a *Pelargonium sidoides* root extract (EPs® 7630) in the interaction of group A-streptococci and human laryngeal epithelia cells. 58th International Congress and Annual Meeting of the Society for Medicinal Plant and Natural Product Research. 29. Aug. - 02. Sept. Berlin.

Vortrag

JANECKI A, CONRAD A, FRANK U UND KOLODZIEJ H. **2009**. Distinct fractions of *Pelargonium sidoides*-extract (EPs® 7630) inhibit adhesion of group A streptococci to epithelial cells. 7. Berliner Kongress Phytotherapie. 10.-12. Sept. Berlin.

Inhaltsverzeichnis

1.	Einleitung	1
1.1.	Geschichte des Phytopharmakons Umckaloabo®	2
1.2.	Systematik der Stammpflanzen	6
1.3.	Inhaltsstoffe aus dem Wurzelmaterial von <i>Pelargonium sidoides</i>	8
1.4.	Chemische Zusammensetzung von EPs® 7630.....	9
1.4.1.	Primärstoffwechselprodukte.....	9
1.4.2.	Sekundärstoffwechselprodukte	10
1.5.	Klinische Studien zur Wirksamkeit von Umckaloabo®	15
1.5.1.	Akute Bronchitis	15
1.5.2.	Tonsillopharyngitis	16
1.6.	Tierexperimentelle Studien zum Einfluss auf das Krankheitsverhalten.....	17
1.7.	<i>In vitro</i> Studien zur Wirkungsweise von EPs® 7630.....	18
1.7.1.	Antivirale Effekte	18
1.7.2.	Antibakterielle Aktivität.....	18
1.7.3.	Hemmung der Adhäsion von Bakterien an Epithelzellen	19
1.7.4.	Einfluss auf die Zilienschlagfrequenz des Flimmerepithels.....	19
1.7.5.	Immunmodulatorische Effekte	20
2.	Zielsetzung	21
3.	Material und Methoden	23
3.1.	Geräte.....	24
3.2.	Extrakte und Testsubstanzen	25
3.2.1.	EPs® 7630	25
3.2.2.	Weitere gerbstoffhaltige Pflanzenextrakte	26
3.2.3.	Reinsubstanzen	27
3.3.	Phytochemische Untersuchungen	28
3.3.1.	Lösungsmittel.....	28
3.3.2.	Analytische Dünnschichtchromatographie	28
3.3.3.	Säulenchromatographie.....	29
3.3.4.	Anthocyanidinreaktion.....	29
3.3.5.	Bestimmung des Gerbstoffgehalts.....	30
3.4.	Isolierung und Strukturaufklärung von Einzelverbindungen	32
3.4.1.	Cumarine	32
3.4.2.	Flavan-3-ole.....	34
3.4.3.	Proanthocyanidindimere	37
3.5.	Biologische Arbeitsmethoden	39
3.5.1.	Bestimmung antiadhäsiver Effekte.....	39
3.5.2.	Assay zur Messung der Neuraminidaseaktivität	47
3.5.3.	Leishmanieninfektionsmodell.....	49
3.5.4.	Quantitative Bestimmung der Zytokine IL-12 und TNF- α	54
3.5.5.	Virusschutzassay	56
3.5.6.	Bestimmung des NO-Radikalfängerpotentials	59
3.5.7.	Griess-Assay	61

4.	Ergebnisse.....	62
	Phytochemische Untersuchungen	63
4.1.	Auftrennung von EPs [®] 7630	63
4.1.1.	Fraktionierung in einen methanollöslichen und in einen methanolunlöslichen Extraktanteil.....	63
4.1.2.	Herstellung von polyphenolfreien Fraktionen.....	63
4.2.	Massenspektroskopische Untersuchung der Extrakte	65
4.3.	Charakterisierung von Proanthocyanidinen	67
4.4.	Charakterisierung von Einzelverbindungen	68
4.4.1.	Strukturaufklärung von Cumarinen	68
4.4.2.	Strukturaufklärung von Flavan-3-olen.....	71
4.4.3.	Untersuchung einer dimeren Proanthocyanidinfraktion	74
4.4.4.	Strukturaufklärung von Dimeren	75
4.5.	Bestimmung des Gesamtpolyphenolgehaltes.....	86
4.5.1.	Polyphenolgehalt in <i>P. reniforme</i> und <i>P. sidoides</i>	88
4.5.2.	Polyphenolgehalt im Spezialextrakt EPs [®] 7630.....	89
	Biologische Untersuchungen	90
4.6.	Adhäsionshemmung	90
4.6.1.	Prinzip.....	91
4.6.2.	Vorinkubation der HEp-2-Zellen.....	92
4.6.3.	Vorinkubation von A-Streptokokken.....	93
4.6.4.	Einfluss verschiedener Gerbstofftypen auf die Adhäsion.....	94
4.6.5.	Antiadhäsiver Effekt von 30 µg/ml Flavan-3-olen.....	96
4.7.	Neuraminidaseinhibitionsassay	98
4.7.1.	Prinzip.....	100
4.7.2.	Zanamivir und Oseltamivir	101
4.7.3.	Neuraminidasehemmende Wirkung von EPs [®] 7630.....	102
4.7.4.	Neuraminidaseinhibition durch weitere Gerbstoffextrakte.....	103
4.7.5.	Neuraminidaseinhibition durch Flavan-3-ole.....	104
4.8.	Leishmanieninfektionsmodell.....	105
4.8.1.	Prinzip.....	106
4.8.2.	Kontrollen.....	108
4.8.3.	Aktivierung von Makrophagen durch EPs [®] 7630 und Subfraktionen	109
4.8.4.	Aktivierung von Makrophagen durch Procyanidine	113
4.8.5.	Aktivierung von Makrophagen durch Extrakte aus <i>Ginkgo biloba</i> , <i>Vaccinium macrocarpon</i> und <i>Echinacea purpurea</i>	114
4.8.6.	Aktivierung von Makrophagen durch Quercetin und Quercetinglykoside...	115
4.8.7.	Aktivierung der Makrophagen durch Flavan-3-ole	116
4.9.	Induktion von IL-12 murinen Knochenmarksmakrophagen.....	117
4.10.	Induktion von TNF-α in murinen Knochenmarksmakrophagen.....	118

4.11.	Induktion zytoprotektiver Effekte in murinen Fibroblasten.....	119
4.11.1.	Prinzip.....	119
4.11.2.	Vorinkubation des EMCV.....	119
4.11.3.	Vorinkubation der L929- Zellen mit Extrakten.....	120
4.11.4.	Vorinkubation der L929-Zellen mit Makrophagenüberständen.....	120
4.12.	Induktion von \cdot NO -Radikalen in Knochenmarksmakrophagen.....	121
4.13.	\cdot NO-Scavenging.....	123
4.13.1.	Prinzip.....	123
4.13.2.	Radikalfängerpotential von Quercetin und Quercetinglykosiden.....	125
4.13.3.	Radikalfängerpotential von EPs [®] 7630 und Unterfraktionen.....	126
4.13.4.	Rolle des Hydroxylierungsmusters von Proanthocyanidinen.....	127
4.13.5.	\cdot NO -Radikalfängerpotential von Cumarinen.....	128
4.13.6.	\cdot NO -Radikalfängerpotential von Flavan-3-olen.....	130
5.	Diskussion.....	131
5.1.	Phytochemischer Teil.....	132
5.2.	Biologische Untersuchungen.....	133
5.2.1.	Hemmung der Infektion.....	134
5.2.2.	Immunmodulatorische Effekte.....	136
5.3.	Antioxidatives Potential.....	141
6.	Zusammenfassung.....	143
6.1.	Phytochemische Ergebnisse.....	144
6.2.	Ergebnisse biologischer Aktivitätsstudien.....	145
7.	Summary.....	147
7.1.	Phytochemical results.....	148
7.2.	Results of biological activity studies.....	149
8.	Literatur.....	151
9.	Abkürzungsverzeichnis.....	164
10.	Sebständigkeitserklärung.....	166

1. Einleitung

1.1. Geschichte des Phytopharmakons Umckaloabo®

Traditionellerweise werden seit langem verschiedene Pelargoniumarten (Familie Geraniaceae) von ethnischen Bevölkerungsgruppen im südlichen Afrika gegen eine Reihe von Beschwerden angewendet. Dabei werden meist die Wurzeln, gelegentlich auch die Blätter, vor allem zur Behandlung von Durchfallerkrankungen wie bakterieller Enteritis und ähnlichen gastrointestinalen Störungen eingesetzt. Auch eine Verwendung von Dekokten bei Parasitenbefall von Nutztieren ist dokumentiert. Bereits ab 1650 finden sich Aufzeichnungen von europäischen Forschern, die während ihrer Reisen zum südlichen Kap des afrikanischen Kontinentes, arzneilich und als Nahrungsmittel genutzte Pelargoniumarten insbesondere mit knolligen, roten Wurzeln und adstringierender Wirkung beschrieben. Die Spezies *Pelargonium reniforme* var. *sidaefolium* wurde Mitte des 19. Jahrhunderts zum ersten Mal erwähnt. Nach mehreren taxonomischen Umbenennungen ist heute deren korrekte Bezeichnung *P. sidoides*. Die Art ist Ausgangsmaterial für ein modernes pflanzliches Arzneimittel (Umckaloabo®) zur Behandlung von Erkrankungen der oberen Atemwege. Auch wenn in der traditionellen Medizin die therapeutische Verwendung von *P. sidoides* zur Behandlung von Atemwegserkrankungen vereinzelt beschrieben ist, sind die Aufzeichnungen und Quellenangaben meist ungenau und schwer nachvollziehbar. Der Weg von einer traditionellen Arzneipflanze im südlichen Afrika zu einer etablierten Arzneipflanze in Europa und einigen Ländern in Übersee ist eng verflochten mit taxonomischen Verirrungen und der Frage nach der botanischen Identität der sog. Umckaloabodroge in der traditionellen Medizin. Einzelheiten hierzu finden sich in mehreren Übersichtsarbeiten ([Taylor, 2005](#); [Bladt und Wagner, 2007](#); [Brendler und Van Wyk, 2008](#)). Nachfolgend werden nur einige wesentliche Schlüsselereignisse erwähnt.

Im Jahre 1897 reiste der junge englische Major Stevens nach Südafrika, um dort auf Anraten seines Arztes seine Lungentuberkulose unter klimatisch günstigen Bedingungen zu kurieren. Tuberkulose bzw. Schwindsucht war damals eine weitverbreitete Krankheit, gegen die es noch kein wirksames Medikament gab. Der erkrankte Stevens bekam von einem Leidensgenossen in Bloemfontein den Rat, sich von einem Zulu-Medizinmann behandeln zu lassen. Dieser verabreichte Stevens über einen Zeitraum von drei Monaten ein mysteriöses Wurzeldekot. Die

Behandlung führte offensichtlich zu einer vollständigen Genesung, denn nach seiner Rückkehr in England wurde Stevens von seinem Arzt als geheilt erklärt. Begeistert und im Glauben an den Behandlungserfolg gründete Stevens eine Firma und importierte ab 1904 die Droge mit Hilfe des Medizinmannes nach England, wo er sie unter der Bezeichnung „Stevens´ Consumption Cure“ als Heilmittel gegen Tuberkulose vermarktete.

Mit seinem Produkt stieß Stevens nicht immer auf Begeisterung. So veröffentlichte im Jahre 1909 die British Medical Association (BMA) die Abhandlung „Secret Remedies: what they cost and what they contain“, in der Stevens als Quacksalber und sein Heilmittel als Fälschung angeprangert wurden, da das Pulver eine große mikroskopische Ähnlichkeit mit anderen bekannten Gerbstoffdrogen wie *Krameria triandra* und *Pterocarpus marsupium* zeigte. Daraufhin hatte Stevens erfolglos eine Verleumdungsklage eingereicht. Nach mehreren Anfechtungen des Urteils und trotz Expertenaussagen zu seinen Gunsten musste er sich jedoch geschlagen geben. Die erhebliche Geldbuße von 2000 Pfund hat er allerdings nie bezahlt.

Stevens war ein gerissener, streitsüchtiger aber auch innovativer Geschäftsmann, der mit teilweise zweifelhaften Marketingmethoden versuchte, sein Mittel zu vermarkten. So bot er in seinen Anzeigen an, den Kaufpreis zu erstatten, falls das Medikament nicht wirke. Als ein gewisser Herr Bramley trotz Behandlung mit Stevens´ Cure verstarb, forderte seine Witwe das Geld zurück. Stevens weigerte sich zu zahlen, wurde jedoch nach einer Gerichtsverhandlung im Jahre 1910 zu Erstattung der Kosten verurteilt. Der Fall wurde vom Richter als „vorsätzlicher und gut durchdachter Betrug“ beschrieben. Als 1930 in der Zeitschrift „The Prescriber“ ein Übersichtsartikel über das Buch „The Treatment of Tuberculosis with Umckaloabo“ des Schweizer Missionsarztes Adrien Secheyaye erschien, fühlte Stevens sich nicht angemessen dargestellt und verlangte nach einer Entschuldigung. Das Magazin gab nach Androhung gerichtlicher Schritte, trotz der Unterstützung durch die BMA, nach und veröffentlichte eine Richtigstellung. Diesen Umstand wiederum nutzte Stevens geschickt für seine Werbeanzeigen.

Trotz dieser Widrigkeiten schaffte Stevens es, sein Unternehmen auszubauen. In den 30er Jahren des letzten Jahrhunderts beschäftigte er 50 Mitarbeiter und vertrieb

den Wurzelextrakt als Pulver, Lutschpastillen und Kapseln, die er auch ins Ausland exportierte.

Der bereits erwähnte Arzt Adrien Sechehaye erfuhr von Stevens' Consumption Cure im Jahre 1920. In den folgenden neun Jahren behandelte er damit ca. 800 Tuberkulosepatienten und zeichnete akribisch den Behandlungsverlauf auf. Er berichtete regelmäßig vom Therapieverlauf bei der Société Médicale de Genève ([Sechehaye, 1930](#)) und veröffentlichte 1930 das o. g. Buch. Der Autor kommt zum Schluss, dass Umckaloabo in vielen Fällen gute Heilungschancen bietet. Eine direkte antibakterielle Wirkung schloss er jedoch aus, in dem er Kartoffelscheiben mit Umckaloabo tränkte, diese mit *Mycobacterium tuberculosis* beimpfte und keinen Einfluss des Extraktes auf das Wachstum und die Vitalität des Erregers feststellen konnte. Da die tuberkuloseverursachenden Mykobakterien intrazelluläre Erreger sind und in Makrophagen überdauern, vermutete der Arzt eher immunmodulatorische Effekte, wie das „Neutralisieren oder Zerstören der bakteriellen Toxine“. Sechehaye präsentierte 1935 seine Behandlungserfolge auch in London. Daraufhin wurde das *Comittee of Investigation on Treatments of Tuberculosis* mit dem Ziel gegründet, unabhängige Untersuchungen zur Wirksamkeit von Umckaloabo® durchzuführen. Das Comittee bat die BMA, Ministry of Health und den Medical Research Council um Unterstützung bei der Durchführung der klinischen Studien, um später eine Anerkennung der Ergebnisse zu bewirken. Keine der angeschriebenen Organisationen war jedoch bereit, sich an dem Vorhaben zu beteiligen mit der Begründung, dass die Identität des verwendeten Drogenmaterials nicht festgestellt werden konnte. Insbesondere die BMA war nach den vorausgegangenen Auseinandersetzungen mit Stevens skeptisch gegenüber Umckaloabo® und bezeichnete es als „Substanz zweifelhafter Herkunft“ und die Untersuchung als „Geldverschwendung“. Alle Versuche, das Drogenmaterial einer bestimmten Pflanze zu zuordnen, scheiterten, nicht zuletzt, weil Stevens nicht kooperierte. Nach seinem Tode führte Stevens' Sohn das Unternehmen weiter, bis es von der deutschen Firma ISO-Arzneimittel in Regensburg übernommen wurde.

In den 70er Jahren beschäftigte sich die Pharmazeutin Sabine Bladt von der Universität München im Rahmen ihrer Dissertation mit der Droge Umckaloabo® ([Bladt, 1974](#)). Die phytochemischen Ergebnisse ließen aber keinen Schluss auf die

botanische Herkunft der Droge zu. Erst eine Reise nach Südafrika im Jahr 1972 und eine vergleichende Studie von mitgebrachtem Wurzelmaterial mit Herbarproben aus dem Botanischen Garten Kew in London, lieferten den entscheidenden Hinweis auf eine *Pelargonium*art. Nachfolgende Arbeiten identifizierten *Pelargonium reniforme* Curt. als mögliche Stammpflanze von Umckaloabo[®] ([Bladt und Wager, 2007](#)). Neuere botanische und phytochemische Untersuchungen ließen aber auf eine Verwechslung mit der morphologisch nahe stehenden Art *Pelargonium sidoides* DC schließen, welche heute als die eigentliche Stammpflanze von Umckaloabo[®] angesehen wird ([Kayser und Kolodziej, 1995](#); [Kolodziej, 2007](#)).

Heute wird Umckaloabo[®] von der Unternehmensgruppe Dr. Willmar Schwabe & Co KG, Karlsruhe, produziert und vertrieben (Abbildung 1). Als aktiven Bestandteil enthält es den Spezialextrakt EPs[®] 7630, einen ethanolisch wässrigen Auszug (11% m/m) aus den Wurzeln von *P. sidoides* mit einem Droge-Extrakt-Verhältnis (DEV) von 8-10: 1. In einem patentierten Verfahren wird eine immer gleichbleibende Zusammensetzung gewährleistet. Seit 2005 liegt nach eingehender Prüfung hinsichtlich Wirksamkeit, und Unbedenklichkeit durch das BfArM eine Zulassung für das Indikationsgebiet akute Bronchitis vor. Neben den Tropfen sind in Deutschland seit 2009 auch Filmtabletten und neuerdings auch ein alkoholfreier Saft für Kinder auf dem Arzneimittelmarkt erhältlich.



Abbildung 1: Handelsübliche Verpackung der flüssigen Applikationsform von Umckaloabo[®]

1.2. Systematik der Stamppflanzen

Die Familie *Geraniaceae* (Storchschnabelgewächse) umfasst fünf Gattungen mit typischen, schnabelförmig verlängerten Früchten und einem Verbreitungsschwerpunkt im südlichen Afrika. Zur Gattung *Pelargonium* gehören ca. 280 Arten. Im Gegensatz zu den Blüten von Vertretern aus den Gattungen *Geranium*, *Erodium*, *Monsonia* und *Sarcocaudon* sind die *Pelargonium*blüten deutlich zygomorph aufgebaut. Die in Größe, Form und auch Farbe variierenden Petalen werden auf zwei Ober- und drei Unterblätter verteilt. Sie besitzen einen Nektarsporn sowie zehn Staubblätter, von denen maximal sieben fertil sind. Die Gattung wird in weitere 17 Sektionen aufgeteilt. Die taxonomisch eng mit einander verwandten Arten *Pelargonium sidoides* DC. (Abbildung 2) und *Pelargonium reniforme* CURT. (Abbildung 3) gehören der Sektion *Reniformia* an (Tabelle 1) ([Van der Walt, 1988](#)). Da die beiden Spezies nur in der Blütezeit und in unverfälschter Form sicher voneinander unterschieden werden können und ein kleiner Anteil der für die Herstellung von Umckaloabo[®] verwendeten Droge aus Wildsammlungen stammt, können im Ausgangsmaterial geringe Mengen von *P. reniforme* vorhanden sein ([Lewu et al., 2007](#)).

Tabelle 1: Systematische Einordnung von *Pelargonium sidoides*

Taxonomische Rangstufe	Taxonomische Einheit
Abteilung (divisio)	Tracheophyta
Unterabteilung (subphyllum)	Spermatophyta
Klasse (classis)	Magnoliopsida
Unterklasse (subclassis)	Rosopsida
Ordnung (ordo)	Rosidae
Familie (familia)	Geraniaceae
Tribus (tribus)	Geranieae
Gattung (genus)	<i>Pelargonium</i>
Sektion (sectio)	<i>Reniformia</i>
Spezies (species)	<i>sidoides</i>

Pelargonium sidoides bildet herzförmige Blätter, die Blüten sind dunkelrot bis schwarz mit gelb-orange gefärbten Antheren (Abbildung 2).



Abbildung 2: Blüte von *Pelargonium sidoides* DC
Foto mit freundlicher Genehmigung von Alan Greg, Swansea, UK

Dagegen sind die Blätter von *Pelargonium reniforme*, wie der Name schon sagt, nierenförmig gestaltet. Die Blüten haben eine rosa Färbung mit dunklen Saftmalen und weiß-grünen Pollen (Abbildung 3).



Abbildung 3: Blüte von *Pelargonium reniforme* CURT
Foto mit freundlicher Genehmigung von Alan Greg, Swansea, UK

1.3. Inhaltsstoffe aus dem Wurzelmaterial von *Pelargonium sidoides*

Das Spektrum der bekannten Inhaltsstoffe aus den Wurzeln von *P. sidoides* umfasst sehr unterschiedliche Naturstoffgruppen. Nachfolgend werden die bisher isolierten und beschriebenen Sekundärstoffe als tabellarische Übersicht dargestellt (Tabelle 2).

Tabelle 2: Bekannte Inhaltsstoffe aus den Wurzeln von *P. sidoides*

Naturstoffgruppe	Verbindung	Literatur
einfache	Gallussäure	Kolodziej und Kayser, 1998
phenolische Verbindungen	Gallussäuremethylester	Kolodziej und Kayser, 1998
	Kaffeensäure	Kolodziej, 2000
	p-Cumarsäure	Kolodziej, 2000
	Shikimisäure-3-O-gallat	Kolodziej, 2007
Cumarine	6,8-Dihydroxy-5,7-dimethoxycumarin	Kayser und Kolodziej, 1995
	5,6,7,8-Teramethoxycumarin (Artelin)	Kayser und Kolodziej, 1995
	6,7,8-Trihydroxycumarin	Kayser und Kolodziej, 1995
	6,8-Dihydroxy-7-methoxycumarin	Kayser und Kolodziej, 1995
	7-Acetoxy-5,6-dimethoxycumarin	Kayser und Kolodziej, 1995
	5,6,7-Trimethoxycumarin	Kayser und Kolodziej, 1995
	7-Hydroxy-6-methoxycumatin (Scopoletin)	Kayser und Kolodziej, 1995
	7-Hydroxy-5,6-dimethoxycumarin (Umckalin)	Kayser und Kolodziej, 1995
	8-Hydroxy-6,7-dimethoxycumarin (Fraxidin)	Kolodziej, 2000
	6-Hydroxy-5,7-dimethoxycumarin (Fraxinol)	Kolodziej, 2000
	5,6-Dihydroxy-7-methoxycumarin	Kolodziej, 2000
	8-Hydroxy-5,7-dimethoxycumarin-6-sulfat	Latté et al., 2000
	6-Hydroxy-5,7-dimethoxycumarin-8-sulfat	Latté et al., 2000
	5,6-Dimethoxycumarin-7-sulfat	Latté et al., 2000
Cumaringlycoside	Magnoliosid	Kolodziej, 2007
	Isofraxosid	Kolodziej, 2007
	Umckalin-7-β-D-glucosid	Kolodziej, 2007
Flavan-3-ole	(+)-Afzelechin	Kolodziej und Kayser, 1998
	(+)-Catechin	Kolodziej und Kayser, 1998
	(+)-Gallocatechin	Kolodziej und Kayser, 1998
	Oligomere Proanthocyanidine	Schötz et al., 2008
Flavonoide	Quercetin	Kolodziej, 2000
Phytosterole	Sitosterol-3-O-β-D-glucosid	Kolodziej und Kayser, 1998

1.4. Chemische Zusammensetzung von EPs[®] 7630

Beim Spezialextrakt EPs[®] 7630 handelt es sich um einen wässrig ethanolischen (11 % m/m) Auszug aus den zerkleinerten Wurzeln von *Pelargonium sidoides* ([Erdelmeier et al., 2003](#)). Zurzeit sind ca. 78 % der Bestandteile bekannt ([Schötz et al., 2008](#)) (Abbildung 4).

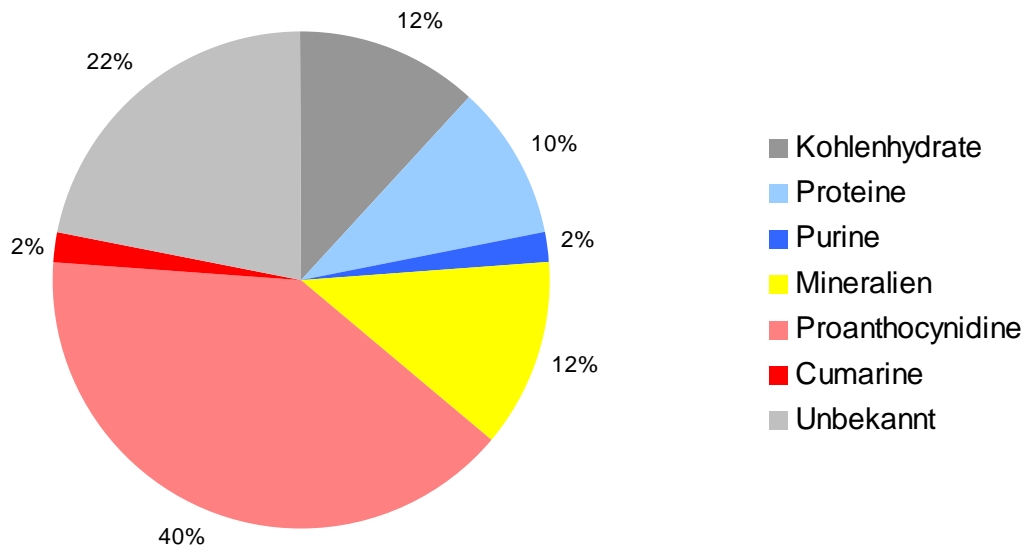


Abbildung 4: Quantitative Zusammensetzung von EPs[®] 7630

Quelle [Schötz et al., 2008](#)

1.4.1. Primärstoffwechselprodukte

- **Kohlenhydrate**

Die quantitative Bestimmung mittels Anthonfarbreaktion ergab einen Zuckergehalt von ca. 12%. Qualitative HPLC-Analysen identifizierten Glucose, Fructose, Galactose, Mannose, Inositol und Mannitol als wesentliche Monosaccharidbausteine der Kohlenhydratfraktion.

- **Proteine**

Ca. 10% des Extraktes bestehen aus Proteinen. Nach Hydrolyse konnte mit 4% L-Arginin als dominierende Aminosäure identifiziert werden.

- **Purinderivate**

Bisher wurden cAMP, cGMP und 1-Me-cGMP nachgewiesen, die zusammen ca. 2% des Gesamtextraktes ausmachen. Sie sind Intermediate der DNA-Synthese, spielen aber auch als Second Messenger eine wichtige Rolle.

- **Mineralien**

Die Bestimmung des Aschegehaltes ergab einen Gehalt an anorganischen Substanzen von ca. 12%. Davon sind etwa 4,5% Sulfate. Außerdem wurden Phosphat-, Chlorid-, Kalium-, Natrium- und Magnesiumionen nachgewiesen.

1.4.2. Sekundärstoffwechselprodukte

- **Einfache Phenole**

Verbindungen aus der Gruppe der einfachen Phenole umfassen ein breites Spektrum in den Wurzeln von *P. sidoides*, liegen aber nur in relativ geringen Konzentrationen vor. In EPs[®] 7630 sind bisher Gallussäure und Gallussäuremethylester nachgewiesen worden (Abbildung 5). Diese Metabolite sind typische Bausteine hydrolysierbarer Gerbstoffe, deren Vorkommen auch im Pelargoniumwurzelextrakt aufgezeigt werden konnte ([Kolodziej, 2007](#)).

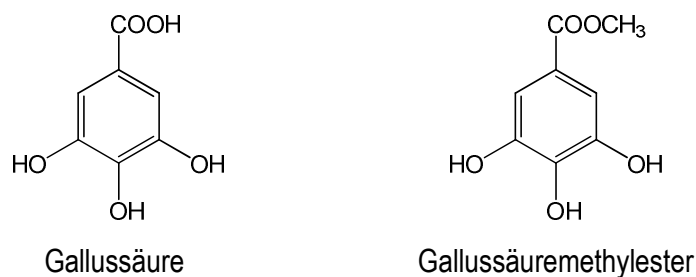


Abbildung 5: Einfache Phenole in EPs[®] 7630

- **Cumarine**

Typisch für die Spezies *P. sidoides* sind offensichtlich hochoxygenierte Benzopyran-2*H*-one. Insgesamt sind bisher 16 verschiedene Cumarine (Tabelle 3) aus dem Extrakt isoliert worden, die alle auf einer 7-Hydroxy-Grundstruktur beruhen, sowie keine Substituenten an Position 3 und 4 tragen. Als typisch für *P. sidoides* gilt u. a. das Vorkommen von Umckalin, welches in *P. reniforme* allenfalls in Spuren enthalten ist und damit zur Abgrenzung der beiden Arten herangezogen werden kann ([Kolodziej, 2007](#)). Eine Vielzahl der hochoxygenierten Cumarine sind neuartige Naturstoffe, wie auch einige sulfatierte Derivate (Abbildung 6), welche im Pflanzenreich sehr selten sind ([Kayser und Kolodziej, 1995](#); [Gödecke et al., 2005](#), [Schötz et al., 2008](#)).

Auf Grund des Cumarinvorkommens ist EPs[®] 7630 in die Kritik geraten, da einige orale Antikoagulantien, wie z. B. Phenprocoumon oder Warfarin, ebenfalls eine Cumaringrundstruktur aufweisen. Diese Substanzen sind kompetitive Inhibitoren der Vitamin-K-Epoxid-Reduktase und blocken so die Bildung mehrerer Gerinnungsfaktoren. Strukturelle Voraussetzungen für diesen Effekt sind eine Hydroxygruppe in Position 4 sowie ein lipophiler Substituent in Position 3, der die Bioverfügbarkeit verbessert ([Van Sittert und Tuinman, 1994](#); [Majerus und Tollefsen, 2001](#)). Da keine der bisher in EPs[®] 7630 identifizierten Cumarine diese Strukturmerkmale aufweisen und der Cumaringehalt im Extrakt relativ niedrig ist (ca. 2 %), ist die Gefahr einer solchen Nebenwirkung als äußerst gering einzustufen. Gestützt wird diese Vermutung durch eine Studie an Ratten, in der auch eine Wechselwirkung mit Warfarin ausgeschlossen werden konnte ([Koch und Biber, 2007](#)).

Drei prädominante Cumarine (Scopoletin, Umckalin und 6,8-Dihydroxy-5,7-dimethoxycumarin) aus *P. sidoides* wurden auf zytotoxische Wirkung gegenüber den humanen Krebszelllinien GLC₄ und COLO 320 untersucht ([Kolodziej et al., 1997](#)). Umckalin zeigte keine toxischen Effekte bei Konzentrationen bis zu 200 µM. Der IC₅₀-Wert für Scopoletin liegt bei 195 ± 7µM bzw. 141 ± 11 µM. 6,8-Dihydroxy-5,7-dimethoxycumarin zeigte jedoch eine relativ starke zytotoxische Wirkung mit einem IC₅₀-Wert von 22.1 ± 5 µM gegenüber GLC₄-Zellen bzw. 9,5 ± 4.1 µM gegenüber COLO 320-Zellen.

Weitere Toxizitätsstudien mit Hunden ergaben für den NOEL (No Observed Effect Level, eine Dosis bei der keine statistisch signifikante behandlungsbedingte Wirkung beobachtet werden kann) grundsätzlich Werte über 750 mg/kg. ([Loew et al., 2009](#)).

Diese pharmakologischen Studien bescheinigen für EPs[®] 7630 diesbezüglich eine relativ hohe Unbedenklichkeit.

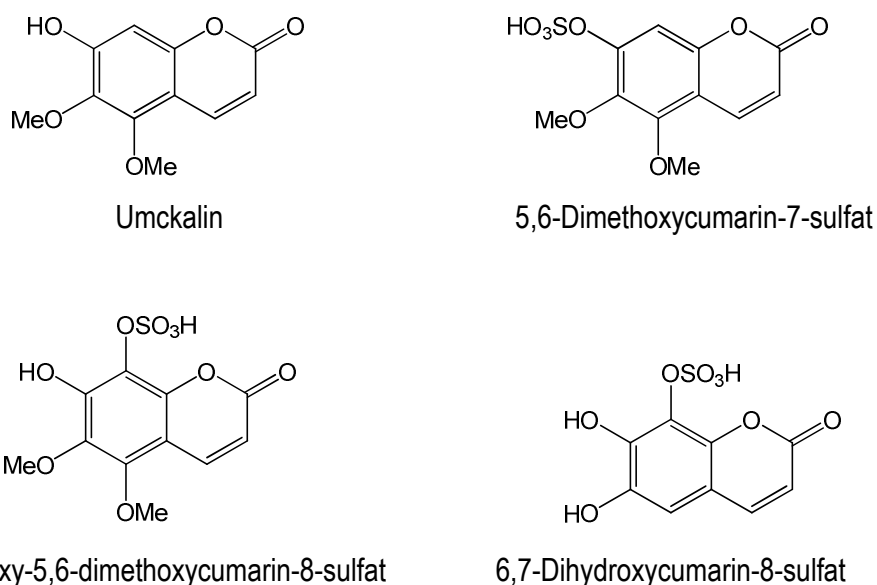


Abbildung 6: Ausgewählte hochoxygenierte Cumarine aus EPs[®] 7630

Tabelle 3: Bekannte Cumarine im Spezialextrakt EPs[®] 7630 ([Schötz et al., 2008](#); [Kolodziej, 2007](#))

Die mit * gekennzeichneten Verbindungen wurden mit reinem Wasser aus den Wurzeln von *P. sidoides* extrahiert (im Gegensatz zum Standardverfahren mit 11% Ethanol). Jedoch ist auf Grund der Polarität zu erwarten, dass die isolierten Komponenten auch im Spezialextrakt EPs[®] 7630 zu finden sind.

7-Hydroxy-6-methoxycumarin (Scopoletin)	7,8-Dihydroxy-6-methoxycumarin (Fraxetin)*
7-Hydroxy-5,6-dimethoxycumarin (Umckalin)	6,8-Dihydroxy-7-methoxycumarin*
5,6,7-Trimethoxycumarin	6,8-Dibenzoyloxy-7-methoxycumarin*
8-Hydroxy-5,6,7-trimethoxycumarin	7,8-Dihydroxycumarin-6-sulfat*
7,8-Dihydroxy-5,6-dimethoxycumarin	7-Hydroxycumarin-6,8-disulfat*
6,8-Dihydroxy-5,7-dimethoxycumarin	7-Hydroxy-5,6-dimethoxycumarin-8-sulfat*
6,7,8-Trihydroxycumarin*	6,7-Dihydroxycumarin-8-sulfat*
5,6,7,8-Tetramethoxycumarin (Artelin)*	5,6-Dimethoxycumarin-7-sulfat*

• **Proanthocyanidine**

Diese Verbindungen stellen mit einem Anteil von ca. 40 % die mengenmäßig größte Inhaltsstoffgruppe dar. Sie sind aus Flavan-3-oleinheiten (Abbildung 7) aufgebaut und in ihrer Zusammensetzung sehr heterogen. Daraus ergibt sich eine ungewöhnlich große Vielfalt an Strukturen.

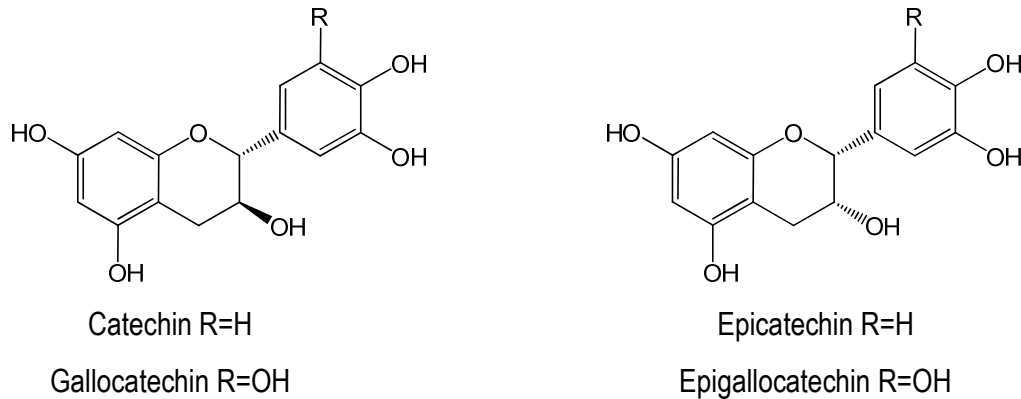


Abbildung 7: Monomere Flavan-3-ol-Bausteine der Proanthocyanidine

Nach aktuellem Kenntnisstand sind die Oligomere aus Catechin, Epicatechin (Procyanidine), vor allem aber Gallocatechin bzw. Epigallocatechin (Prodelphinidine) aufgebaut (Abbildung 7). Die monomeren Bausteine sind über eine 4,8- oder 4,6-Interflavanylverknüpfung verbunden (sog. B-Typ) (Abbildung 8).

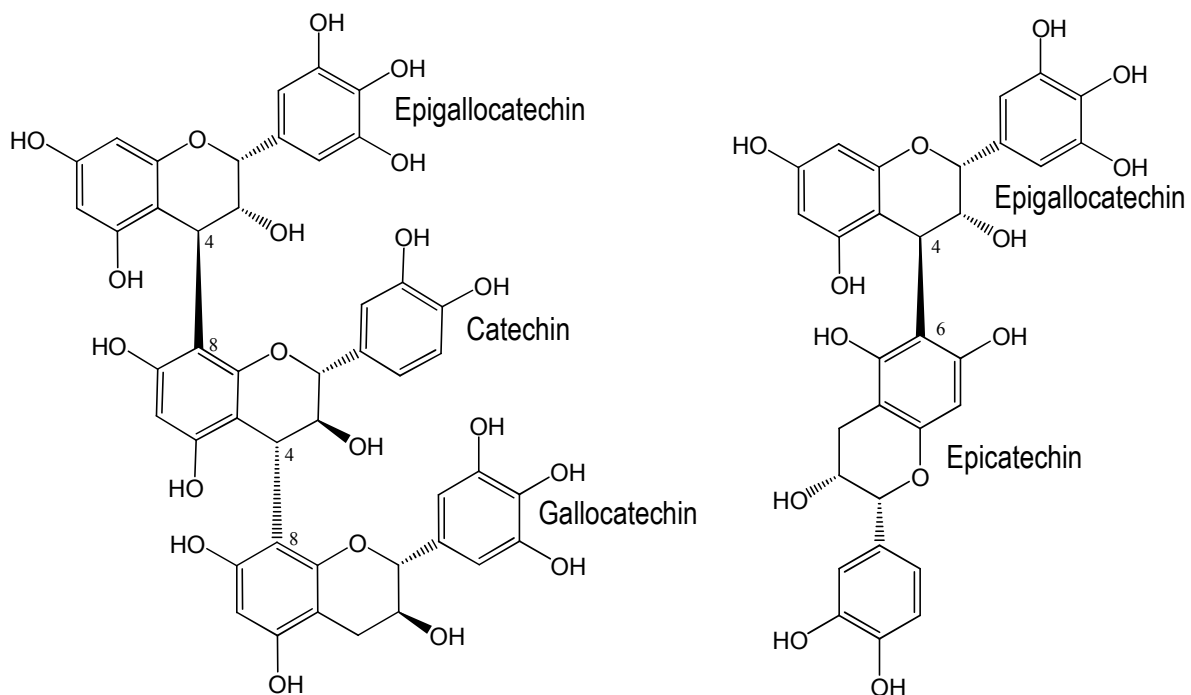


Abbildung 8: Beispiele für Proanthocyanidine vom B-Typ

In den oligomeren Ketten finden sich gelegentlich zusätzlich zu den einfachen C-C-Verknüpfungen (B-Typ) noch Etherbrücken, z.B. zwischen der OH-Gruppe am C-7 und dem C-2 der nächsten Flavan-3-oleinheit (Abbildung 9). Diese doppelt verknüpfte Strukturvariante wird als A-Typ bezeichnet und kommt weit seltener in der Natur vor, unter anderem in *Vaccinium macrocarpon* AIT. (Cranberry) ([Pappas und Schaich, 2009](#)) oder *Ginkgo biloba* L. ([Hölzl, 1992](#)).

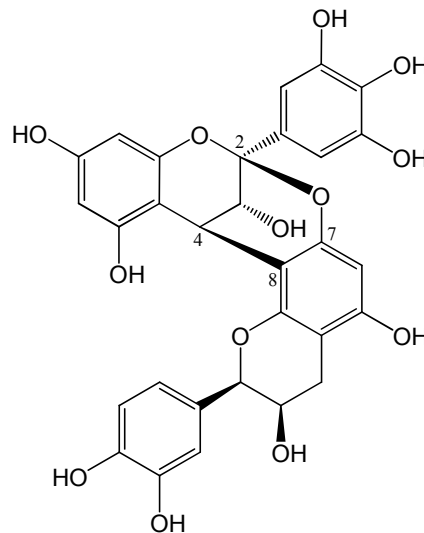


Abbildung 9: Beispiel für ein Proanthocyanidin vom A-Typ

Als weitere Strukturvariante wurden auch ungewöhnliche Substituenten an den Hydroxygruppen identifiziert. Diese können demnach sulfatiert oder mit Aminosäuren verestert vorliegen. Bisher konnten Oligomere mit bis zu 16 Einheiten massenspektrometrisch nachgewiesen werden ([Schötz und Nöldner, 2007](#)).

In der Literatur werden oligomeren Proanthocyanidinen viele positive Wirkungen zugeschrieben wie antitumorale, cardioprotektive, antioxidative, antimikrobielle, antivirale oder antiphlogistische Effekte ([Quideau et al. 2011](#), [Tarascou et al. 2010](#), [Reed. 1995](#)). Insbesondere die Proanthocyanidine aus Traubenkernextrakten (*Vitis vinifera* L.) und grünem Tee (*Camelia sinensis* (L.) KUNZE) wurden intensiv beforscht. Sie haben ausgeprägte antioxidative Wirkung in vitro aufgezeigt. Dieser Effekt wird durch die Radikalfängereigenschaften der Substanzen erklärt. Dadurch können reaktive Sauerstoff- und/oder Stickstoffspezies neutralisiert und so z. B. eine unerwünschte Lipidperoxidation vermindert werden ([de la Iglesia et al., 2010](#)). Außerdem komplexieren Proanthocyanidine Metallionen und können so eine Reihe von Enzymen hemmen.

1.5. Klinische Studien zur Wirksamkeit von Umckaloabo®

Infektionen der oberen Atemwege sind die am häufigsten diagnostizierten Erkrankungen in der hausärztlichen Praxis. In der Regel werden diese von Viren ausgelöst. Viele Hausärzte verordnen Antibiotika, deren Erfolg bei viral bedingten Infektionen zweifelhaft ist und mit einem Risiko der Resistenzbildung bei einer bakteriellen Sekundärinfektion einhergeht. Umckaloabo® bietet eine sinnvolle Alternative für die Behandlung von Atemwegserkrankungen, sofern diese nicht für eine Antibiotikatherapie indiziert sind, z.B. eine Superinfektion mit β -hämolisierenden Streptokokken. Wirksamkeit und Unbedenklichkeit dieses Fertigarzneimittels wurden bereits in 20 klinischen Studien mit über 9000 Patienten, davon 3900 Kinder, belegt ([Brown, 2009](#)).

1.5.1. Akute Bronchitis

Exemplarisch soll hier eine Studie von [Matthys und Funk, 2008](#) vorgestellt werden. Erwachsene Patienten mit akuter Bronchitis wurden in placebokontrollierten Doppelblindstudien (107 Patienten bekamen das Verum, 109 das Placebo) über 7 Tage mit 3 x täglich 30 Tropfen bzw. Tabletten Umckaloabo® behandelt. Als Messparameter diente der so genannte „Bronchitis Severity Score“ (BSS, Bronchitis Schweregrad Stand). Dabei beurteilt der untersuchende Arzt die Symptome Husten, Auswurf, Rasselgeräusche, Brustschmerz beim Husten und Dyspnoe nach einer Punkteskala von 0 – 4. Patienten der Verumgruppe hatten ab dem 4. Tag einen signifikant niedrigeren BSS, der mit einer verbesserten Lebensqualität und Zufriedenheit mit der Behandlung einherging. Nach 7 Tagen waren 45,4% der Patienten vollständig genesen im Vergleich zu nur 6,4% in der Placebogruppe. Unerwünschte Effekte traten in beiden Gruppen in nahezu gleicher Häufigkeit auf. Dabei handelte es sich ausschließlich um mild bis moderat verlaufende Gastrointestinalstörungen sowie Schwindelgefühle. In Tabelle 4 sind klinische Studien und die Änderung des BSS bei Verum- sowie Placebogruppe zusammengefasst.

In einer Meta-Analyse wurden sechs ähnliche Studien ausgewertet ([Agbabiaka et al., 2008](#)), wobei eindeutig ein positiver Effekt von Umckaloabo® gegenüber Placebo nachgewiesen werden konnte.

Tabelle 4: Klinische Studien und Anwendungsbeobachtungen mit EPs® 7630 (Verum) bei akuter Bronchitis (BSS = Bronchitis Severity Score)

Patienten (Verum/Kontrolle)	Dauer (Tage)	Kontrolle	Änderung des BSS (Verum)	Änderung des BSS (Kontrolle)	Literatur
1042 Kinder (bis 12 J)	14	-	6,4→1,0	-	Haidvogel et al., 1996
60 Kinder (6-12 J) (30/30)	7	ACC	7,0→0	7,0→1,0	Blochin et al., 1999
213 Kinder (6-12 J) (104/109)	7	ACC	7,5→0,8	7,8→1,2	Blochin et al., 1999
468 Erwachsene (233/235)	7	Placebo	8,4→2,5	8,0→4,9	Matthys et al., 2003
124 Erwachsene (64/60)	7	Placebo	9,0→1,7	9,1→4,2	Chuchalin, 2005
205 Erwachsene	7	-	6,1→2,8	-	Matthys und Heger, 2007
217 Erwachsene (107/109)	7	Placebo	8,9→1,3	8,4→3,1	Matthys und Funk, 2008
103 Erwachsene (52/51)	10	Placebo	17,8→0,8	16,9→2,9	Lizogub et al., 2007
2099 Erwachsene und Kinder	14	-	7,1→1,0	-	Matthys et al., 2007
742 Kinder	14	-	6,0→1,4	-	Haidvogel und Heger, 2007
399 Kinder (298/101)	7	Placebo	6,9→3,3 (30 mg/d) 6,8→2,8 (60 mg/d) 7,0→2,0 (90 mg/d)	6,8→3,4	Kamin et al., 2010

1.5.2. Tonsillopharyngitis

Neben der Zulassung für die Indikation akute Bronchitis wurde Umckaloabo® auch für die Behandlung einer akuten Rachenentzündung bei Kindern klinisch getestet. Da Tonsillopharyngitis in seltenen Fällen von β -hämolisierenden A-Streptokokken verursacht wird, wurden für die Studie nur Kinder mit einem negativen Schnelltest gegen diese Erreger rekrutiert. Auch hier wurden die Symptome Halsschmerzen, Rötung des Rachens, Fieber und Schluckbeschwerden anhand einer Punkteskala bewertet (Tonsillopharyngitis Severity Score, TSS). Eine signifikante Verbesserung der Symptome in der Verumgruppe war bereits nach 4 Tagen zu beobachten. Die Dauer der Behandlung betrug insgesamt sechs Tage und die Besserung unter EPs® 7630 war derjenigen unter Placebo signifikant überlegen. Bereits 80% der Kinder, die das Verum eingenommen haben, konnten wieder zur Schule gehen. In der Placebogruppe waren es dagegen nur 21% ([Bereznoy et al., 2003](#)).

1.6. Tierexperimentelle Studien zum Einfluss auf das Krankheitsverhalten

Infektionen gehen häufig mit unspezifischen Krankheitssymptomen wie Appetitlosigkeit, Müdigkeit oder Schlafstörungen einher. Dieses Krankheitsverhalten wird bei Versuchstieren als Sickness Behaviour bezeichnet und hat seine Ursache in zentralnervösen Wirkungen, ausgelöst durch proinflammatorische Zytokine, insbesondere TNF. Der therapeutische Effekt von EPs[®] 7630 auf ein solches Krankheitsverhalten wurde in einem geeigneten Nager-Modell untersucht ([Nöldner und Schötz, 2007](#)). Hierzu wurde eine hell-dunkel-Box verwendet. Diese ist in zwei Bereiche, eine weiße und eine schwarze Hälfte, aufgeteilt. Werden Tiere zum ersten Mal in eine solche Box gesetzt, so bevorzugen sie normalerweise den dunklen Bereich (dark preferring behaviour). Eine verlängerte Verweildauer in der hellen Hälfte oder eine verringerte Mobilität gilt als Anzeichen für ein gestörtes, krankheitsbedingtes Verhalten. Um ein standardisiertes Krankheitsverhalten zu induzieren, wurden Mäusen zunächst 400 µg LPS pro kg Körpergewicht peritoneal verabreicht. Wurden die Versuchstiere zwei Stunden später in das Versuchsgehege gesetzt, so verblieben diese etwa doppelt so lange im hellen Bereich als die Kontrolltiere. Außerdem waren sie wesentlich träger und wechselten insgesamt nur viermal ihren Standort im Vergleich zu siebenmal bei unbehandelten Tieren. Wurde den Tieren nun eine Stunde vor LPS-Gabe zusätzlich 100-400 mg EPs[®] 7630/ kg Körpergewicht oral verabreicht, so verringerte sich die Verweildauer im hellen Bereich mit steigender Dosierung. Tiere, die die maximale Dosis von 400 mg/kg EPs[®] 7630 erhalten haben, verhielten sich wieder annähernd wie unbehandelte Mäuse ohne LPS-Gabe. Auch die Anzahl der Bewegungen innerhalb der beiden Bereiche der Box erreichte fast das Normalniveau. Als wirksamer Anteil im Extrakt für die Verbesserung des Sickness Behaviour wurde eine hochmolekulare, aber nicht näher spezifizierte Fraktion (> 30 kDa) ausgemacht.

1.7. *In vitro* Studien zur Wirkungsweise von EPs[®] 7630

Wie für ein pflanzliches Arzneimittel mit einer Vielfalt an Inhaltsstoffen und komplexer Zusammensetzung zu erwarten, kann die Wirksamkeit von EPs[®] 7630 wohl kaum auf einen einzelnen Wirkmechanismus und einem bestimmten Wirkstoff zurückgeführt werden. Vielmehr ist von Kombinationseffekten sowie additiven oder auch synergistischen Effekten auszugehen. Diese Annahme wird durch die bisherigen experimentellen Daten aus *in vitro* Untersuchungen gestützt. Nachfolgend sollen die wesentlichen Erkenntnisse kurz beschrieben werden.

1.7.1. Antivirale Effekte

Der Spezialextrakt erwies sich als stark wirksam gegen die *Herpes simplex* Viren HSV-1 und HSV-2 ([Schnitzler et al., 2008](#)). In einem Plaque-Reduktions-Assay mit RC-37-Zellen wurde die Plaquebildung bereits bei Konzentrationen von 0,00006% bzw. 0,000005% für HSV-1 bzw. HSV-2 um die Hälfte reduziert (IC₅₀). Dabei greift der Extrakt, anders als das handelsübliche Produkt Aciclovir nicht in die intrazelluläre HSV-Synthese ein, sondern wirkt viel mehr direkt auf das Virus bzw. seine Oberflächenrezeptoren ein und verhindert so eine Infektion der Schleimhautzellen.

1.7.2. Antibakterielle Aktivität

Die minimalen Hemmkonzentrationen (MHK) wurden mittels Mikrodilutionsmethode bestimmt. Dabei zeigte EPs[®] 7630 eine nur als moderat zu bezeichnende Aktivität gegenüber *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Pseudomonas Aeruginosa*, *Proteus mirabilis* und einer Reihe multiresistenter *Staphylococcus aureus* Stämme (MHK-Werte 5-7,5 mg/ml) ([Kolodziej et al., 2003](#)). Auch die bisher getesteten Einzelverbindungen aus der Gruppe der Cumarine 6-Hydroxy-7-methoxycumarin, 7-Hydroxy-5,6-dimethoxy-cumarin, 5,6,7-Trimethoxycumarin und 6,8-Dihydroxy-5,7-dimethoxycumarin sowie Gallussäure und Gallussäuremethylester zeigten im Vergleich zu Penicillin G (MHK-Werte 5-25 µg/ml) sehr schwache antimikrobielle Aktivitäten unter den experimentellen Bedingungen (MHK-Werte 200-500 µg/ml) ([Kayser und Kolodziej, 1997](#); [Kolodziej und Schulz, 2003](#)).

1.7.3. Hemmung der Adhäsion von Bakterien an Epithelzellen

Der Adhäsionsvorgang von Bakterien an Epithelzellen stellt einen ersten wichtigen Schritt in einer Infektion dar. Vor dem Hintergrund der sehr moderaten direkten antibakteriellen Aktivität von EPs[®] 7630 wurde der Frage nachgegangen, inwieweit indirekte antiinfektive Effekte eine Rolle spielen ([Conrad et al., 2007b](#)). Um antiadhäsive Effekte von EPs[®] 7630 aufzuzeigen, wurden grün fluoreszierende Bakterien des Stammes *Streptococcus pyogenes* mit HEp-2-Zellen inkubiert. Die Versuche wurden entweder mit EPs[®] 7630 vorbehandelten Bakterien oder vorbehandelten Epithelzellen durchgeführt und das Ausmaß der Adhäsion durchflusszytometrisch bestimmt. Die Adhäsionsrate wurde bei Vorinkubation der Bakterien mit dem Extrakt um ca. 40% reduziert, eine Vorbehandlung der Epithelzellen zeigte dagegen keinen Effekt. Diese Ergebnisse belegen eine signifikante indirekte antibakterielle Wirkung, von EPs[®] 7630. Das zu Grunde liegende stoffliche Prinzip bleibt aber weiteren Untersuchungen vorbehalten.

Des Weiteren wurde eine antiadhäsive Wirkung auf *Helicobacter pylori* nachgewiesen ([Beil und Kilian, 2007](#); [Wittschier et al., 2007](#)). Die Bindung des fluoreszenzgefärbten Erregers an AGS-Zellen (Magenschleimhautzellen) wurde durch 50 µg/ml bzw. 100 µg/ml EPs[®] 7630 um 77% bzw. 91% inhibiert. Auch hier war der Effekt stärker bei Vorinkubation der Bakterien (nicht der Wirtszellen), was auf eine Interaktion des Extraktes mit den bakteriellen Oberflächenstrukturen hinweist.

1.7.4. Einfluss auf die Zilienschlagfrequenz des Flimmerepithels

Die zilientragenden Zellen des respiratorischen Flimmerepithels sorgen für den Abtransport von Partikeln und Schleim aus dem Respirationstrakt. Die Effektivität dieses Reinigungssystems wird maßgeblich von der Schlagfrequenz der Zilien bestimmt. EPs[®] 7630 bewirkte eine signifikante und konzentrationsabhängige Erhöhung der Schlagfrequenz eines Monolayers aus humanen nasalen Flimmerepithelzellen ([Neugebauer et al., 2003](#)). Die beschriebene gesteigerte sekretomotorische Aktivität kann bei der Behandlung der akuten Bronchitis von therapeutischem Nutzen sein, da sie für einen verbesserten Abtransport von Schleim und darin eingeschlossenen Erregern sorgen dürfte und so die Effizienz des Selbstreinigungsmechanismus der Mucosa erhöht.

1.7.5. Immunmodulatorische Effekte

Im Focus der immunmodulatorischen Studien stand die Aktivierung der unspezifischen Immunabwehr durch EPs[®] 7630. Hierzu wurden verschiedene funktionelle Bioassays, Infektionsmodelle, Genexpressionsstudien und Untersuchungen zur Expression von Oberflächenmarkern genutzt ([Kolodziej, 2011](#)). Die Datenlage weist auf eine Zytoprotektion durch Typ-I Interferone, auf eine gesteigerte induzierte Bildung und Freisetzung von Zytokinen (IL-1, IL-12, TNF- α) und eine vermehrte Produktion des mikrobiziden Effektormoleküls Stickstoffmonoxid (NO). Auch die Freisetzung antimikrobieller Peptide unter dem Einfluss von EPs[®] 7630 ist dokumentiert. Des Weiteren konnte der Extrakt die Phagozytoseaktivität von Makrophagen steigern. Die Modellerreger (*Candida albicans*) wurden zudem schneller intrazellulär abgetötet. Die bisher durchgeführten *in vitro* Studien zum Einfluss auf das unspezifische Immunsystem sind in Tabelle 5 zusammengefasst.

Tabelle 5: Überblick der immunmodulierenden Eigenschaften induziert durch EPs[®] 7630

Modell	Zellart	Immunmodulierender Effekt	Literatur
(Pathogen)			
Infektionsmodell (<i>Leishmania major</i>)	BMM Φ	Reduktion der Parasitenlast, Freisetzung von NO ,	Kayser et al., 2001
	RAW 264.7	Zytokin-Induktion, Erhöhte Genexpression	Trun et al., 2006
Infektionsmodell (<i>Listeria monocytogenes</i>)	BMM Φ	Reduktion der Parasitenlast, Expression von CD40 und CD119, Bildung von NO	Thäle et al., 2008
Infektionsmodell (EMC Virus)	L929 Fibroblasten	Zytoprotektive Effekte bei Inkubation mit BMM Φ Überständen	Kayser et al., 2001 Thäle et al., 2008
Aktivierung von Osteosarkomzellen (Virus-RNA-Analogon)	MG-63 Osteosarkomzellen	Erhöhte IFN- β Synthese	Kolodziej et al., 2003
Aktivierung von Polymorphkernigen neutrophilen Leukozyten	PMN	Freisetzung antimikrobieller Peptide (HNP 1-3, BPI)	Koch und Wohn, 2007
Phagozytose (<i>Candida albicans</i>)	Blutphagozyten	Steigerung der Phagozytoseaktivität, Bildung von reaktiven Sauerstoffspezies	Conrad et al., 2007a

Nach derzeitigem Kenntnisstand beruht die antiinfektive Wirkung und Wirksamkeit von EPs[®] 7630 auf multifaktorielle Effekte, welche in entscheidender Weise mit einer Modulation des unspezifischen Immunsystems assoziiert sind. Die zu Grunde liegenden Wirkmechanismen sind allerdings bisher nur unzureichend erforscht.

2. Zielsetzung

Ziele der vorliegenden Dissertationsarbeit sollen sein

- **Phytochemische Arbeiten**

Basierend auf dem aktuellen Kenntnisstand über den Spezialextrakt EPs[®] 7630, sollen ergänzende phytochemische Untersuchungen durchgeführt werden. Dabei sind die vorhandenen Gerbstoffe von besonderem Interesse.

- Bestimmung des Gerbstoffgehaltes.
- Die Herstellung von Fraktionen mit unterschiedlicher Verteilung der Proanthocyanidine sowie die Bereitung von gerbstofffreien Fraktionen sollen in folgenden biologischen Testungen die Eingrenzung der wirkbestimmenden Substanzen ermöglichen.
- Isolierung und Strukturaufklärung von Proanthocyanidinen sowie weiteren Einzelverbindungen.

- **Immunlogische Arbeiten**

Die biologische Aktivität des Spezialextraktes EPs[®] 7630 sowie insbesondere der oben hergestellten Extrakte als auch geeigneter Vergleichssubstanzen soll mit zweckmäßigen Mitteln untersucht werden.

- Evaluierung von antiadhäsiven Eigenschaften.
- Bestimmung der inhibierenden Wirkung gegen Neuraminidase.
- In einem Makrophagen-Leishmanieninfektionsassay soll die aktivierende Wirkung der Extrakte untersucht werden. Als Parameter in funktionellen Assays dienen neben der durchflusszytometrischen Bestimmung der Infektionsrate, die Freisetzung von NO, TNF- α , IL 12.
- In einem Virusschutzassay soll die IFN-vermittelte Zytoprotektion von Fibroblasten untersucht werden.
- Untersuchung von antioxidativen Eigenschaften gegen das Nitrosylradikal.

3. Material und Methoden

3.1. Geräte

Waagen:

A200S	Sartorius AG, Göttingen
LC 620 S	Sartorius AG, Göttingen
MC1	Sartorius AG, Göttingen

Zentrifugen:

Varifuge 3.OR,	Heraeus Instruments, Hanau
Multifuge1S-R,	Heraeus Instruments, Hanau

Fluoreszenzmikroskop:

Axioskop 2	Carl Zeiss AG, Göttingen
------------	--------------------------

Lichtmikroskope:

Axiovert 25 451205	Carl Zeiss AG, Göttingen
Axiostar plus 1169-149	Carl Zeiss AG, Göttingen

Kameras:

Axio Cam	Carl Zeiss AG, Göttingen
Canon EOS 405	Canon Deutschland GmbH, Krefeld
Power Shot A95	Canon Deutschland GmbH, Krefeld

Brutschränke:

IR autoflow Typ 450 E	NuAir, Inc., Plymouth, MN, USA
-----------------------	--------------------------------

Durchflusszytometer:

FACSCalibur™	Becton Dickinson Biosciences, Heidelberg
FACScan flow	Becton Dickinson Biosciences, Heidelberg

Photometer:

SPECTRAFluor F129003	Tecan, Grödig, Österreich
Infinite F200	Tecan, Grödig, Österreich

HPLC:

Analytische Anlage

Säule	RP-18 Material, Ø 4 mm, Länge 250 mm
Probenschleife	20 µl
Säulenofen	Shimadzu CTO-10 A
Pumpe	Knauer Type 6400 bzw. Type 6400 88A
Gradientenformer	Knauer T2A
Mischkammer	Knauer A0258
Detektor	Knauer Variable Wavelength Monitor UV/VIS

Halbpräparative Anlage

Säule	RP-18 Material, Ø 8 mm, Länge 250 mm
Probenschleife	20-100 µl
Säulenofen	Shimadzu CTO-10 AS VP
Pumpe	Shimadzu LC-10 AT VP
Gradientenformer	Knauer T2A
Detektor	Shimadzu SPD-M10 A VP
Fraktionssammler	Shimadzu FRC-10

Diverse Geräte:

Freezing Container	Nalge Nunc, Rochester, New York, USA
Heizplatte / Magnetrührer	IKA Works Werke, Staufen
pH-Meter CG 825	Schott, Hofheim
Schüttler MTS 4	IKA Works Werke, Staufen
Sterilwerkbank Type A/B3	NuAir, Illinois, USA
Minishaker KMS1	IKA Works Werke, Staufen
Wasserbad	Dinkelberg-Labortechnik, Ulm

3.2. Extrakte und Testsubstanzen**3.2.1. EPs[®] 7630**

Der industriell gefertigte Extrakt EPs[®] 7630 (Chargen-Nr. 007) aus Wurzeln von *P. sidoides* wurde freundlicherweise von der Firma Dr. Willmar Schwabe GmbH & Co KG, Karlsruhe bereitgestellt. Es handelt sich um einen wässrig-ethanolischen Auszug (11% m/m) mit einem Droge/Extrakt Verhältnis von 1:8-10.

Gewinnung einer methanollöslichen (MSP) und einer methanolunlöslichen (MIP) Fraktion

Für eine Vorfraktionierung der im Spezialextrakt enthaltenen Proanthocyanidine in oligomere und polymere Anteile wurden 50 g EPs[®] 7630 in 500 ml Methanol suspendiert und über Nacht gerührt. Der methanolunlösliche Anteil (MIP) wurde mit Hilfe eines Papierfilters abgetrennt, die klare Lösung am Rotavapor bei maximal 40 °C bis zur Trockne eingengt (MSP) und die Rückstände im Vakuumtrockenschrank bei 25 °C getrocknet.

Polyphenolfreie EPs[®] 7630-Fractionen

Gemäß der Vorschrift zur Bestimmung des Gerbstoffgehaltes des Europäischen Arzneibuches 6.0 ([Ph. Eur. 2008](#)) wurden jeweils 2,5 g der Extrakte in 500 ml Ethanol (20%) gelöst. Nach Zugabe von 25 g Hautpulver wurde die Lösung 1 h intensiv gerührt. Das zunächst hellgraue Hautpulver nahm eine bräunliche Färbung an als Zeichen adsorbierter Polyphenole aus dem Reaktionsansatz. Anschließend wurde das Hautpulver über einen Papierfilter abgetrennt und das erhaltene weitgehend polyphenolfreie Filtrat gefriergetrocknet.

3.2.2. Weitere gerbstoffhaltige Pflanzenextrakte

Von der Firma Schwabe zur Verfügung gestellte Extrakte:

EPs[®] 7630-Fraktion

Dimere Proanthocyanidinfraktion (interne Firmenbezeichnung KS02-158-15)

Früchte von *Vaccinium macrocarpon* AIT.

Wässriger Cranberryextrakt (interne Firmenbezeichnung PSC 2313/L20/Rö11-159-35)

Blattextrakte aus *Ginkgo biloba* L.

Acetoneluat (interne Firmenbezeichnung EGb761/Ch.249 (Bz05-207-26))

Methanoleluat (interne Firmenbezeichnung EGb761/Ch.249 (Bz05-207-27))

Im Arbeitskreis verfügbare Extrakte:

***Betula* spp.**

(dimere bis oligomere Procyanidinfraktion aus der Rinde von *Betula* spp., aufgebaut aus Catechin- und Epicatechinbausteinen) ([Kolodziej, 1988](#))

***Crataegus oxyacantha* L.**

(dimere bis tetramere Procyanidinfraktion aus Früchten, aufgebaut aus wenigen Catechin- und überwiegend Epicatechinbausteinen) ([Kolodziej, 1984a](#))

***Nelia meyeri* SCHWANT.**

(dimere bis oligomere Procyanidinfraktion aus Blättern, aufgebaut aus ausschließlich Epicatechinbausteinen) ([Kolodziej, 1984b](#))

***Salix* spp.**

(dimere bis oligomere Procyanidinfraktion aus der Rinde, aufgebaut ausschließlich aus Catechinbausteinen) ([Kolodziej, 1990](#))

Sonstiger Pflanzenauszug:

***Echinacea purpurea* (L.) MOENCH.**

Presssaft, freundlicher Weise zur Verfügung gestellt von der Fa. Madaus, Köln

3.2.3. Reinsubstanzen

Flavan-3-ole	
(+)-Catechin	(Roth, Karlsruhe. Art.-Nr. 0200.1)
(-)-Epicatechin	(Fluka Chemie AG, Buch., Art.-Nr. W 1714)
(-)-Epicatechin-3-O-gallat	(Roth, Karlsruhe. Art.-Nr. 6358.1)
(-)-Epigallocatechin	(Prof. D. Ferreira, University of Mississippi, USA)
(-)-Epigallocatechin-3-O-gallat	(Prof. D. Ferreira, University of Mississippi, USA)
Cumarine	
Aesculetin	(Fluka, Steinheim. Art.-Nr. 02330)
Aesculin	(Roth, Karlsruhe. Art.-Nr. 8704)
Cumarin	(Roth, Karlsruhe. Art.-Nr. 7942.1)
Scopoletin	(Roth, Karlsruhe. Art.-Nr. 7210)
Umbelliferon	(Roth, Karlsruhe. Art.-Nr. 5437.1)
Umckalin	(Fa. Dr. Willmar Schwabe & Co KG, Karlsruhe)
Herniarin	(Schulz Chemie, Düsseldorf. Art.-Nr. 1180)
Einfache phenolische Verbindungen	
Gallussäure	(Roth, Karlsruhe. Art.-Nr. 7300.1)
Kaffeesäure	(Roth, Karlsruhe. Art.-Nr. 5574.1)
Pyrogallol	(Roth, Karlsruhe. Art.-Nr. 4364.1)
Flavonole	
Quercetin	(Lachema, Prag. Art.-Nr. 800260177)
Quercitrin	(Roth, Karlsruhe. Art.-Nr. 4177)
Rutosid	(Roth, Karlsruhe. Art.-Nr.7178.1).

3.3. Phytochemische Untersuchungen

3.3.1. Lösungsmittel

Die verwendeten Lösungsmittel stammen, falls nicht anders angegeben, von der Firma Merck, Darmstadt bzw. KMF, Lohmar.

3.3.2. Analytische Dünnschichtchromatographie

DC-Platten

DC-Aluminiumfolien mit Kieselgel 60 F ₂₅₄	(Merck, Darmstadt. Art.-Nr. 1.05554.0001)
DC-Aluminiumfolien RP-18 F ₂₅₄	(Merck, Darmstadt. Art.-Nr. 1.05559.0001)
HPLTC Fertigplatten Kieselgel 60 F ₂₅₄	(Merck, Darmstadt. Art.-Nr. 5629)
DC-Aluminiumfolien Cellulose F ₂₅₄	(Merck, Darmstadt. Art.-Nr. 1.05574)

Fließmittel (Angaben in Volumenanteilen)

- **F1** Ethylacetat – Ameisensäure – Wasser 18: 1 : 1
- **F2** Toluol – Aceton 4: 1
- **F3** Ameisensäure-Salzsäure-Wasser 10: 1: 3

Sprühreagenzien für dc Untersuchungen

- **Anisaldehyd-Schwefelsäure-Reagenz**

0,5 ml Anisaldehyd wurden nacheinander mit 10 ml Eisessig, 85 ml Methanol und 5 ml konzentrierter Schwefelsäure unter Kühlung versetzt. Nach Besprühen wurden die DC-Platten 5 -10 min. auf 100 °C bis zur optimalen Farbentwicklung erhitzt. Das Reagenz färbt unspezifisch verschiedene Verbindungsklassen wie Phenole, Terpene, Zucker und Steroide ([Wagner und Blatt, 1983](#)).

- **Eisen-III-chlorid-Reagenz**

10%ige Lösung von Eisen-III-chlorid in Methanol (M/V) und Auswertung der Farbentwicklung im Tageslicht. Das Reagenz färbt Verbindungen mit einer phenolischen OH-Gruppe orange-gelb, Substanzen mit zwei vicinalen OH-Gruppen grün und solche mit drei vicinalen OH-Gruppen intensive blau ([Wagner und Blatt, 1983](#)).

- **Vanillin-Salzsäure-Reagenz**

Die zu entwickelnden DC-Platten wurden zunächst mit einer 4%igen Lösung von Vanillin in Methanol besprüht und nach dem Trocknen mit konzentrierter Salzsäure. Flavan-3-ole und Proanthocyanidine färben sich sofort typisch rot ([Broadhurst und Jones, 1978](#)).

- **Kalium-Hydroxid-Reagenz**

Die Platten wurden mit einer 5%iger methanolischen KOH-Lösung besprüht. Beim Betrachten im UV-Licht ($\lambda=365$ nm) fluoreszieren Cumarine intensiv.

3.3.3. Säulenchromatographie

- **Säulen**

Für die säulenchromatographischen Trennungen wurden Glassäulen mit ca. 95 cm Länge und 3 cm Durchmesser verwendet.

- **Säulenmaterial**

Sephadex LH-20

(Pharmacia, Freiburg. Art.-Nr. 17-0090-01)

3.3.4. Anthocyanidinreaktion

Ca. 1 mg der Probe wurde in 5%iger ethanolischer Salzsäure (5 ml) unter Rückfluss 60 min. erhitzt. Dabei färbte sich die Lösung in Anwesenheit von Proanthocyanidinen intensiv rot. Der Ethanol wurde am Rotavapor bei 40 °C entfernt und die verbleibende salzsaure Lösung mehrmals mit Amylakohol ausgeschüttelt. Die vereinigten Phasen wurden wiederum eingengt und die entstandenen Anthocyanidine mittels Petroletherzugabe ausgefällt. Referenzsubstanzen (Cyanidinchlorid, Delphinidinchlorid) und die zu analysierenden Proben wurden auf Celluloseplatten aufgetragen und mit dem Fließmittel F3 entwickelt.

3.3.5. Bestimmung des Gerbstoffgehalts

Verwendete Materialien

Freiberger Hautpulver	(Forschungsinst. f. Leder u. Kunststoff, Freiberg)
Ethanol	
Präzisionsquarzküvetten	(Hellma, Müllheim. Art.-Nr. 110-10-40)
Pyrogallol	(Lancaster. Eastgate, England. Art.-Nr. 6903)
Folin-Ciocalteus Reagens	(Merck, Darmstadt. Art.-Nr. 1090010100)
Na ₂ CO ₃ (290 g/l in Wasser)	(Merck, Darmstadt. Art.-Nr. 1063950050)

Durchführung

Die Bestimmung des Gerbstoffgehaltes erfolgte nach der Vorschrift des Europäischen Arzneibuches 6.0, [Grundwerk 2008](#), Kap. 2.8.14 „Bestimmung des Gerbstoffgehaltes pflanzlicher Drogen“.

Vorbereitung der Proben

- **Gepulverte Drogen**

250 mg des gepulverten Drogenmaterials wurden in einem 250 ml Rundkolben mit 150 ml Ethanol (20%) versetzt und 30 min. unter Rückfluss erhitzt. Nach dem Abkühlen wurde die Lösung in einen 250 ml Messkolben überführt und auf 250 ml aufgefüllt. Nach dem Absetzen fester Bestandteile wurde die Lösung filtriert, wobei die ersten 50 ml des Filtrats verworfen wurden.

- **Trockenextrakte**

Bei der Untersuchung von Trockenextrakten entfällt die Extraktion unter Rückfluss. Es wurden 250 mg des Trockenextraktes direkt in einen 250 ml Messkolben mit Ethanol (20%) gelöst.

Bestimmung der Gesamtpolyphenole

5 ml der oben hergestellten Lösungen wurden mit Wasser zu 25 ml verdünnt. 2 ml dieser Verdünnung wurden mit 1 ml Folin-Ciocalteus Phenolreagenz und 10 ml Wasser versetzt und anschließend mit der Natriumcarbonatlösung auf 25 ml aufgefüllt. Die Messung der Absorption (A_1) erfolgte nach 30 min. bei 760 nm gegen Wasser als Kompensationsflüssigkeit.

Durch Hautpulver nicht absorbierbare Polyphenole

10 ml der oben hergestellten Lösungen wurden mit 0,1 g Hautpulver versetzt, 60 min. lang kräftig gerührt und anschließend filtriert. Mit dem Filtrat wurde analog der Bestimmung der Gesamtpolyphenole verfahren. Die gemessene Absorption entspricht A_2 .

Referenzlösung

Als Referenzlösung diente eine frisch bereitete wässrige Lösung von Pyrogallol (2,5 mg Pyrogallol/ 100 ml). 2 ml dieser Lösung wurden mit 1 ml Folin-Ciocalteus Phenolreagenz und 10 ml Wasser versetzt, anschließend mit der Natriumcarbonatlösung auf 25 ml aufgefüllt. Die Absorption (A_3) wurde ebenfalls nach 30 min. bei 760 nm vermessen.

Auswertung

Der prozentuale Gehalt an Gerbstoffen, berechnet als Pyrogallol, wurde nach folgender Formel ermittelt:

$$\text{Gerbstoffgehalt [\%]} = \frac{62,5 \times (A_1 - A_2) \times m_2}{A_3 \times m_1}$$

m_1 = [g] Extrakt
 m_2 = [g] Pyrogallol
 A_1 = Absorption Gesamtpolyphenole
 A_2 = Absorption Restpolyphenole
 A_3 = Absorption Referenzlösung

3.4. Isolierung und Strukturaufklärung von Einzelverbindungen

3.4.1. Cumarine

7-Hydroxy-5,6-dimethoxycumarin (Umckalin)

Aus der methanollöslichen Phase (MSP) wurden nach Säulenchromatographie an Sephadex LH-20 die Fraktionen 30-40 (Elutionsvolumen 120 ml) vereinigt und am Rotationsverdampfer bei 40 °C eingeeengt. Der Rückstand wurde mit Hilfe der präparativen HPLC weiter aufgereinigt (Wasser/Methanolgradient: 1:0 → 0:1; 40 min, Flussrate: 3 ml/min) und die Fraktion mit der Retentionszeit von 25,58 min isoliert. Nach der Überprüfung der Reinheit wurde die Substanz der Massenspektroskopie sowie einer ^1H -NMR-spektroskopischen Messung zugeführt.

Chromatographische Parameter

Stationäre Phase	DC-Alufolien Kieselgel 60 F ₂₅₄
Mobile Phase	F1
R _f -Wert	0,92
Detektion	UV 254 /365 nm

Strukturaufklärung

Summenformel	C ₁₁ H ₁₀ O ₅
Relative Molekülmasse	
berechnet	222
gefunden (EI-MS; 200 °C)	[M] ⁺ 222 (207, 193, 179, 151)
^1H -NMR-Spektroskopische Daten (400 MHz, CD ₃ OD)	δ 3,85 (s, 5-OCH ₃); 4,03 (s, 6-OCH ₃); 6,18 (d, J = 9,5 Hz, 3-H); 6,58 (s, 8-H); 8,04 (d, J = 9,7 Hz, 4-H)

6,8-Dihydroxy-5,7-dimethoxycumarin

Aus der methanollöslichen Phase (MSP) wurden nach Säulenchromatographie an Sephadex LH-20 die Fraktionen 46-55 (Elutionsvolumen 110 ml) vereinigt und am Rotationsverdampfer bei 40 °C eingengt. Der Rückstand wurde mit Hilfe der präparativen HPLC weiter aufgereinigt (Wasser/Methanolgradient: 1:0 → 0:1; 40 min, Flussrate: 3 ml/min) und die Fraktion mit der Retentionszeit von 11,18 min isoliert. Nach der Überprüfung der Reinheit wurde die Substanz der Massenspektroskopie sowie einer ¹H-NMR-spektroskopischen Messung zugeführt.

Chromatographische Parameter

Stationäre Phase	DC-Alufolien Kieselgel 60 F ₂₅₄
Mobile Phase	F1
R _f -Wert	0,54
Detektion	UV 254 /365 nm

Strukturaufklärung

Summenformel	C ₁₁ H ₁₀ O ₆
Relative Molekülmasse (m/z)	
berechnet	238
gefunden (EI-MS; 200 °C)	[M] ⁺ 238 (223, 208, 194)
¹ H-NMR-Spektroskopische Daten (400 MHz, CD ₃ OD)	δ 3,86 (s, OCH ₃); 3,99 (s, OCH ₃); 6,16 (d, J = 9,7, 3-H); 8,04 (d, J = 9,6 Hz, 4-H)

Mischung aus einem tetra- und einem trioxygenierten Cumarin

Aus der methanollöslichen Phase (MSP) wurden nach Säulenchromatographie an Sephadex LH-20 die Fraktionen 46-55 (Elutionsvolumen 110 ml) vereinigt und am Rotationsverdampfer bei 40 °C eingeeengt. Der Rückstand wurde mit Hilfe der präparativen HPLC weiter aufgereinigt (Wasser/Methanolgradient: 1:0 → 0:1; 40 min, Flussrate: 3 ml/min) und die Fraktion mit der Retentionszeit von 7,68 min isoliert. Nach der Überprüfung der Reinheit wurde die Substanz der Massenspektroskopie sowie einer ¹H-NMR-spektroskopischen Messung zugeführt.

Chromatographische Parameter

Stationäre Phase	DC-Alufolien Kieselgel 60 F ₂₅₄
Mobile Phase	F1
R _f -Wert	0,48
Detektion	UV 254 /365 nm

Strukturaufklärung

Summenformel	C ₁₁ H ₁₀ O ₉ S ₁ / C ₉ H ₆ O ₈ S ₁
Relative Molekülmasse	
berechnet	318/ 273
gefunden (EI-MS; 200 °C)	[M] ⁺ 328, 223, 208, 194, 97, 81, 64, 48
¹ H-NMR-Spektroskopische Daten (400 MHz, CD ₃ OD)	
trioxygeniertes Cumarin	δ 3,90 (s, OCH ₃); 6,22 (d, J=9,4 Hz, 3-H); 7,15 (s, 5 oder 8-H), 7,85 (d, J=10 Hz, 4-H)
tetraoxygeniertes Cumarin	δ 3,90 (s, OCH ₃); 4,02 (s, OCH ₃); 6,25 (d, J=9,5 Hz, 3-H); 7,82 (d, J=9,6 Hz, 4-H)

3.4.2. Flavan-3-ole

Catechin / Epicatechin

Das Substanzgemisch Catechin/Epicatechin wurde aus der methanollöslichen Phase nach Fraktionierung an einer Sephadex LH-20 Säule mit Methanol als Eluens gewonnen. Die Fraktionen 45 – 60 (170 ml) wurden vereinigt und eingeeengt. Der Rückstand wurde mit Hilfe der präparativen HPLC weiter aufgereinigt (Wasser/Methanolgradient: 1:0 → 0:1; 40 min, Flussrate 3 ml/min). Anhand des

Detektionsverhaltens nach Besprühen mit dem Vanillin-Salzsäure-Reagenz (Rotfärbung) und Co-chromatographie mit authentischen Referenzsubstanzen wurde in der Fraktion mit der Retentionszeit von 15- 18 min das Vorkommen von Flavan-3-olen belegt.

Chromatographische Parameter

Stationäre Phase	DC-Alufolien Kieselgel 60 ₂₅₄
Mobile Phase	F1
R _f -Wert	0,88
Detektion	Vanillin/HCl: rot / Fe-(III)-chlorid: grünlich Fluoreszenzlöschung bei 254/365 nm

Strukturaufklärung

Summenformel	C ₁₅ H ₁₄ O ₆
Relative Molekülmasse	
berechnet	290,0786
gefunden (TOF-MS)	[M] ⁺ 291,0868 (pos. Mod.)
¹ H-NMR-Spektroskopische Daten (400 MHz in CD ₃ OD)	
Catechin	δ 2,48 (dd, <i>J</i> = 8,0 und 16,0 Hz, 4-H _{ax}), 2,83 (dd, <i>J</i> = 5,5 und 16,0 Hz, 4-H _{eq}), 3,95 (m, 3-H), 4,54 (d, <i>J</i> = 8,0 Hz, 2-H), 5,83 (d, <i>J</i> = 2,0 Hz, 6-H), 5,90 (d, <i>J</i> = 2,0 Hz, 8-H), 6,70 (dd, <i>J</i> = 2,0 und 8,0 Hz, 6'-H), 6,74 (d, <i>J</i> = 8,0 Hz, 5'-H), 6,82 (d, <i>J</i> = 2,0 Hz, 2'-H).
Epicatechin	δ 2,71 (dd, <i>J</i> = 2,5 und 16,5 Hz, 4-H _{ax}), 2,84 (dd, <i>J</i> = 4,5 und 16,5 Hz, 4-H _{eq}), 4,16 (br s, 3-H), 4,80 (br s, 2-H), 5,89 (d, <i>J</i> = 2,0 Hz, 6-H), 5,91 (d, <i>J</i> = 2,0 Hz, 8-H), 6,74 (d, <i>J</i> = 8,0 Hz, 5'-H), 6,78 (dd, <i>J</i> = 2,0 und 8,0 Hz, 6'-H), 6,95 (d, <i>J</i> = 2,0 Hz, 2'-H)

Gallocatechin / Epigallocatechin

Das Substanzgemisch Gallocatechin/Epigallocatechin wurde gleichfalls aus der methanollöslichen Phase nach Aufreinigung an einer Sephadex LH-20 Säule isoliert. Der Rückstand der Fraktionen 65 – 80 (150 ml) wurde mit Hilfe der präparativen HPLC weiter aufgereinigt (Wasser/Methanolgradient: 1:0 → 0:1; 40 min, Flussrate 3 ml/min) und die Fraktion mit der Retentionszeit von 11- 15 min. isoliert.

Chromatographische Parameter

Stationäre Phase	DC-Alufolien Kieselgel 60 F ₂₅₄
Mobile Phase	F1
R _f -Wert	0,67
Detektion	Vanillin/HCl: rosa / Fe-(III)-chlorid: blau

Strukturaufklärung

Summenformel	C ₁₅ H ₁₄ O ₇
Relative Molekülmasse	
berechnet	306,0735
gefunden (HR-EIMS; 200 °C)	[M] ⁺ 307,0833 (pos. Mod.) [M] ⁻ 305, 0715 (neg. Mod.)
¹ H-NMR-Spektroskopische Daten (400 MHz in CD ₃ OD)	
Gallocatechin	δ 2,52 (dd, J= 7,9 und 16,1 Hz, 4-H _{ax}), 2,82 (dd, J = 2,74 und 16,6 Hz, 4-H _{eq}), 3,62 (m, 3-H), 4,55 (d, J = 7,0 Hz, 2-H), 5,88 (d, J = 2,2 Hz, 6-H), 5,94 (d, J = 2,4 Hz, 8-H), 6,42 (s, 2'/6'-H).
Epigallocatechin	δ 2,74 (dd, J= 3 und 16,6 Hz, 4-H _{ax}), 2,87 (dd, J = 4,4 und 16,6 Hz, 4-H _{eq}), 4,19 (m, 3-H), 4,77 (br, 2-H), 5,93 (d, J = 2,2, 6-H), 5,95 (d, J = 2,2, 8-H), 6,53 (s, 2'/6'-H).

3.4.3. Proanthocyanidindimere

Zur Gewinnung von Dimeren wurde der Gesamtextrakt zunächst einer Filtration an LH20 unterworfen (Schötz und Nöldner, 2007). Nach Waschen mit H₂O, wurde die beladene Säule zunächst mit EtOH dann mit MeOH und dann mit Aceton eluiert und die Fraktionen massenspektrometrisch untersucht. Dabei erwies sich die EtOH-Fraktion als besonders reich an Dimeren. Daher wurde diese weiter an HW40S mit MeOH aufgetrennt und so eine reine Dimerenfraktion erhalten. Die einzelnen Verbindungen wurden mittels präparativer HPLC gewonnen.

Gallocatechin-4 α ,8-epigallocatechin

Chromatographische Parameter

Stationäre Phase	DC-Alufolien Kieselgel 60 F ₂₅₄
Mobile Phase	F1
R _f -Wert	0,36
Detektion	Vanillin/HCl: rosa / Fe-(III)-chlorid: bläulich

Strukturaufklärung

Summenformel	C ₃₀ H ₂₆ O ₁₄
Relative Molekülmasse	
berechnet	610,1314
gefunden (HR-EIMS)	[M] ⁺ 611,1450 (pos. Modus)
¹ H-NMR-Spektroskopische Daten (400 MHz in CD ₃ OD)	s. Tabelle 8. S. 78

Epigallocatechin-4 β , 8-epigallocatechin

Chromatographische Parameter

Stationäre Phase	DC-Alufolien Kieselgel 60 F ₂₅₄
Mobile Phase	F1
R _f -Wert	0,36
Detektion	Vanillin/HCl: rosa / Fe-(III)-chlorid: grünblau

Strukturaufklärung

Summenformel	C ₃₀ H ₂₆ O ₁₄
Relative Molekülmasse	
berechnet	610,1314
gefunden (HR-EIMS)	611,1250; 633,
¹ H-NMR-Spektroskopische Daten	s. Tab. 81

Gallocatechin-4 α ,6-gallocatechin**Chromatographische Parameter**

Stationäre Phase	DC-Alufolien Kieselgel 60 F ₂₅₄
Mobile Phase	F1
R _f -Wert	0,36
Detektion	Vanillin/HCl: rosa / Fe-(III)-chlorid: blau

Strukturaufklärung

Summenformel	C ₃₀ H ₂₆ O ₁₄
Relative Molekülmasse	
berechnet	610,1405
gefunden (TOF-MS)	611,
¹ H-NMR-Spektroskopische Daten (400 MHz in CD ₃ OD)	s. Tab. S 84

Epigallocatechin-4 β ,8-epicatechin**Chromatographische Parameter**

Stationäre Phase	DC-Alufolien Kieselgel 60 F ₂₅₄
Mobile Phase	F1
R _f -Wert	0,36
Detektion	Vanillin/HCl: rosa / Fe-(III)-chlorid: bläulich

Strukturaufklärung

Summenformel	C ₃₀ H ₂₆ O ₁₃
Relative Molekülmasse	
berechnet	594,1365
gefunden (TOF-MS)	[M] ⁺ 595,1428
¹ H-NMR-Spektroskopische Daten (400 MHz in CD ₃ OD)	δ 2,52-2,90 [m, 4-H ₂ (F)], 4,03 [m, 3-H (C)], 4,22 [m, 3-H (F)], 4,79 [br s, 4-H(C)], 4,89 [br s, 2-H (F)/(C)], 5,91-5,95 [br m, 6-H und 8-H (A)], 6,05 [br s, 6-H (D)], 6,47 [s, 2'/6' (E)], 6,71-6,72 [m, 2'/6'-H (E)], 7,05 [s, 5'-H (E)]

3.5. Biologische Arbeitsmethoden

3.5.1. Bestimmung antiadhäsiver Effekte

Verwendete Materialien

Columbia Blutagarplatten	(Heipha GmbH Heidelberg, Art.-Nr. 109e)
Tryptone Soya Broth (TSB)	(Oxoid, Cambridge. Art.-Nr. CM129)
PBS	(Biochrom AG, Berlin. Art.-Nr. L1825)
24-Well Zellkulturplatten	(Greiner Bio One. Art.-Nr. 662160)
Dulbeccos´ s MEM* (DMEM)	(Biochrom AG, Berlin. Art.-Nr. F 0425)
FKS „GOLD“ (hitzeinaktiviert)	(PAA, Pasching. Art.-Nr. A15649)
L-Glutamin (200 mM)	(Biochrom AG, Berlin. Art.-Nr. K 0282)
Trypsin 0,5% / EDTA 0,2% Lösung	(Biochrom AG, Berlin. Art.-Nr. L2153)
Eppendorftubes	(Sarstedt, Nümbrecht. Art.-Nr. 72.699)
Dimethylsulfoxid (DMSO)	(Sigma, Steinheim. Art.-Nr. D-8779)
Calcein-AM	(Molecular Prob., Karlsruhe. Art.-Nr. C-3100)
Ethidiumhomodimer	(Molecular Prob., Karlsruhe, Art.-Nr. E-1169)

Calcein-AM ist ein relativ unpolares Fluoresceinderivat und diffundiert leicht als nicht-fluoreszierende Substanz in das Zytoplasma von Zellen. Als unspezifisches Substrat von Esterasen wird es intrazellulär in vitalen Zellen zu Calcein hydrolysiert. Auf Grund der resultierenden Erhöhung der Polarität kann das gebildete Calcein die Zellmembran nicht mehr passieren. Das deacetylierte Produkt fluoresziert strukturbedingt durch das über das gesamte Molekül verteilte π -Elektronensystem, bei einer Anregung von 494 nm mit einem Emissionsmaximum von 517 nm und ist somit gut durchflusszytometrisch nachweisbar (Abbildung 10). Das Calcein-AM ist ein guter Marker für lebende Zellen.

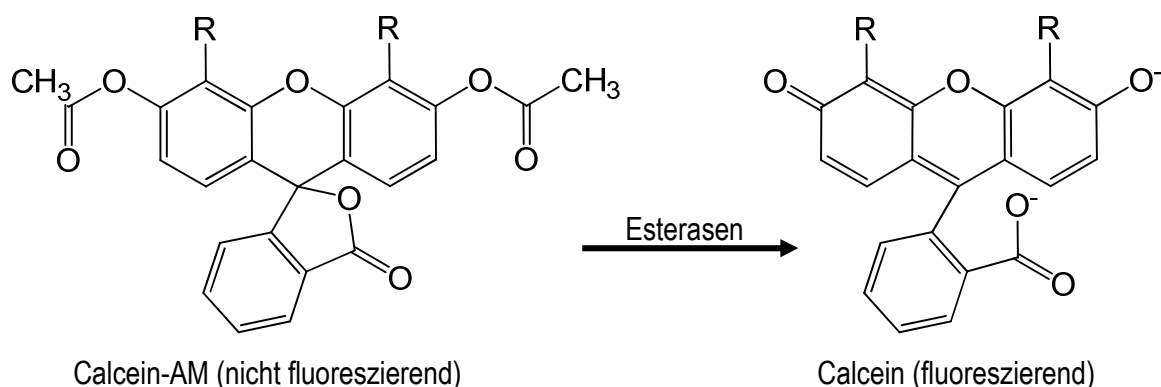


Abbildung 10: Hydrolyse von Calcein-AM

Der rote Farbstoff Ethidiumhomodimer (auch Ethd-1 oder EtDi genannt, Abbildung 11) dient der Markierung von toten Zellen. Ethidiumhomodimer dringt nur in Zellen ein, deren Membranintegrität gestört ist. (stark geschädigte oder bereits tote Zellen).

Nach Interkalation mit der DNA erhöht sich die rote Fluoreszenzintensität um das 40-fache und die so markierten Zellen können identifiziert werden.

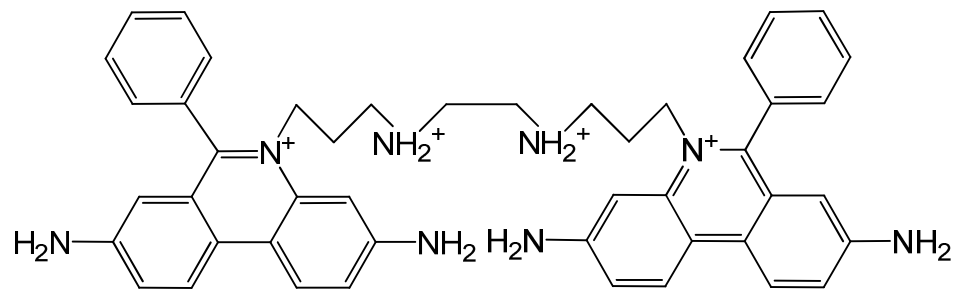


Abbildung 11: Ethidiumhomodimer

Der Inhalt eines Röhrchens (1 mg) wurde in 1,166 ml DMSO aufgenommen und anschließend mit 115,434 ml PBS verdünnt, um eine 10 μM Lösung zu erhalten. Diese Lösung wurde à 3 ml aliquotiert und bei $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ bis zur weiteren Verwendung aufbewahrt. Unmittelbar vor Bedarf wurde ein Röhrchen aufgetaut und durch Zugabe von 13 ml PBS die Gebrauchslösung hergestellt (2 μM Lösung).

Streptococcus pyogenes DSM 2071/Serogruppe A

Der verwendete Teststamm *Streptococcus pyogenes* DSM 2071 wird zu der Gruppe der A-Streptokokken gezählt. Dieser kann im menschlichen Organismus eitrige Infektionen wie Scharlach auslösen. Dabei handelt es sich um einen fakultativ anaeroben, unbeweglichen, Ketten oder Paare bildenden, grampositiven Erreger. Auf Blutagar ausplattiert bildet er weißlich graue Kolonien, die von einem hellen, klaren Hämolysehof umgeben sind, in dem mikroskopisch keine intakten Erythrozyten mehr erkennbar sind (β -Hämolyse). Der Erreger wurde vor dem Experiment auf eine Columbia-Blutagarplatte ausplattiert und 24 h bei $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ inkubiert.

Kultivierung der Streptokokken

Vor jedem Versuch wurden sechs TSB-haltige Röhrchen mit Streptokokken beimpft. Dazu wurden zwei bis drei der auf Blutagar angezüchteten Kolonien mit einer Platinöse in ein Röhrchen mit 5 ml TSB übertragen, geschüttelt und über Nacht bei $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ inkubiert. Am nächsten Morgen wurden die Röhrchen bei $4000 \times g$ 5 min.

zentrifugiert, der Überstand verworfen und die Pellets aus jeweils zwei Röhrchen in einem Eppendorf-Röhrchen vereinigt und zweimal mit PBS gewaschen.

Für die Versuche wurden, wie nachfolgend dargestellt, drei verschiedene Ansätze für die Einstellung der Detektoren, Parameter und Kompensation am Durchflusszytometer benötigt: zum einen ungefärbte lebende wie auch tote Streptokokken, des Weiteren mit Calcein-AM grün gefärbte Bakterien für den eigentlichen Versuch.

Kontrolle 1: ungefärbte lebende Streptokokken

Für die Geräteeinstellungen konnten direkt die unbehandelten Streptokokken verwendet werden. Die Keime sind 3-4 Tage bei +4 °C vital. Für eine Messung wurden 20 µl der Bakteriensuspension mit 800 µl Ethd-1-Lösung versetzt.

Kontrolle 2: tote Streptokokken

Um die Streptokokken abzutöten, wurden diese 15 min. lang bei 95 °C im Thermomixer mit 1100 U/ml geschüttelt. Für eine Messung wurden gleichfalls 20 µl dieser Bakteriensuspension mit 800 µl Ethd-1-Lösung versetzt.

Teststamm: grüne, lebende Streptokokken

Um die Bakterien für den Adhäsionsversuch detektierbar zu machen, wurden sie mit Calcein-AM gefärbt. Hierzu wurden die Bakterien mit 5 µl der Calcein-AM-Lösung versetzt und 60 min. bei 37 °C im Thermomixer bei 1100 U/min inkubiert. Der überschüssige Farbstoff wurde durch dreimaliges Waschen mit PBS entfernt. Von dieser Suspension wurde eine Bestimmung der Bakterienanzahl durchgeführt, um die Anwendungskonzentration errechnen zu können. Hierfür wurden serielle Verdünnungen der Bakterien auf Blutagarplatten ausgestrichen, über Nacht inkubiert und am nächsten Tag die Koloniebildenden Einheiten (*colony forming units*, CFU) bestimmt. Die Bakteriensuspension wurde auf 2×10^7 CFU/ml eingestellt.

HEp-2-Zellen

Hierbei handelt es sich um eine Zelllinie, die aus dem Epithel eines humanen Larynxkarzinoms gewonnen wurde. Dieser Zelltyp wird bei 37 °C und 5% CO₂ in Gewebekulturflaschen, bis zur Konfluenz kultiviert.

Kultivierung von HEp-2- Zellen

Alle 3-4 Tage wurden die voll bewachsenen Kulturflaschen vereinzelt. Dazu wurde unter sterilen Bedingungen das alte Medium abgegossen und der Zellrasen einmal mit 10 ml PBS gewaschen. Anschließend wurden die Zellen mit Hilfe von 5 ml Trypsin vom Flaschenboden gelöst. Um den Vorgang zu beschleunigen, wurde die Flasche 5-10 min. bei 37 °C inkubiert und die Zellen durch sanftes Klopfen an die Flaschenseite gelockert. Die Trypsinwirkung wurde durch Zugabe von 10 ml FCS-haltigem DMEM gestoppt. Anschließend wurden die Zellklumpen mehrfach mit der Pipette dispergiert, in ein 50 ml Falconröhrchen übertragen und 5 min. bei 1000 x g zentrifugiert. Das so erhaltene Pellet wurde in 10 ml DMEM resuspendiert und entweder zur weiteren Kultur oder direkt in einem Versuch genutzt.

Versuchsdurchführung

Grüngefärbte A-Streptokokken wurden mit HEp-2-Zellen koinkubiert und die nicht adhärennten Bakterien abzentrifugiert. Die Suspension wurde durchflusszytometrisch vermessen. Dabei war die Intensität der Grünfärbung proportional zu der Menge der adhärennten Bakterien auf der Zelloberfläche der Wirtszellen (Sethman et al., 2002). Um eine Aussage treffen zu können, welche der beiden Organismen durch die Testsubstanzen in ihrer Adhäsionsfähigkeit beeinflusst wird, wurden in einem Ansatz die Wirtszellen, in einem zweiten die Bakterien mit jeweils 30 µg/ml Extrakt vorinkubiert. Der Extrakt wurde vor der Weiterverwendung ausgewaschen.

Vorinkubation von HEp-2-Zellen

Zunächst wurde die Zellkonzentration mittels Neubaukammer bestimmt und die Zellzahl von $2,5 \times 10^5$ Zellen/ml eingestellt.

Für jeden der zu testenden Extrakte wurden vier Eppendorfröhrchen mit jeweils 1 ml dieser Zellsuspension befüllt.

Nach Zugabe von 30 µg/ml Testsubstanz (Stocklösung 1 mg/ml) wurden die Tubes kurz geschüttelt und bei 37 °C und 700 U/min im Thermomixer inkubiert.

Der Extrakt wurde anschließend entfernt. Dazu wurden die Zellen bei 1000 x g zentrifugiert, der Überstand abgegossen und das Pellet in 1 ml PBS resuspendiert. Dieser Vorgang wurde dreimal wiederholt und die Zellen zuletzt in 1 ml MEM aufgenommen.

Zu der so vorbehandelten Zellsuspension wurde 1 ml einer Bakteriensuspension mit $2,5 \times 10^7$ CFU/ml zugegeben und die Proben bei 37 °C im Thermomixer bei 700 U/ml inkubiert.

Alle 0, 60, 120 und 180 min. wurde ein Röhrchen entnommen und die Reaktion durch Einstellen in einen eiskalten Aluminiumblock für 5 min. gestoppt. Anschließend wurden die Bakterien bei 1000 x g abzentrifugiert.

Das Pellet wurde in 800 µl Ethidiumhomodimer-Lösung aufgenommen, resuspendiert, in ein FACS-Tube überführt und durchflusszytometrisch analysiert.

Vorinkubation von A-Streptokokken

Nach Bestimmung der Bakterienkonzentration wurde eine Suspension mit $2,5 \times 10^7$ grün gefärbten Bakterien/ml in DMEM hergestellt.

Für jeden der zu testenden Extrakte wurden vier Eppendorftubes mit der Suspension befüllt, jeweils mit 30 µg der Testsubstanz (Stocklösung 1 mg/ml) versetzt und geschüttelt.

Nach einer einstündigen Inkubation bei 37 °C und 700 U/ml im Thermomixer wurde die Testsubstanz entfernt. Dazu wurden die Eppendorftubes bei 4000 x g zentrifugiert, der Überstand verworfen und das Pellet in 1 ml PBS resuspendiert. Dieser Vorgang wurde dreimal durchgeführt und die Bakterien wurden in 1 ml DMEM aufgenommen.

Hierzu wurde 1 ml einer Hep-2 Zellsuspension mit $2,5 \times 10^5$ Zellen/ml zugegeben und leicht geschüttelt.

Die Inkubation fand bei 37 °C und 700 U/min im Thermomixer statt.

Alle 0, 60, 120 und 180 min. wurde für jede Testsubstanz ein Tube entnommen. Um die Reaktion abzustoppen, wurden die Tubes 5 min. in einen eiskalten Aluminiumblock gestellt. Anschließend wurden die Bakterien bei 1000 x g abzentrifugiert.

Das Pellet wurde in 800 µl Ethidiumhomodimer-Lösung aufgenommen, resuspendiert, in ein FACS-Tube überführt und durchflusszytometrisch vermessen.

Auswertung

Die Auswertung der FACS-Daten erfolgte mit dem Programm CellQuestPro®. Zunächst wurden unter Verwendung des Forward und Side Scatter die Wirtszellen von nicht adhärirten Bakterien sowie Zelltrümmern getrennt. Anschließend wurden die Zellen hinsichtlich ihrer bakteriellen Adhärenz in einem Dotplot dargestellt. Mit der grünen Fluoreszenz (FL1-Kanal) wurden die Calcein-gefärbten Bakterien auf der x-Achse, mit der roten Fluoreszenz tote Wirtszellen auf der y-Achse dargestellt. In Abbildung 12 ist beispielhaft die Auswertung der Daten verdeutlicht. Das Dotplot in Abbildung 12 A zeigt die Messpunkte einer Probe, welche ausschließlich aus unbehandelten HEP-2-Zellen bestand. Verstärkung und Kompensation wurden so gewählt, dass die Intensität der Fluoreszenz für die Zellen im FL1-Kanal unter 10^1 lagen und im FL3-Kanal unter 10^2 . Bei diesen Einstellungen sind im oberen linken Quadrant die toten Zellen, im unteren rechten Quadrant, die Zellen mit adhärenenten Bakterien dargestellt. In Abbildung 12 B sind HEP-2-Zellen dargestellt, die 5 min. mit den grün gefärbten Streptokokken inkubiert wurden. Deutlich zu erkennen ist eine weitere Population für HEP-2-Zellen mit adhärenenten grün gefärbten Streptokokken weiter rechts im grünen Bereich (FL1-Kanal höher als 10^1 , unteres, rechtes Quadrant). Für die Auswertung wurde der prozentuale Anteil der Messpunkte aus dem unteren rechten Quadrant herangezogen. Abbildung 12 C zeigt unbehandelte HEP-2-Zellen unter dem Fluoreszenzmikroskop, Abbildung 12 D HEP-2-Zellen mit adhärenenten Streptokokken. Die Versuche wurden mindestens dreimal durchgeführt. Die Signifikanzen wurden mit Hilfe des Programms Microcal Origin Pro® berechnet.

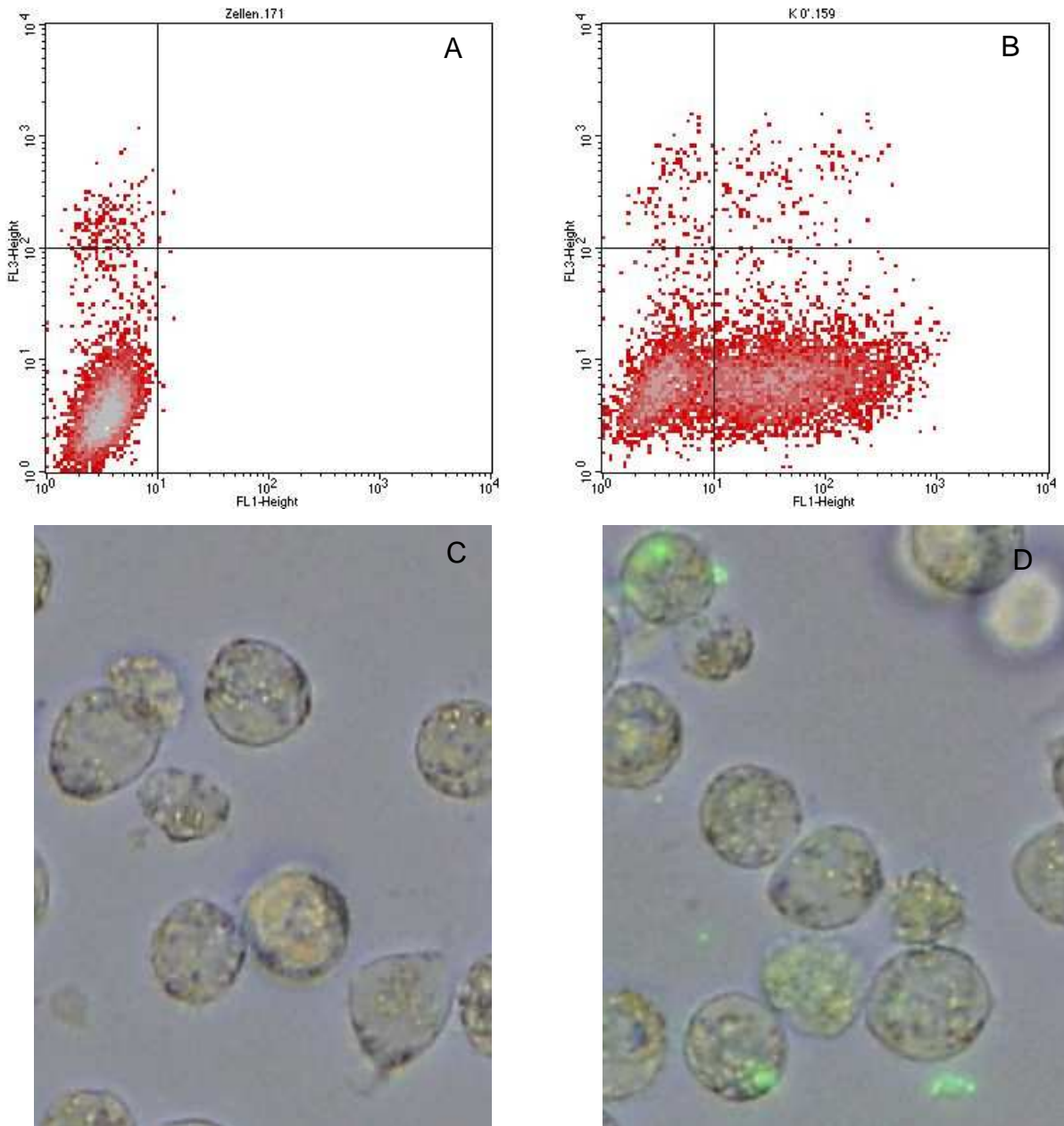


Abbildung 12: FACS-Bilder und mikroskopische Kontrollen

FACS-Histogramme bzw. mikroskopische Abbildungen von unbehandelten Zellen (A) bzw. (C) und Zellen, die mit Calcein-AM gefärbten A-Streptokokken koinkubiert wurden (B) bzw. (D)

3.5.2. Assay zur Messung der Neuraminidaseaktivität

Verwendete Materialien

Mikrotiterplatte schwarz F-Profil (VWR, Wien. Art.-Nr. 735-0527)
 MES-Puffer
 MES (32,5 mM) (Sigma-Aldrich, München. Art.-Nr. M3671-50G)
 CaCl₂ (4 mM) (Merck, Darmstadt. Art.-Nr. 2385)
 Nach Lösen in ddH₂O wurde mit NaOH auf einen pH-Wert von 6,5 eingestellt.

MUNANA (Sigma-Aldrich, München. Art.-Nr. M8639)
 25 mg in 51,08 ml MES-Puffer lösen = 1mMol/l

Neuraminidase (1 U/ml) (Roche, Mannheim. Art.-Nr. 11 080 725 001)
 Vor Gebrauch 1:10 mit MES-Puffer verdünnt = 100mU/ml.

Durchführung

Die Messungen wurden als Doppelbestimmung ausgeführt. Zunächst wurden 60 µl MES-Puffer vorgelegt und jeweils 10 µl Testlösung (Konzentrationen der Testsubstanzen 0-1000 mg/ml) zugegeben. Anschließend wurden zügig 20 µl MUNANA und 10 µl Enzym zupipettiert. Die Platte wurde sofort in den ELISA-Reader gestellt und die erste Messung eine Minute nach Beginn der Reaktion vorgenommen. Die Fluoreszenz wurde bei 37 °C siebenmal alle zwei min. erfasst. Die Anregungswellenlänge betrug 360 nm, die Emission wurde bei 465 nm gemessen. Für jede Testlösung wurde zudem die Eigenfluoreszenz der Testsubstanzen (Negativkontrolle) bestimmt. Dazu wurde das Enzym durch Puffer ersetzt. Zur Bestimmung der Positivkontrolle (100% Enzymaktivität) wurde statt der Substanz lediglich das Lösungsmittel eingesetzt (Tabelle 6).

Tabelle 6: Pipettierschema

	Probe	Negativkontrolle	Positivkontrolle
MES-Puffer	60 µl	60 µl	60 µl
Testsubstanz	10 µl	10 µl	10 µl LSM
MUNANA	20 µl	20 µl	20 µl
Enzym	10 µl	10 µl Puffer	10 µl
Gesamtvolumen	100 µl	100 µl	100 µl

Auswertung

Die Werte der Doppelbestimmung wurden gemittelt und die Absorption der Negativkontrolle abgezogen. Die so bereinigten Messwerte für jede Konzentration wurden gegen die Zeit aufgetragen und die Steigung der Gerade bestimmt. Die Steigung für die Positivkontrolle entspricht 100% Enzymaktivität. Die Steigungen der Geraden für die mit Testsubstanzen behandelten Proben wurden analog ermittelt und in Relation zur Positivkontrolle gesetzt (prozentuelle Restaktivität). Nach Auftragen der Restaktivität gegen Substanzkonzentration wurde eine Geradengleichung bestimmt. Die Gleichung wurde nach x aufgelöst und für y 50% eingesetzt. Der so errechnete IC₅₀-Wert stellt die Substanzkonzentration dar, bei der noch 50% der Enzymaktivität vorliegt.

Kurvengleichung

$$y = a \cdot x + b$$

Aufgelöst nach x

$$x = y/a - b$$

y = gemessene Absorption; x = Restneuraminidaseaktivität;

a = Steigung; b = Y-Achsenabschnitt

3.5.3. Leishmanieninfektionsmodell

Verwendete Materialien

24-Well UpCell™ Platten	(Nunc, Langenselbold, Art.-Nr. 174899)
Einmalspritze 5 ml	(B.Braun, Melsungen. Art.-Nr. 4606051V)
Injektions-Kanüle Gr. 20	(B.Braun, Melsungen. Art.-Nr. 0123)
Rundbogenröhrchen	(BD, Erembodegem. Belgien. Art.-Nr. 352235)
Lipopolysaccharid (LPS)	(aus <i>Salmonella abortus equi</i> zur Verfügung gestellt von O. Holst, Forschungsinstitut Borstel)
Murines rINF- γ	(Genetech, San Francisco, CA, USA)

Leishmanien-Wachstumsmedium

FKS (hitzeinaktiviert, 5%)	(PAA Laboratories, Cölbe)
BMM Φ -konditionierter Überstand (15%)	
Natriumpyruvat-Lösung (1%)	(Sigma, Art.-Nr. S8636, 100 mM)
Hosmem II, Lösung B (0,25%)	(2,5 mg Hemin und 5 mg Folsäure/ml)
Streptomycin/Penicillin G (1%)	(PAA, Cölbe. Art.-Nr. P11-010. 100x konzentriert)
Geneticin (25 μ g/ml)	(Gibco, Paisley, UK. Art.-Nr. G418,)
RPMI 1640	(Invitrogen, Paisley, UK, Art.-Nr. 51800-043)

Pluznik-Medium

FKS (hitzeinaktiviert, 10%)	(Bio Whittaker, Versiers, Belgien)
Pferdeserum (hitzeinaktiviert, 5%)	(Gibco, Paisley, UK, Art.-Nr. 16050-122)
L929-konditioniertes Medium (15%)	
D-Glucose (20 mM)	(Sigma-Aldrich, Steinheim. Art.-Nr. G8644)
Natriumpyruvat-Lösung (1%)	(Sigma, Art.-Nr. S8636, 100 mM)
Streptomycin/Penicillin G (1%)	(PAA, Cölbe. Art.-Nr. P11-010. 100x konzentriert)
RPMI 1640	(Invitrogen, Paisley, UK. Art.-Nr. 51800-043)

RPMI (je nach FKS-Anteil als R10 (10%) oder R5 (5%) bezeichnet)

FKS (hitzeinaktiviert) (10% /5%/2,5%)	(Bio Whittaker, Versiers, Belgien)
Natriumpyruvat-Lösung (1%)	(Sigma, Art.-Nr. S8636, 100 mM)
Streptomycin/Penicillin G (1%)	(PAA, Cölbe. Art.-Nr. P11-010. 100x konzentriert)
RPMI 1640	(Invitrogen, Paisley, UK. Art.-Nr. 51800-043)

PBS (Phosphate Buffered Saline) pH 7,2

Natriumchlorid (137,0 mM)	(Merck, Darmstadt. Art.-Nr. 1.06404)
Kaliumchlorid (27,0 mM)	(Merck, Darmstadt. Art.-Nr. 1.04936)
Kaliumhydrogenphosphat (1,8 mM)	(Merck, Darmstadt. Art.-Nr. 1.02752)
Natriumhydrogenphosphat (8,0 mM)	(Roth, Karlsruhe. Art.-Nr. P 030.1)

Knochenmarksmakrophagen (BMM Φ)

Zur Gewinnung von Knochenmarksmakrophagen wurden genetisch gleiche, immunkompetente Tiere des Mausinzuchtstammes C57BL/6 herangezogen. Die Tiere waren zwischen 6 und 12 Wochen alt und wurden von der Zentralen Versuchstierzucht des Bundesinstituts für Risikobewertung bezogen und in der offenen Käfighaltung bis zum Versuchsbeginn gehalten.

Kultivierung der Knochenmarksmakrophagen

Die Mäuse wurden durch zervikale Dislokation getötet. Nach Fixierung auf einer Styroporplatte wurde das Tier weitgehend mit Ethanol desinfiziert und unter sterilen Verhältnissen die beiden *Os femoris* sowie *Tibien* möglichst unverletzt herauspräpariert. Nach Desinfektion der Knochen wurden die Gelenkköpfe abgetrennt und das Knochenmark mit kaltem, sterilen PBS unter Zuhilfenahme einer Kanüle und Einmalspritze aus den Röhrenknochen herausgespült. Nach dem Abzentrifugieren des PBS (4 °C, 250 x g, 10 min) wurden die Stammzellen eines Tieres in 180 ml Pluznik-Medium (Makrophagen-Differenzierungs-Medium) ([Pluznik und Sachs, 1965](#); [Kiderlern und Kaye, 1990](#)) aufgenommen. Jeweils 15 ml dieser Suspension wurden in eine Polystyrol-Petrischale gegeben und 7 Tage bei 37 °C, gesättigter Luftfeuchtigkeit und 5% CO₂ kultiviert. Anschließend wurde das Medium abgenommen (dient nach Sterilfiltration als BMM Φ -konditionierter Überstand für das Leishmanien-Wachstumsmedium) und durch R10-Medium ersetzt. Nach drei Tagen wurde dieses Medium verworfen und die ausdifferenzierte Zellkultur mit eiskaltem PBS überschichtet. Durch vorsichtiges Spülen konnten die Zellen leicht abgelöst werden. Nach erneutem Zentrifugieren wurde der Überstand verworfen und das Pellet in R10-Medium resuspendiert. Die Zellzahl wurde mittels Neubauer-Zählkammer bestimmt.

Leishmanien

Der Stamm *Leishmania major* GFP LT 52 CC-1pXG-GFP wurde freundlicherweise von Herrn Professor Beverley, Department of Molecular Microbiology, Washington University School of Medicine, St. Louis, MO, USA, zur Verfügung gestellt. Dieser Stamm ist mit einem Plasmid transfiziert und exprimiert konstitutiv das grün fluoreszierende Protein (GFP). Außerdem trägt das Plasmid ein Geneticin-Resistenzgen. Durch Zugabe von 25 mg/ml Geneticin zum Kulturmedium werden alle

Leishmanien abgetötet, die das Plasmid nicht mehr tragen, und somit auch keine grüne Fluoreszenz zeigen.

Kultivierung von *Leishmanien*

In flüssigem Stickstoff kryokonservierte *Leishmanien* wurden nach dem Auftauen bei 25 °C, gesättigter Luftfeuchtigkeit und 5% CO₂ im *Leishmanien*-Wachstumsmedium kultiviert. Einmal pro Woche wurde eine Kulturflasche mit *Leishmanien* beimpft und die alte Flasche nach Desinfektion mit Gevisol verworfen. Um eine etwaige Mutation des Erregers auszuschließen wurde alle zwei Monate ein neues Aliquot des Erregers für die Versuche aufgetaut. Für ein Experiment wurden aus der voll bewachsenen Kulturflasche *Leishmanien* entnommen, mit PBS gewaschen (Zentrifugieren bei 4 °C, 700 x g, 10 min) und wieder resuspendiert. Zur Bestimmung der Zellzahl wurden 50 µl dieser Suspension entnommen und mit 50 µl Formaldehydlösung (1% in PBS) versetzt (dadurch werden die begeißelten Erreger unbeweglich). Die Anzahl der Parasiten wurde anschließend in der Neubauer-Zählkammer bestimmt. Für einen Infektionsversuch wurden *Leishmanien* aus der post-logarithmischen Wachstumsphase verwendet ([Saraiva et al., 2005](#)).

Infektion von Knochenmarksmakrophagen mit *Leishmanien*

Der gesamte Versuch wurde in 24-Well Platten mit UpCell™-Beschichtung durchgeführt. Die besondere Oberfläche dieser Mikrotiter-Platten erlaubt das problemlose Waschen des Zellmonolayers und garantiert die Entfernung aller promastigoten *Leishmanien*. Durch Änderung der Temperatur von 37 °C auf 20 °C, wird die ehemals hydrophobe Oberfläche der Platten hydrophil, was die Adhäsion der Zellen vermindert. Die normalerweise stark adhärennten Makrophagen können bereits durch leichtes Spülen abgelöst und nachfolgenden Untersuchungen zugeführt werden.

Die ausdifferenzierten Makrophagen wurden wie oben beschrieben geerntet, in R10-Medium aufgenommen und die Zellzahl von 10⁶/ml eingestellt. Pro Well wurde 1 ml dieser Zellsuspension ausplattiert. Anschließend wurden pro Well 8x10⁶ *Leishmanien* in 1 ml R10-Medium hinzugefügt und die Platte bei 37 °C für 24 h inkubiert. (Makrophage/Parasit Verhältnis 1:8). In dieser Zeit werden die promastigoten *Leishmanien* phagozytiert und transformieren im Inneren der Makrophagen in den amastigoten Zustand. Anschließend wurde das Medium mit den nicht phagozytierten

Promastigoten abgesaugt, der Monolayer mit 1 ml warmen R2,5-Medium gewaschen, 1 ml frisches R2,5-Medium mit jeweils 30 µg/ml Testsubstanz zugegeben und die Platte für weitere 48 h bei 37 °C inkubiert. Danach wurden die Überstände entnommen und in Eppendorftubes bei -20 °C bis zur weiteren Verwendung eingefroren.

Durchflusszytometrische Bestimmung der Infektionsrate in Knochenmarksmakrophagen

Die nach der Entfernung der Überstände verbliebenen Zellmonolayer wurden sofort mit 1 ml kaltem PBS überschichtet. Nach 15 min bei 4 °C wurden die Zellen in FACS-Röhrchen überführt und durchflusszytometrisch untersucht. Zur Diskriminierung von lebenden und toten Zellen wurden drei min. vor der Messung 200 µl einer Propidiumiodidlösung (1µg/ml in PBS) zugegeben. Propidiumiodid (PI) ist, ähnlich wie das Ethidiumhomodimer (Kap. 3.5.1), nur in der Lage bereits geschädigte Zellmembranen (bei toten bzw. stark geschädigten Zellen) durchzudringen und die DNA intensiv rot zu färben. Daher sind alle PI-positiven Zellen als tot anzusehen.

Zur Messung der Infektionsrate bzw. der PI-positiven Zellen wurde das Durchflusszytometer FACS Calibur verwendet. Die „grüne“ Fluoreszenzemission (FL-1: 515-545 nm; GFP) und die „rote“ Fluoreszenzemission (FL-3: > 670 nm; PI) wurden durch die Anregung mit dem 488 nm Laser erzeugt. Die Auswertung erfolgte mit der Software CellQuestPro[®] (Becton Dickinson).

Auswertung

Da auf Grund der teilweise farbigen Extrakte eine unterschiedlich stark ausgeprägte Verschiebung der gesamten Zellpopulation in den roten Messbereich erfolgte, wurde für jeden Extrakt zunächst eine nicht infizierte, jedoch mit Extrakt behandelte Makrophagenprobe durchflusszytometrisch vermessen. Die dabei gesetzten Gates wurden auch auf die infizierte und mit demselben Extrakt behandelte Probe angewendet, um eine korrekte Platzierung der Gates zu gewährleisten. Zunächst wurden die Proben im Forward (FSC) und Side Scatter (SSC) betrachtet und durch das Setzen von einem Gate Zelltrümmer aus der Auswertung herausgefiltert (Abbildung 13A). Die grünen (FL 1) und roten (FL 3) Fluoreszenzsignale der gewählten Zellpopulation wurden in einer zweidimensionalen Dot-Plot-Abbildung gegeneinander aufgetragen. Makrophagen, die weder rot noch grün fluoreszieren, erscheinen dann entlang einer Diagonale von links unten nach rechts oben. GFP-positive Makrophagen haben eine verstärkte grüne Fluoreszenz und erscheinen dementsprechend im unteren Dreieck der Abbildung (Abbildung 13C). Tote, rot gefärbte Zellen sind dagegen oberhalb der ungefärbten Makrophagen sichtbar (Abbildung 13B und 10C).

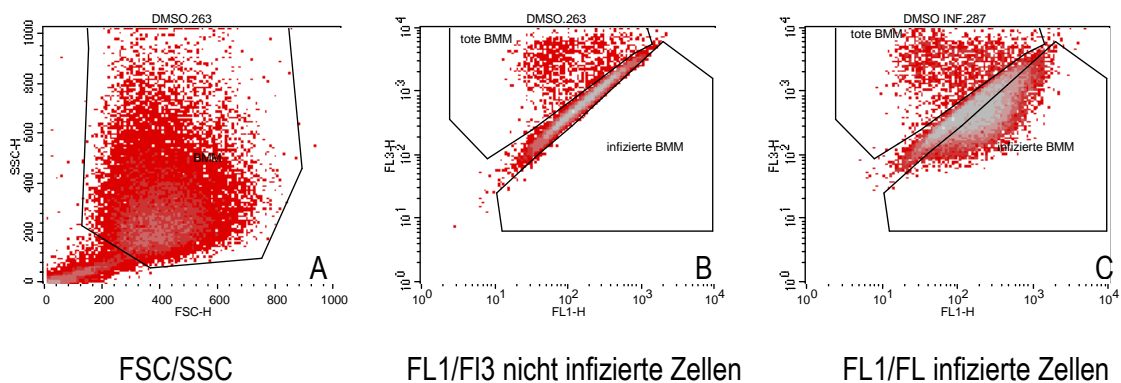


Abbildung 13: Auswertung der FACS-Daten im Leishmanienassay

Der Anteil an infizierten Makrophagen in der unbehandelten Kontrolle wurde als 100%ige Infektionsrate definiert und die verbleibenden infizierten Makrophagen nach Behandlung mit den Proben als relativer prozentualer Anteil dieser Kontrolle berechnet.

3.5.4. Quantitative Bestimmung der Zytokine IL-12 und TNF- α

Verwendete Materialien

Nunc-Immuno™ Plates	(Thermo, Langenselbold. Art.-Nr. 475094)
Ready-SET-Go! ELISA KIT	
Für murines TNF- α	(eBioscience, Frankfurt. Art.-Nr. 88-7324-88)
Für murines IL-12 p70	(eBioscience, Frankfurt. Art.-Nr. 88-7121-88)
Waschpuffer	
0,05% TWEEN-20	(Roche, Mannheim. Art.-Nr. 11332465001)
In PBS gelöst	(s. Kap. 3.5.3.)
Stopp- Lösung	
2N H ₂ SO ₄	(Roth, Karlsruhe. Art.-Nr. X873.1)

Durchführung

Um die Menge an sezernierten Zytokinen zu quantifizieren, wurden kommerziell erhältliche mehrschichtige (Sandwich) ELISA-Kits Ready-SET-Go! verwendet. Zur Messung gelangten die eingefrorenen Überstände (Kap. 3.5.3). Die Durchführung erfolgte in NUNC Maxisorp flat-bottom 96-Well Platten, welche eine besonders hohe Affinität zu Proteinen haben. Dies gewährleistet eine hohe Bindung des Antikörpers an den Plattenboden. Zunächst wurde über Nacht der erste, in PBS gelöste Antikörper (Capture-Antikörper) bei 4 °C auf der Oberfläche der 96-Well Mikrotiterplatte immobilisiert. Dazu wurden 100 μ l der Lösung pro Vertiefung eingebracht und die Platte mit einer Folie luftdicht verschlossen. Im Überschuss vorhandener und nicht gebundener Antikörper wurde durch fünfmaliges Waschen mit Waschpuffer (300 μ l/Well) entfernt und die Platte vorsichtig auf Papiertüchern ausgedrückt (Abbildung 14A). Um unerwünschtes Adhären von Proteinen (z.B. aus den Testlösungen) an den frei gebliebenen Flächen in den Wells zu verhindern, wurde der Plattenboden mit 200 μ l Blockierungspuffer (10% FKS in PBS) pro Well abgesättigt, die Platte 2 h bei Raumtemperatur inkubiert und anschließend fünf weiteren Waschrufen unterzogen. In die so präparierten Platten wurden jeweils 100 μ l der Zellkulturüberstände pipettiert. Außerdem wurde eine geometrische Verdünnung des zu bestimmenden Proteins (IL-12 bzw. TNF- α) parallel aufgetragen. Die Inkubation erfolgte über Nacht bei 4 °C. Das in den Testlösungen zu bestimmende Protein wurde dabei an den immobilisierten Capture-Antikörper gebunden. (Abbildung 14B). Nach fünfmaligem Waschen wurden 100 μ l des biotinylierten Detektion-Antikörpers in PBS pro Well zugegeben und 1 h bei Raumtemperatur inkubiert. Dieser Antikörper bindet an andere Epitope des zu bestimmenden Proteins, was die Selektivität des Assays erhöht (Abbildung 14C).

Nach fünf Waschschritten wurden 100 µl einer Streptavidin-gekoppelten Peroxidase Lösung zugegeben. Auf Grund der hohen Affinität von Streptavidin zu Biotin bindet es an den Komplex aus Capture-Antikörper, Protein und Detektion-Antikörper (Abbildung 14D). Nach 30 min. Inkubation wurde die Platte siebenmal gewaschen, um die vollständige Entfernung des überschüssigen Enzyms sicher zu stellen. Abschließend wurde die Substratlösung (50 µl/Well) zugegeben. Als Substrat wurde 3,3',5,5'-Tetramethylbenzidin (TMB) verwendet. Die Farbreaktion wurde nach ca. 15 min. durch Zugabe von 50 µl/Well einer 2N H₂SO₄-Lösung gestoppt, wodurch die blaue Farbe nach gelb umschlug. Der Reaktionsverlauf wurde optisch an den standardproteinhaltigen Wells überwacht. (Abbildung 14E). Die Messung erfolgte mit Hilfe eines ELISA-Readers bei einer Wellenlänge von 450 nm.

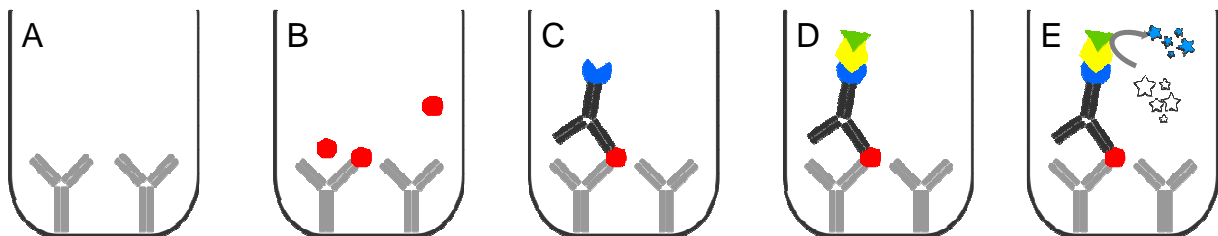


Abbildung 14: ELISA-Durchführung

Auswertung

Die Mittelwerte der Absorption der Standardlösungen wurden gegen die Konzentration aufgetragen und die Gleichung der potentiellen Regressionsgeraden bestimmt. Nach Auflösung der Gleichung nach x, wurde die IL-12 bzw. TNF-α Konzentration für jeden Überstand errechnet.

Kurvengleichung

$$y = a \cdot x^b$$

Aufgelöst nach x

$$x = (y/a)^{(1/b)}$$

y = gemessene Absorption; a = Steigung; x = Konzentration;

3.5.5. Virusschutzassay

Verwendete Materialien

Mikrotiter-Platten für die Zellkultur	(TPP, Schweiz. Art.-Nr. 92696)
Trypsin/EDTA	(Gibco, Piasley, Art.-Nr. 35400-027)
Färbelösung	
A: 1 g Kristallviolett	(Merck Darmstadt, Art.-Nr. 101408)
20 ml Ethanol 99,5%	(Roth, Karlsruhe. Art.-Nr. 5054.3)
auf 100 ml mit PBS auffüllen	
B: 10 ml Formaldehyd 37%	(Roth, Karlsruhe. Art.-Nr. P733.2)
auf 100 ml mit PBS auffüllen	
Unmittelbar vor der Färbung 1 Teil A mit 9 Teilen B mischen.	
Entfärbelösung	
82,5 ml Essigsäure 100%	(Roth, Karlsruhe. Art.-Nr. 3737.4)
auf 250 ml mit dd Wasser auffüllen.	
Medium und PBS	(Kap. 3.5.3)

Encephalomyocarditis-Virus (EMCV)

Das murine Encephalomyocarditis-Virus (batch #900405) ist ein 35 nm kleines, einzelsträngiges RNA-Virus (Picornaviridae, Cardioviridae). Der Virustiter des verwendeten Stocks ist mit $3,68 \times 10^7$ PFU/ml austitriert worden.

L929 Fibroblasten (IFN)

Für den Versuch wurde eine IFN-sensitive Maus-Fibroblasten Zelllinie verwendet. Diese ist auf die IFN-Sensitivität subkloniert worden. Die Zelllinie wurde von Dr. M. L. Lohmann-Matthes, Fraunhofer-Institut f. Toxikologie, Hannover, 1990 zur Verfügung gestellt. Die Zellen wurden in Zellkulturflaschen in RPMI 1640 mit 5% FCS kultiviert. Um die Fibroblasten vom Flaschenboden zu lösen, wurde das Medium verworfen und der Monolayer mit 37 °C warmen PBS gewaschen. Nach Überschichtung mit Trypsin-EDTA und kurzer Inkubation bei 37 °C lösten sich die Zellen leicht vom Flaschenboden. Nach Zugabe von 5 ml R5 wurde die Suspension in ein Zentrifugenröhrchen überführt und einmal mit PBS gewaschen.

Durchführung

Tag 1: Ausstreuen der L929

Die Fibroblasten wurden wie oben beschrieben geerntet, die toten Zellen mittels Trypanblau bestimmt und eine Zellsuspension mit 1×10^5 Zellen/ml hergestellt. Davon wurden 100 µl/Well in eine 96-Well Platte ausgestreut (entspricht 1×10^4 Zellen/Well). Verwendet wurden nur die inneren 60 Wells. Die äußeren Vertiefungen wurden mit

Wasser oder PBS aufgefüllt. Nach Inkubation über Nacht bei 37 °C, 5% CO₂ bildeten die Zellen einen konfluenten Monolayer.

Tag 2: Behandlung der L929

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	
													A
		R5	IFN 100 U/ml	IFN 50 U/ml	IFN 25 U/ml	IFN 12,5 U/ml	IFN 6,25 U/ml	IFN 3,13 U/ml	IFN 1,56 U/ml	IFN 0,78 U/ml	R5		B
		R5	IFN 100 U/ml	IFN 50 U/ml	IFN 25 U/ml	IFN 12,5 U/ml	IFN 6,25 U/ml	IFN 3,13 U/ml	IFN 1,56 U/ml	IFN 0,78 U/ml	R5		C
		LSM- kontr.	Probe 1/1	Probe 1/2	Probe 1/4	Probe 1/8	Probe 1/16	Probe 1/32	Probe 1/64	Probe 1/128	LSM- kontr.		D
		LSM- kontr.	Probe 1/1	Probe 1/2	Probe 1/4	Probe 1/8	Probe 1/16	Probe 1/32	Probe 1/64	Probe 1/128	LSM- kontr.		E
		LSM- kontr.	Probe 1/1	Probe 1/2	Probe 1/4	Probe 1/8	Probe 1/16	Probe 1/32	Probe 1/64	Probe 1/128	LSM- kontr.		F
		LSM- kontr.	Probe 1/1	Probe 1/2	Probe 1/4	Probe 1/8	Probe 1/16	Probe 1/32	Probe 1/64	Probe 1/128	LSM- kontr.		G
													H

Abbildung 15: Pipettierschema für Virusschutzassay
 Orangener Bereich: keine Infektion (2 B-G). Blauer Bereich: Infektion mit EMCV (3-11 B-G)

Die Platte wurde analog des Pipettierschemas (Abbildung 15) bestückt. Pro 96-Wellplatte konnten so zwei Zellkulturüberstände ausgetestet werden. Zunächst wurden serielle Verdünnungen des IFN- γ -Standards und der Proben (Zellkulturüberstände) in Eppendorftubes angesetzt. Jede Verdünnung wurde als Dublette aufgetragen. Dazu wurde das alte Medium mittels Kanüle abgesaugt und die Kavität sofort mit der entsprechenden Lösung wieder gefüllt. Die Inhalte der Kavitäten 2 B-C und 11 B-C wurden durch frisches Medium ersetzt. Die Kavitäten 2 D-G und 11 D-G wurden mit entsprechenden Lösungsmittelkontrollen gefüllt. Die Inkubation erfolgte über 20 h.

Tag 3: Infektion der L929

Die Inkubationslösungen wurden durch steriles Abflicken verworfen und die Platte über einem Papiertuch trocken getupft. Anschließend wurden sofort (Zellen trocknen schnell aus!) 100 µl der Virussuspension (3680 PVU /ml in R2,5) in die Reihen 3-11 eingetragen (blauer Bereich). In die Reihe 2 (orangener Bereich) wurden 100 µl/Well R2,5 gegeben (keine Infektion!). Während der folgenden Inkubation werden die Fibroblasten vom EMCV infiziert und abgetötet, dadurch wird der Zellrasen lokal zerstört und es entstehen runde, zellfreie Bereiche.

Tag 4: Fixierung und Färbung

Das Infektionsmedium wurde in eine Desinfektionslösung abgeflickt und die Platten mit 200 µl/Well PBS gewaschen und möglichst die ganze Flüssigkeit mittels Abtupfen entfernt. Die Menge der verbleibenden (vitalen) Fibroblasten wurde mittels Kristallviolett färbung bestimmt. Hierzu wurden 50 µl/Well Färbelösung für 30 min. bei Raumtemperatur einpipettiert, die Platten anschließend viermal vorsichtig mit Leitungswasser gewaschen und vollständig getrocknet. Das in den Zellen verbliebene Kristallviolett wurde mit 200 µl/Well Entfärbelösung wieder in Lösung gebracht. Jeweils 100 µl Überstand wurden auf eine neue 96-Well-Platte übertragen und mit weiteren 100 µl Wasser verdünnt. Die Konzentration an Kristallviolett wurde im ELISA-Reader bei 650 nm bestimmt.

Auswertung

Die gemittelte Absorption jeder Probe wurde gegen den Verdünnungsfaktor aufgetragen und mit Hilfe der Kurven graphisch die Verdünnung ermittelt, bei der 50% der Zellen vital waren. Der Verdünnungsfaktor der getesteten Probe wurde in Relation zum Verdünnungsfaktor des IFN- γ -Standards gesetzt und so die durch den Extrakt induzierte Menge (in U/ml) an IFN- γ berechnet, bei der 50% der Zellen vor einer Infektion geschützt werden.

3.5.6. Bestimmung des NO-Radikalfängerpotentials

Verwendete Materialien

96-Well Platten mit F-Profil	(Roth, Karlsruhe. Art.-Nr. 9293.1)
Nitroprussidnatrium-Dihydrat (SNP)	(Sigma-Aldrich, Steinheim. Art.-Nr. 71778)
Phosphate Buffered Saline (PBS Puffer, pH 7,4)	(Sigma-Aldrich, Steinheim. Art.-Nr. P-5368)
Griess-Reagenz	(Kap. 3.5.7)
UV-Lampe	(Ultra-Vitalux [®] E 27/ES, Osram)

Durchführung

Testsubstanzen Aus entsprechenden Stocklösungen (10 mg/ml) wurde eine geometrische Verdünnungsreihe über sieben Stufen hergestellt und jeweils 10 µl davon in die Vertiefungen einer 96-Well-Mikrotiterplatte einpipettiert. Reines Lösungsmittel (DMSO) wurde parallel mitgeführt.

SNP Zu den vorgelegten Testlösungen wurden jeweils 90 µl einer frisch bereiteten 0,55 mmol SNP-Lösung mit einer Mehrkanalpipette zugegeben. Die Endkonzentration an SNP/Well betrug 0,5 mmol. SNP-Lösung ohne Testsubstanz (nur Lösungsmittel) diente als Positivkontrolle.

UV-Bestrahlung Die Mikrotiterplatte wurde 7 min. unter einer UV-Lampe bestrahlt. Durch Markierungen wurde sichergestellt, dass die Platte immer dieselbe Position unter der UV-Lampe einnahm und somit stets eine gleichmäßige Bestrahlung gewährleistet war.

Griess-Assay Anschließend wurden zu jedem Well 100 µl frisch vorbereitetes Griess-Reagenz (Kap. 3.5.7) zugegeben und die Absorption nach 5 min. bei 540 nm vermessen. Der Wert der Positivkontrolle (SNP-Lösung) lag im Absorptionsbereich von ca. 0,6 – 0,8.

Negativkontrollen

Die Negativkontrollen wurden analog der oben beschriebenen Methode vermessen. Dabei wurde jedoch die SNP-Lösung durch PBS Puffer ersetzt, keine UV-Bestrahlung durchgeführt, und das Griess-Reagenz sofort zugegeben.

Auswertung

Es wurden stets Doppelbestimmungen durchgeführt. Die Werte wurden gemittelt und die Negativkontrolle davon abgezogen. Insgesamt wurden für jede Testsubstanz mindestens 3 unabhängige Experimente durchgeführt.

$$\text{Nitrit-Gehalt [\%]} = \frac{\text{Absorptionsmittelwert der Analyse} \times 100}{\text{Absorption der Positivkontrolle}}$$

Die prozentuale NO-Bildung, gemessen als Nitrit, wurde gegen die Konzentration aufgetragen und eine logarithmische Gleichung ermittelt. Diese wurde nach x aufgelöst, für y 50% eingesetzt und der IC₅₀-Wert berechnet.

Kurvengleichung

$$y = -a \ln(x) + b$$

Aufgelöst nach x

$$x = e^{(y-b)/-a}$$

y = gemessene Absorption; a= Steigung ;

b = y-Achsenabschnitt; x = Nitritkonzentration

3.5.7. Griess-Assay

Zur Quantifizierung des instabilen Nitrosylradikals wird die Konzentration des daraus entstehenden Nitrits in den Überständen bestimmt.

Verwendete Materialien

96-Well Platten mit F-Profil	(Roth, Karlsruhe. Art.-Nr. 9293.1)
Griess-Reagenz A	
0,1% N-(1-Naphtyl)ethylendiamin dihydrochlorid in H ₂ O	(Sigma, Steinheim. Art.-Nr. N9125)
Griess-Reagenz B	
1% Sulfanilamid	(Sigma, Steinheim. Art.-Nr. S9251)
in 5%-iger Phosphorsäure	(Roth, Karlsruhe. Art.-Nr. 6366.1)
Natriumnitrit	(Roth, Karlsruhe. Art.-Nr. 8604)

Durchführung

Jeweils 100 µl der Probelösungen (Kap. 3.5.6. und 3.5.3.) wurden in eine 96-Well-Mikrotiterplatte überführt. Das Griess-Reagenz, bestehend aus Lösung A und Lösung B, wurde unmittelbar vor der Messung durch Mischen dieser Lösungen im Verhältnis 1:1 hergestellt und jeweils 100 µl davon zu den vorgelegten Proben pipettiert. Nach 10 min. wurde die Platte im ELISA-Reader bei 540 nm vermessen. Parallel wurde eine Verdünnungsreihe (0 – 100 µM) aus einer 10 mM NaNO₂⁻ Stammlösung im entsprechenden Medium mitgeführt. Medium allein diente zur Ermittlung des Leerwertes.

Auswertung

Mit Hilfe der Messwerte für die NO₂⁻ Verdünnungen wurde eine Kalibriergerade erstellt. Nach Auflösen der linearen Gleichung nach x berechnen sich die Nitritkonzentrationen für die Testlösungen wie folgt:

Kurvengleichung

$$y = a x + b$$

$$y = \text{gemessene Absorption}; a = \text{Steigung};$$

$$b = y\text{-Achsenabschnitt}; x = \text{Nitritkonzentration } [\mu\text{M}]$$

Aufgelöst nach x

$$x = (y - b) / a$$

4. Ergebnisse

Phytochemische Untersuchungen

4.1. Auftrennung von EPs[®] 7630

4.1.1. Fraktionierung in einen methanollöslichen und in einen methanolunlöslichen Extraktanteil

Der Spezialextrakt EPs[®] 7630 wurde, wie unter Kap. 3.3.5 beschrieben, fraktioniert. Die Auftrennung ist vereinfacht in Abbildung 16 dargestellt. Die methanollösliche Phase (MSP) lieferte nach dem Abziehen des Lösungsmittels am Rotationsverdampfer bei höchstens 40 °C einen glasartigen dunklen Rückstand, während die methanolunlösliche Phase (MIP) ein feines, schokoladenbraunes Pulver ergab. Die Ausbeute von MSP betrug 55% und von MIP 43% der eingesetzten Extraktmenge.

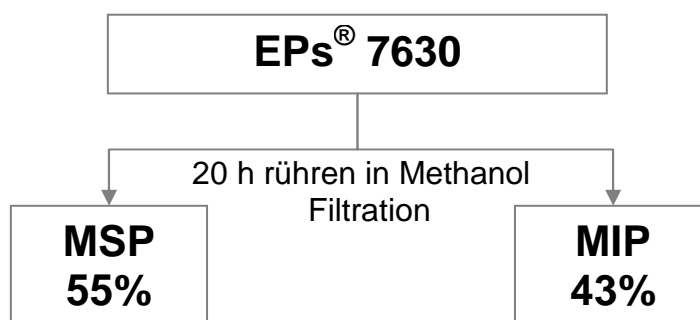


Abbildung 16: Fraktionierung von EPs[®] 7630

4.1.2. Herstellung von polyphenolfreien Fraktionen

Jeweils 2,5 g des Gesamtextrakts sowie der methanollöslichen und methanolunlöslichen Phase wurden einer Behandlung mit Hautpulver entsprechend der Vorschrift in der [Ph. Eur. 6.0 \(2008\)](#) unterzogen. Polyphenole binden bekanntlich an Proteine ([Haslam, 1996](#)) und wurden so aus den Reaktionsansätzen entfernt. Im Folgenden werden die polyphenolfreien Extrakte mit dem Suffix „HP“ für Hautpulverbehandelt gekennzeichnet. Die Ausbeuten sind in Tabelle 7 dargestellt.

Tabelle 7: Ausbeute polyphenolfreier Fraktionen nach Hautpulverbehandlung

Ausgangsmenge 2,5 g	EPs [®] 7630 HP	MIP HP	MSP HP
Ausbeute [mg]	670	520	620
Ausbeute [%]	26,8	20,8	24,8

Der Fortschritt dieser Behandlung wurde dünnschichtchromatographisch verfolgt. Hierzu wurden alle 10 min. Proben entnommen, an Kieselgel mit dem Laufmittel L1 aufgetrennt und die Polyphenole mittels Vanillin/HCl detektiert (Abbildung 17). Über eine Zeitspanne von 1 h wurde eine deutliche Abnahme in der Farbintensität der rosaroten Banden für alle mit Hautpulver behandelten Extrakte beobachtet.

Der unbehandelte Spezialextrakt EPs[®] 7630 zeigte drei Hauptbanden mit den R_f-Werten 0,88 (Epicatechin/Catechin), 0,67 (Epigallocatechin/Gallocatechin) und 0,36 (dimere Flavan-3-ole) sowie eine intensiv gefärbte Bande und einige diffuse Flecken im Bereich der Startzone (hochmolekulare Proanthocyanidine). Nach Hautpulverbehandlung waren nach Besprühen mit Vanillin/HCl keine Flecke im unteren R_f-Bereich detektierbar. Auch die Bande mit dem R_f-Wert 0,36 war nicht mehr nachweisbar, lediglich in der Farbintensität geminderte Flecken für monomere Flavan-3-ole waren detektierbar. MIP zeigte lediglich eine dunkle Bande an der Startlinie, welche entsprechend ihrem Laufverhalten als hochmolekulare Gerbstoffe anzusehen waren. Ähnlich wie bei EPs[®] 7630, war diese nach Hautpulverbehandlung nicht mehr detektierbar. Die methanollösliche Phase (MSP) zeigte ein ähnliches Verteilungsmuster an Vanillin/HCl-positiven Banden wie EPs[®] 7630. Außerdem waren mehrere intensiv fluoreszierende Banden erkennbar. Durch Co-Chromatographie konnten Umckalin (R_f-Wert 0,92) und Scopoletin (R_f-Wert 0,78) identifiziert werden. Nach Hautpulverbehandlung waren die weniger mobilen Substanzen im Bereich der Startzone größtenteils verschwunden. Dagegen waren die Flavan-3-ole, wie schon bei EPs[®] 7630-HP, nicht vollständig entfernt. Durch die „Aufkonzentrierung“ erschienen diese Farbzonen intensiver als in der unbehandelten Probe. Die unvollständige Entfernung niedermolekularer Flavan-3-ole korreliert mit Unterschieden in der Affinität zu Proteinen. Auf Grund ähnlicher Beobachtungen sprachen [Roux et al. \(1975\)](#) Proanthocyanidinen ab einem Polymerisationsgrad von drei erst Gerbstoffcharakter zu.

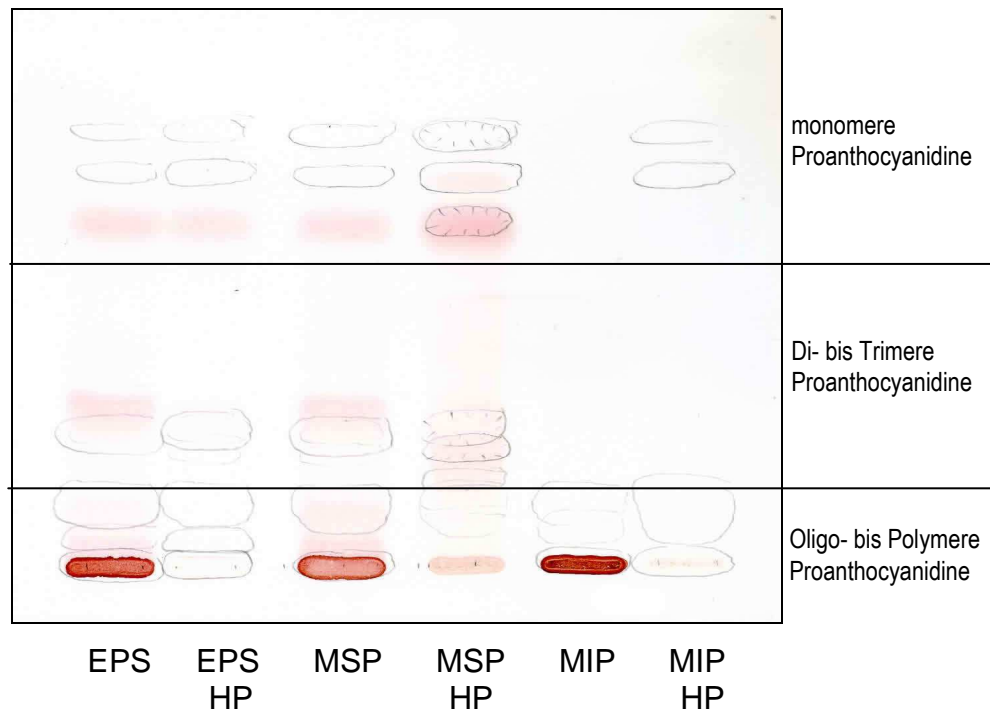


Abbildung 17: Dünnschichtchromatographische Untersuchung der Fraktionen ohne und mit Hautpulverbehandlung

Die Extrakte wurden in Ethanol (20%) gelöst, jeweils 30 μ l auf eine Kieselgelplatte aufgetragen und mit dem Fließmittel F1 entwickelt. Die trockene Platte wurde zunächst unter UV-Licht betrachtet (fluoreszierende Banden wurden mit einem Bleistift umrahmt; Fluoreszenzlöschungen mit Strichen innerhalb der Markierung gekennzeichnet). Anschließend wurde die Platte mit Vanillin/HCl besprüht.

4.2. Massenspektroskopische Untersuchung der Extrakte

Die dünnschichtchromatographischen Ergebnisse wurden mit Hilfe der Massenspektroskopie weiter abgesichert. Dazu wurden die Extrakte direkt in ein ESI-TOF Massenspektrometer eingespritzt und im negativen wie positiven Modus vermessen (Abbildung 18). Die Massenspektren zeigten deutlich, dass nach Hautpulverbehandlung die Molpeaks von Proanthocyanidinen ab einer Kettenlänge von zwei (bzw. 3 bei MSP) Flavan-3ol Bausteinen nicht mehr registriert wurden. Den Massenzahlen (nachgewiesen wurden jeweils die Kaliumaddukte der Polyphenole) konnte zudem entnommen werden, dass die in EPs[®] 7630 enthaltenen Proanthocyanidine überwiegend aus (Epi-)Gallocatechineinheiten aufgebaut sind.

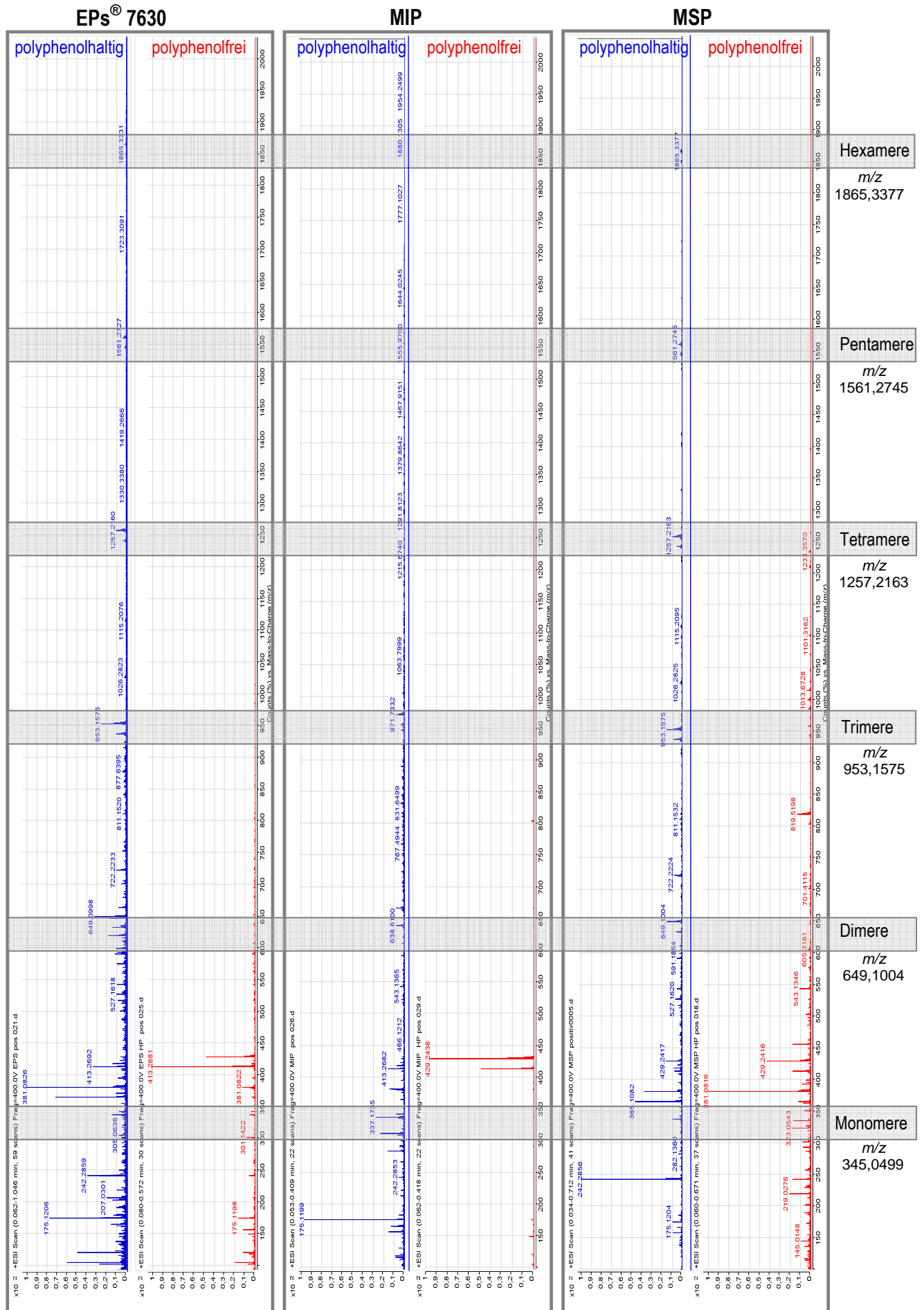


Abbildung 18: MS-Untersuchung der EPs® 7630-Fractionen im positiven Modus

4.3. Charakterisierung von Proanthocyanidinen

Die Bildung rot gefärbter Produkte aus farblosen in Pflanzen vorkommenden Substanzen ist schon lange bekannt ([Bate-Smith und Metcalfe, 1957](#); [Bate-Smith und Lener, 1954](#)). Gemäß der heute gebräuchlichen Nomenklatur werden nach einem Vorschlag von [Weinges et al. \(1969\)](#) ausschließlich die monomeren Flavan-3,4-diole als ‚Leukoanthocyanidine‘ bezeichnet, während sich für oligomere Flavan-3-ole, welche beim Erhitzen mit Mineralsäuren Anthocyanidine ergeben, der Begriff ‚Proanthocyanidine‘ durchgesetzt hat. Eine Unterteilung der komplexen Stoffgruppe beruht auf der differierenden Anzahl und Stellung der Hydroxylgruppen an den Flavan-3-ol Grundbausteinen. Entsprechend den unterschiedlichen Hydroxylierungsmustern entstehen nach Säurespaltung diverse Anthocyanidine, die für die Namensgebung der Proanthocyanidine Pate stehen.

Untersuchung der durch Säurehydrolyse gebildeten Anthocyanidine

Als Methode der Wahl kommen chemische Spaltungsreaktionen in Betracht, welche die säurelabilen Eigenschaften der C-C Interflavanoidbindung ausnutzen. Wie erwähnt, werden Proanthocyanidine beim Erhitzen mit verdünnten Mineralsäuren in Anthocyanidine umgewandelt. Mit Hilfe dieses Reaktionsverhaltens sollte in einem ersten Schritt die Frage geklärt werden, welche Anthocyanidine gebildet werden, um so einen Einblick in die Proanthocyanidinzusammensetzung des Extraktes zu erhalten.

Hierzu wurde EPs[®] 7630 unter Rückfluss mit ethanolischer Salzsäure erhitzt und die intensiv rot gefärbte Lösung mehrmals mit Isopropanol ausgeschüttelt. Dieser Schritt diente der Abtrennung von hochmolekularen rotbraunen Nebenprodukten. Die vereinigten organischen Phasen wurden eingeengt und aus der so erhaltenen konzentrierten Lösung die Anthocyanidine durch Zugabe von Petrolether ausgefällt. Eine dünnschichtchromatographische Überprüfung an Celluloseplatten im Fließmittelsystem F3 zeigte neben braunen Begleitstoffen im Bereich der Startzone zwei deutliche rötliche Banden, dessen Laufverhalten auf Delphinidin bzw. Cyanidin hindeuteten.

Durch säulenchromatographische Aufreinigung an Sephadex LH 20 konnten die Anthocyanidine als Reinsubstanzen gewonnen und zur näheren Charakterisierung einer massenspektroskopischen Untersuchung zugeführt werden. Auf Grund der hochaufgelösten Masse wurden die gebildeten Anthocyanidine eindeutig als

Cyanidin (m/z 287,0721; berechnet 287,0552 für $C_{15}H_{11}O_6$) und Delphinidin (m/z 303,0504; berechnet 303,0501 für $C_{15}H_{11}O_7$) identifiziert. Aus dem Massenspektrum des erhaltenen Anthocyanidingemisches konnte auf ein Verhältnis von Delphinidin : Cyanidin von ca. 5:1 geschlossen werden.

Nach den vorliegenden Ergebnissen liegt im Spezialextrakt EPs[®] 7630 ein Proanthocyanidingemisch aus Prodelphinidinen als dominierende Bestandteile und Anteilen von Procyanidinen vor.

4.4. Charakterisierung von Einzelverbindungen

4.4.1. Strukturaufklärung von Cumarinen

Eine dc Überprüfung des Spezialextraktes EPs[®] 7630 sowie der Methanol-löslichen (MSP) wie –unlöslichen Fraktion (MIP) zeigte im oberen R_f -Bereich verschiedene fluoreszierende Substanzzonen im UV-Licht bei 365 nm in Einklang mit dem beschriebenen Vorkommen von hochoxygenierten Cumarinen ([Kayser und Kolodziej, 1995](#)). Da diese Verbindungen relativ gut untersucht sind und das Auffinden von neuen Derivaten günstigstenfalls aus der analytischen Bearbeitung von Nebenverbindungen zu erwarten war, wurde in Anbetracht des zeitlichen Aufwandes und der Ungewissheit neuer Erkenntnisse die Bearbeitung der fluoreszierenden Zonen auf die Isolierung und Charakterisierung weniger Cumarine begrenzt. Dabei spielt Umckalin als chemotaxonomischer Marker für die botanische Herkunft des Extraktes aus *P. sidoides* eine große Bedeutung ([Kolodziej, 2007](#)).

Umckalin

Die mittels Säulenchromatographie isolierte Verbindung wies eine intensive rötliche Fluoreszenz bei einem R_f -Wert von 0,92 im o. g. Fließmittelsystem auf. Das EI-MS-Spektrum der Substanz zeigte einen Molpeak $[M]^+$ bei m/z 222 in Einklang mit einer Struktur für ein Monohydroxydimethoxycumarin und einen Basispeak bei m/z 207 $[M - CH_3]^+$ durch Eliminierung einer Methylgruppe. Ein weiteres charakteristisches Bruchstück wurde bei m/z 193 detektiert, welches auf eine Abspaltung eines zweiten Methylrestes verweist. Das Massenfragment m/z 179 kennzeichnet die Eliminierung von CO aus dem Bruchstück m/z 207.

Das ¹H-NMR-Spektrum zeigte die typischen Resonanzen für ein CumarinGrundgerüst mit den Dubletts bei δ 6,1 und δ 8,0 und einer Kopplungskonstante von 9,6 Hz für die olefinischen Protonen an C-3 und C-4 (Abbildung 19). Ein Ein-Protonen-Singulett bei

δ 6,5 in Verbindung mit zwei intensiven Methoxysignalen bei 4,0 und 3,8 ppm unterstrichen das Vorliegen eines trioxygenierten Derivates.

Das dünn-schichtchromatographische Verhalten, die übereinstimmenden spektroskopischen Daten mit früheren Ergebnissen im Arbeitskreis ([Kayser und Kolodziej, 1995](#); [Goedecke, Dissertation 2005](#)) und der Vergleich mit einer authentischen Referenzsubstanz identifizierten das Isolat eindeutig als Umckalin. Der Nachweis dieses bis heute einzigartigen Cumarins im untersuchten Extrakt war mit *P. sidoides* als pflanzliche Ausgangsquelle zu vereinbaren.

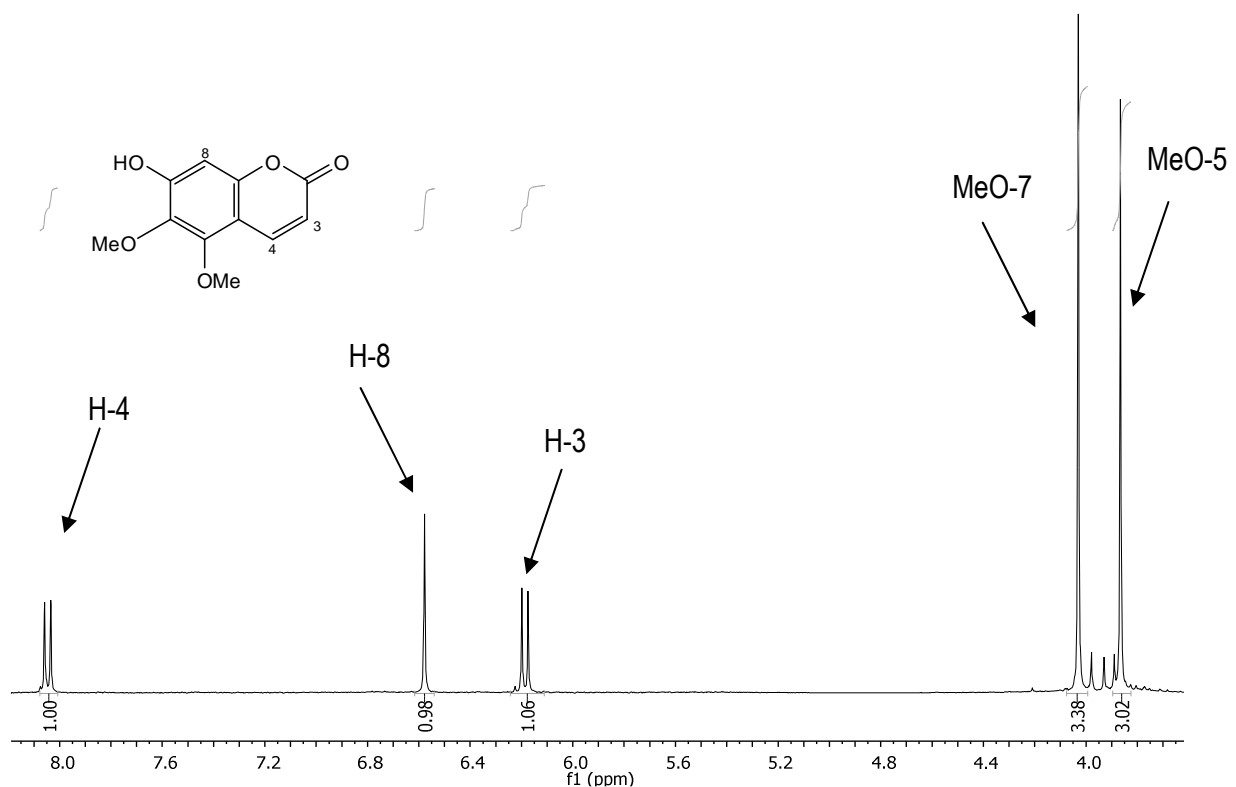


Abbildung 19: $^1\text{H-NMR}$ Spektrum von Umckalin

6,8-Dihydroxy-5,7-dimethoxycumarin

Das Molekulargewicht der Substanz betrug nach massenspektroskopischer Untersuchung $[\text{M}]^+$ 238 (berechnet: 238,0474), was der Summenformel $\text{C}_{11}\text{H}_{10}\text{O}_6$ entspricht und für ein Cumarin mit je zwei Hydroxy- und zwei Methoxygruppen spricht. Das Fragmentierungsmuster unterstreicht diese These.

Das $^1\text{H-NMR}$ zeigt ein tetrasubstituiertes Cumaringerüst mit den beiden Protonendoubletten für H-3 und H-4 bei δ 6,21 bzw. δ 8,04 (Abbildung 20). Die Kopplungskonstante von jeweils $J = 9,7$ Hz weist auf eine *cis*-Konfiguration der olefinischen Protonen hin. Die beiden Singulettsignale bei 3,89 und 3,99 für jeweils 3 Protonen stammen von zwei aromatischen Methoxygruppen. Die genaue Anordnung

der Substituenten am B-Ring ist allein aus dem $^1\text{H-NMR}$ -Spektrum nicht bestimmbar, konnte jedoch durch Vergleichsmessungen mit einer authentischen Referenzsubstanz ermittelt werden.

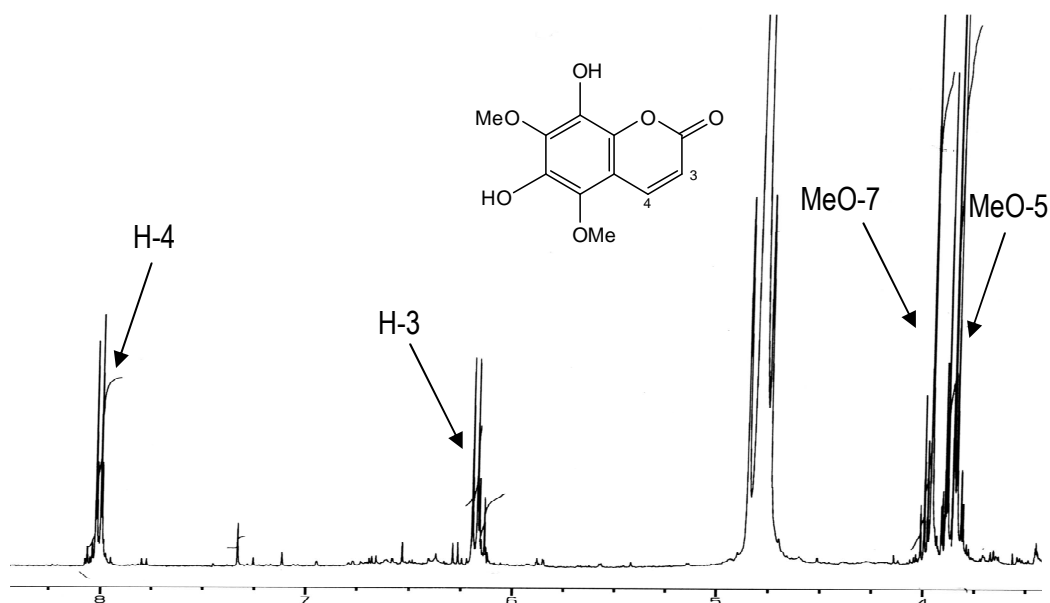


Abbildung 20: $^1\text{H-NMR}$ Spektrum von 6,8-Dihydroxy-5,7-dimethoxycumarin

Mischung aus einem tetra- und einem trioxygenierten Cumarin

Die EI-MS Untersuchung der vorliegenden Substanz lieferte eine Masse von $[M]^+$ 238 was für ein tetraoxygeniertes Cumarin spricht. Die typischen Zerfallsprodukte 223, 208, 194 beweisen das Vorliegen eines 1,2-Benzopyrons mit zwei Hydroxy- und zwei Methoxygruppen. Das $^1\text{H-NMR}$ -Spektrum zeigte zwei Paar olefinische Doublets, welche partiell überlagert sind (H-3 (6,22, $J = 9,4$ Hz)(6,25, $J = 9,5$ Hz), H-4 (7,85, $J=10$ Hz) (7,82, $J = 9,6$ Hz)) sowie Signale für drei Methoxygruppen bei $\delta = 4,02$ sowie bei 3,90 (x2). Des Weiteren ist ein Signal für ein H-Atom bei $\delta 7,15$ vorhanden, was den Schluss nahe legt, dass zusätzlich zum erwähnten tetrasubstituierten Cumarin ein trisubstituiertes Cumarin mit einer Methoxygruppe und zwei Hydroxygruppen (eine davon sulfatiert) vorliegen muss (Abbildung 21). Unterstützt wird diese Aussage durch das Fragment m/z 194, das die Eliminierung einer Sulfatgruppe aus dem Molpeak $[M]^+$ bei m/z 274 indizierte. Leider war es unter den verwendeten MS-Bedingungen nicht möglich, den Molpeak des sulfatierten Cumarins nachzuweisen. Die Massenpeaks 97 (HSO_4), 81 (HSO_3), 64 (SO_2) und 48 (SO) untermauern die Abspaltung einer Sulfatgruppe. Die Position der Substituenten für die jeweiligen Cumarinverbindungen konnte allein aus den vorhandenen Daten nicht entnommen werden. Durch Vergleich mit authentischen Proben konnten die Signale

eines Sets jedoch der Struktur für ein 5-Hydroxy-6,7-Dimethoxycumarin-8-sulfat zugeordnet werden, während die zweite Verbindung lediglich als Monohydroxy-monomethoxy-cumarinsulfat zu identifizieren war. Durch Daten- und Spektrenvergleich mit bisher im Arbeitskreis identifizierten Cumarinen aus *P. sidoides* bzw. *P. reniforme* und in Einklang mit dem Schlüsselfragment m/z 208 ($M^+ - SO_3$) erscheint die Struktur eines (Iso-) Fraxetinsulfats oder auch eines sulfatierten 6,8-Dihydroxy-7-methoxyderivates als wahrscheinlich (Abbildung 22). Jede dieser Strukturvarianten wäre ein neuer Naturstoff. Die genaue Anordnung der Substituenten am Aromaten erfordert weitere spektroskopische Untersuchungen.

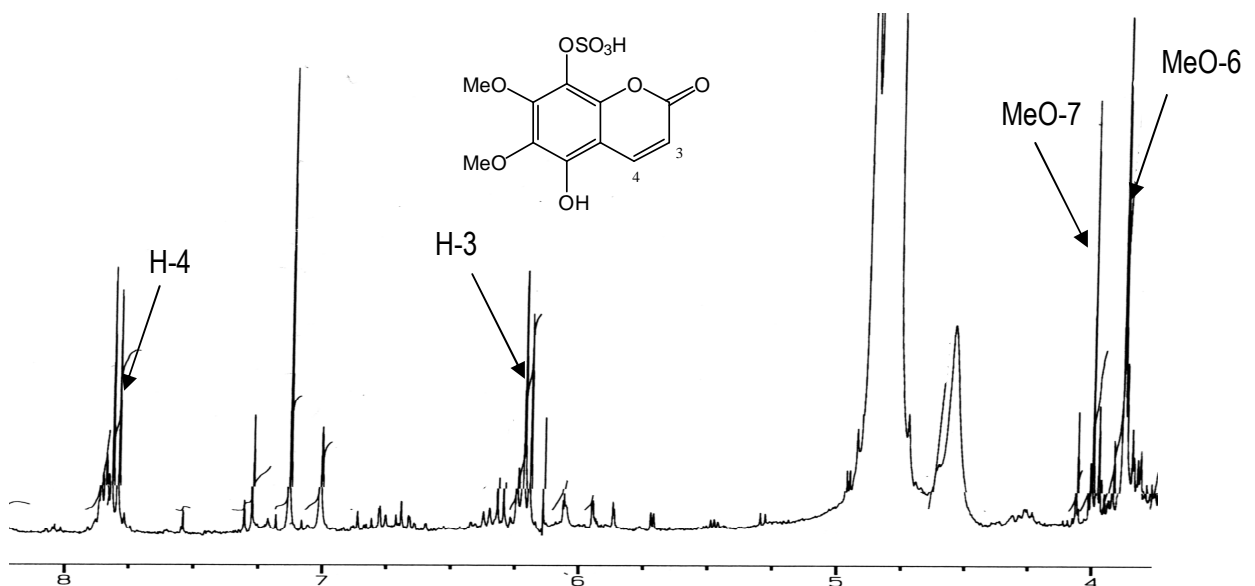


Abbildung 21: $^1\text{H-NMR}$ Spektrum der Mischung aus einem tetra- und einem trioxygenierten Cumarin

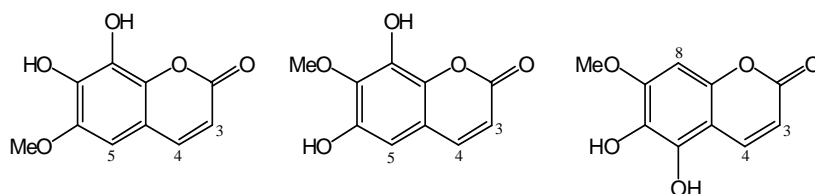


Abbildung 22: Mögliche Strukturvarianten (aus Vereinfachungsgründen ohne Sulfatgruppe)

4.4.2. Strukturaufklärung von Flavan-3-olen

Für die Auftrennung der Extrakte an Kieselgel in einzelne Flecken erwies sich die mobile Phase Ethylacetat-Ameisensäure-Wasser (18:1:1 V/V) geeignet. Erwartungsgemäß zeigten sich im Dünnschichtchromatogramm nach Detektion mit Vanillin-Salzsäure im oberen R_f -Bereich positiv reagierende Zonen, die auf das Vorliegen von Flavan-3-olen hindeuteten.

Epicatechin/Catechin

Die Bande mit dem höchsten Rf-Wert wurde durch Vergleich mit einer authentischen Probe als Epicatechin/Catechin angesehen. Eine Differenzierung der diastereomeren Verbindungen unter den gewählten chromatografischen Verbindungen war nicht gegeben. Aus dem hochauflösenden EI-Massenspektrum ging ein Molekulargewicht von m/z 291,0868 hervor (bzw. 329,0485 für das Kaliumaddukt), das mit der Struktur eines 3,3',4',5,7-Pentahydroxyflavans (Summenformel $C_{15}H_{14}O_6$, berechnete Masse 291,0864) vereinbar war. Diese Interpretation wurde durch $^1\text{H-NMR}$ spektroskopische Daten untermauert. Da es sich hierbei um ubiquitäre Verbindungen handelt, wurde auf eine Auftrennung des Gemisches verzichtet, zumal die Signalmuster im $^1\text{H-NMR}$ Spektrum jeder Komponente eindeutig zugeordnet werden konnten (Abbildung 23). Die Anwesenheit eines AB-Systems charakterisiert jeweils die *meta*-koppelnden Protonen an C-6 und C-8, während die Pyrogallolteilstruktur durch ein AMX-Spinsystem im tiefen Feld angezeigt wird. Im heterozyklischen Bereich findet sich ein AMXY-Spinsystem, charakteristisch für die Protonen H-2, H-3 und der Methylengruppe am C-4 eines Flavangrundkörpers. Zur Unterscheidung der Diastereomeren Catechin und Epicatechin dienen die heterozyklischen Protonen H-2 und H-3. Die Kopplungskonstante von $J = 6,2$ Hz belegt für Catechin eine relative 2,3-*trans* Konfiguration dieser Protonen, während die entsprechenden breiten Resonanzen im Falle von Epicatechin auf eine 2,3-*cis* Stellung hindeuten.

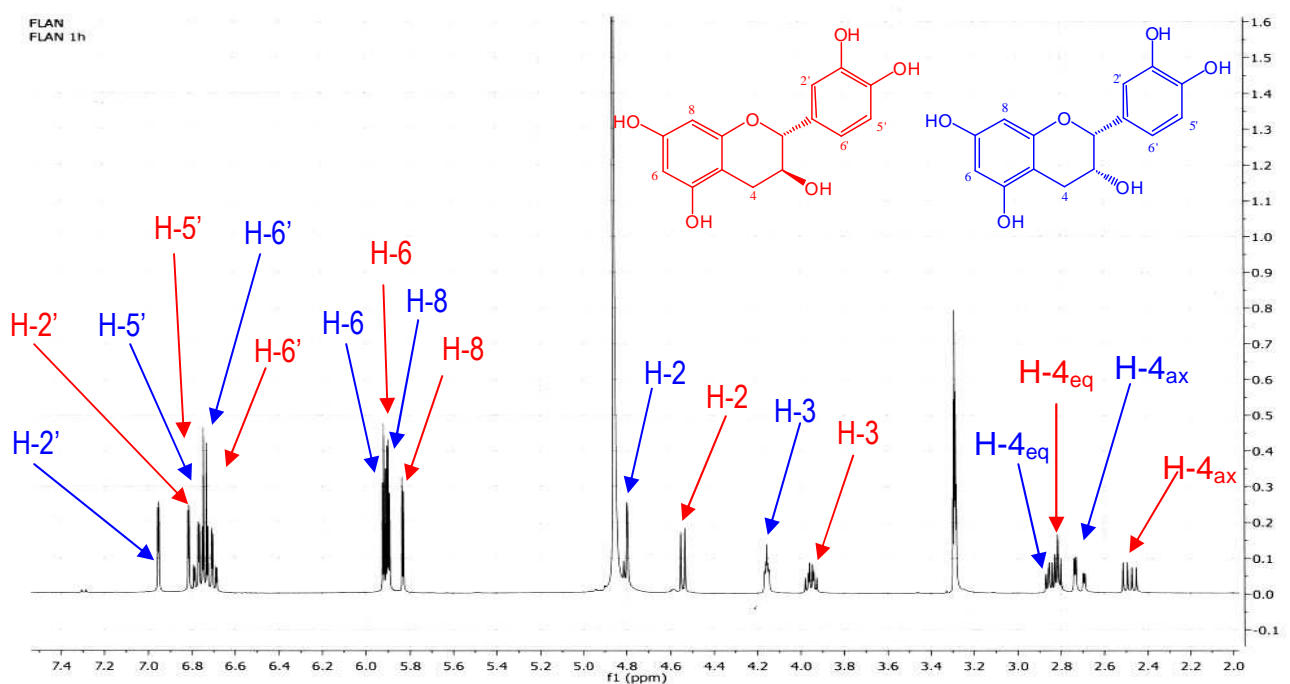


Abbildung 23: $^1\text{H-NMR}$ Spektrum von Epicatechin/Catechin

Epigallocatechin/Gallocatechin

Die darunterliegende Zone mit einem R_f-Wert von 0,72 zeigte ein identisches chromatografisches Lauf- und Detektionsverhalten (Vanillin/HCl, rot; FeCl₃-Reagenz, tiefblau) wie eine Gallocatechin-Referenzsubstanz. Auch in diesem Falle stellte sich die Frage, ob dieses Flavan-3-olderivat mit seinem diastereomeren Analogon Epigallocatechin vergesellschaftet vorlag. Ein HRESI-TOF Massenspektrum im negativen Modus zeigte einen Molpeak bei *m/z* 305,0715, entsprechend einer Summenformel von C₁₅H₁₄O₇ (berechnete Masse 305,0657). Eine HPLC-MS Analyse belegte die Anwesenheit von zwei Peaks mit identischen Molpeaks und damit das Vorliegen eines (Epi-) Gallocatechin-Gemisches. Aus vorgenannten Gründen wurde auch hier auf eine weitere Auftrennung verzichtet und das Substanzgemisch direkt ¹H-NMR spektroskopisch analysiert (Abbildung 24). Der wesentliche Unterschied zum Catechin/Epicatechin-Gemisch liegt im Tieffeldbereich für die B-Ring Protonen durch das Auftreten eines Zwei-Protonen-Signals anstelle eines AMX-Spinsystems für jede Substanz, welches den magnetisch äquivalenten Protonen H-2' und H-6' entspricht. Die relative 2,3-*trans* bzw. 2,3-*cis* Konfiguration für die Protonen H-2 und H-3 konnte wiederum den jeweiligen Kopplungskonstanten entnommen werden.

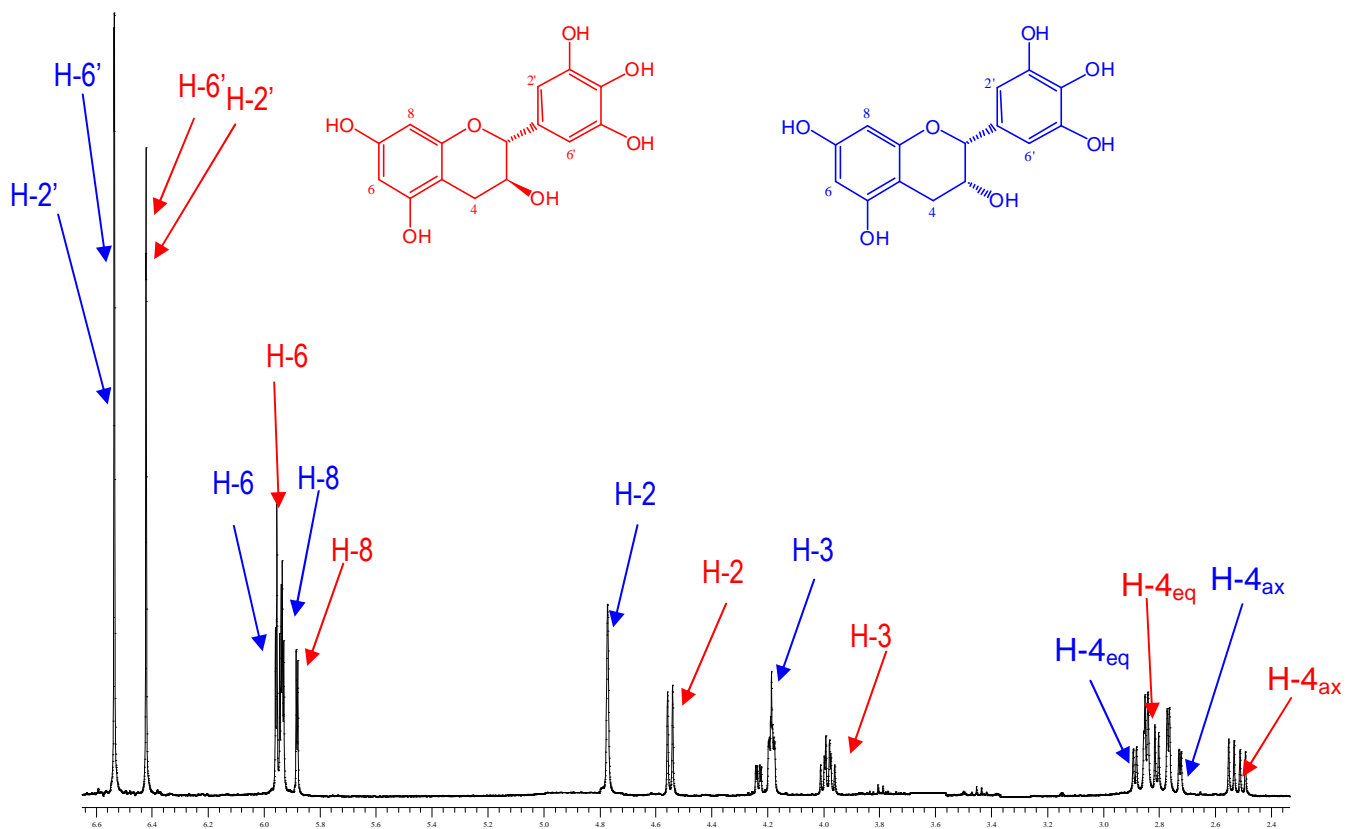


Abbildung 24: ¹H-NMR Spektrum von Epigallocatechin/ Gallocatechin

4.4.3. Untersuchung einer dimeren Proanthocyanidinfraktion

In der vorliegenden Arbeit galt besonderes Interesse dimeren Proanthocyanidinen, die bei dc Untersuchungen (Abbildung 17) im mittleren R_f -Bereich anzutreffen waren. Denn wenn auch der Anteil der Polyphenole ca. 40% des Gesamtextraktes beträgt ([Schötz et al., 2008](#)), liegen bisher detaillierte Kenntnisse über die Zusammensetzung der Proanthocyanidinfraktion auf Grund ihrer komplexen Strukturvielfalt nicht vor. Eine genauere Charakterisierung von isolierten Hauptflecken, welche auf Grund ihres chromatographischen Laufverhaltens als oligomere Vertreter einzustufen sind, sollten nachfolgende Untersuchungen ergeben. Durch wiederholte Aufreinigung an Sephadex LH-20 mit unterschiedlichen Elutionsmitteln wurde eine Fraktion erhalten, welche nach massenspektroskopischer Analyse dimere Proanthocyanidine angereichert enthielt.

Den Hauptanteil stellte dabei eine Verbindung mit der Masse m/z 611,1408 und einer entsprechenden Summenformel $C_{30}H_{26}O_{14}$. Der Peak m/z 633,1228 korreliert mit dem Natriumaddukt in Übereinstimmung mit der Aussage zur Massenzahl. Die massenspektroskopischen Daten entsprechen einem dimeren Prodelphinidin vom B-Typ, aufgebaut aus zwei (Epi-)Gallocatechineinheiten, mit den berechneten Massen von 611,1392 bzw. 633,1212 für das Natriumaddukt.

Ferner konnte ein dimerer Vertreter vom B-Typ mit einer Massenzahl von m/z 595,1496 (Summenformel: $C_{30}H_{26}O_{13}$, berechnete Masse) detektiert werden, in Einklang mit einem penta- (Catechin/Epicatechin) und einem hexa-hydroxylierten Flavanol Grundbaustein (Gallocatechin/Epigallocatechin). In kleinen Mengen wurden auch Massen für Dimere vom A-Typ nachgewiesen (Peaks bei m/z 593,1209 und 609,1158) (Abbildung 25, A), deren Bausteine durch eine zusätzliche Etherbindung doppelt verknüpft sind. Im unteren Massenbereich trat zusätzlich ein intensiver Peak bei m/z 307,0861 für (Epi)Gallocatechin auf, welcher vermutlich aus der Spaltung der Interflavanoidbindung dimerer Verbindungen resultiert.

Zur weiteren Charakterisierung wurde die Dimerenfraktion einer Säurehydrolyse unterzogen (Kap. 3.3.4.). Die gebildeten Anthocyanidine wurden massenspektroskopisch als Delphinidin (Massenzahl m/z 303,0504) und Cyanidin (Massenzahl m/z 287,0721) (Abbildung 25, B) identifiziert. Der deutlich höhere Anteil von Delphinidin bestätigte, dass der ‚obere‘ Baustein der Dimeren in dieser Fraktion größtenteils von (Epi)Gallocatechin gestellt wird und demzufolge Prodelphinidine mengenmäßig dominieren, begleitet von geringen Anteilen von Procyanidinen.

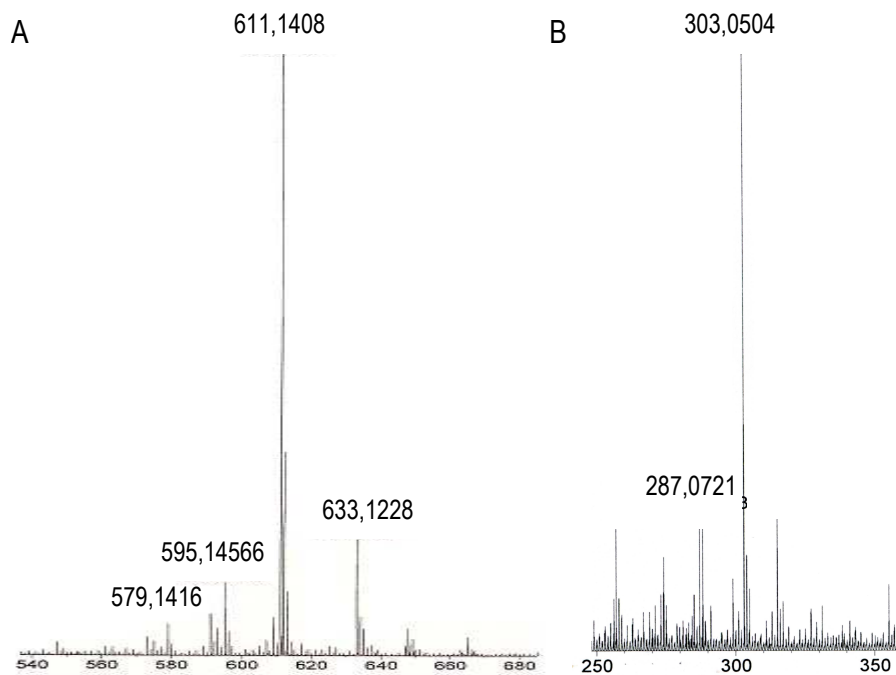


Abbildung 25: Massenspektren im positiven Modus
 A: Dimerenfraktion. B: Dimerenfraktion nach Säurehydrolyse

4.4.4. Strukturaufklärung von Dimeren

Nachdem das Molekülgerüst der Proanthocyanidine mit Hilfe der Massenspektroskopie und chemischen Spaltungsreaktionen bestimmt war, sollten nähere Aussagen zur Struktur der Hauptverbindungen mittels NMR Spektroskopie getroffen werden. Hierzu wurde das Dimerengemisch durch HPLC weiter aufgereinigt und vier chromatographisch homogene Substanzzonen gewonnen.

Gallocatechin-4 α ,8-epigallocatechin

Die Hauptverbindung zeigte mit Vanillin/HCl eine rote und mit FeCl₃ eine intensiv blaue Färbung. Letztere ist für eine vicinale Trihydroxylierung charakteristisch. Das MALDI-TOF Massenspektrum zeigte einen Molpeak [M]⁺ bei *m/z* 611. Diese Massenzahl stimmt mit der eines dimeren Prodelphinidins mit vicinaler Trihydroxylierung am Seitenphenyl des ‚oberen‘ und ‚unteren‘ terminalen Flavanbausteins überein. Gestützt wird diese Aussage durch den Nachweis von Delphinidin nach Säurebehandlung. Zwei intensive Zwei-Protonen-Singulets im ¹H-NMR Spektrum der freiphenolischen Verbindung bei δ 6.56 und δ 6.59 verifizierten die Vermutung einer Pyrogallolteilstruktur für die aromatischen B- und E-Ringe (Abbildung 26). Die Kopplungskonstanten $J_{2,3} = 7,9$ Hz und $J_{3,4} = 9,7$ Hz

untermauern die relative 2,3-*trans*-3,4-*trans* Konfiguration der Extendereinheit. Die relative 2,3-*cis* Konfiguration an der ‚unteren‘ Einheit wird durch die kleine Kopplungskonstante $J_{2,3} = 4,3$ Hz eindeutig belegt. Ein weiteres Indiz für diese stereochemische Anordnung war der schmale chemische Verschiebungsbereich der verbreiterten Signale für die Methylengruppe an C-4 (F) (δ 2,8-2,9). Bei *trans* konfigurierten Flavan-3-ol Bausteinen absorbieren diese Protonen erfahrungsgemäß als *dd* über einen ca. doppelt so großen Resonanzbereich. Die Zuordnung der Signale folgte eindeutig aus einem ^1H - ^1H COSY Spektrum. Die Lage der ^{13}C Resonanzen für C-2 (F) bei δ_{C} 79,9 und C-3 (F) bei δ_{C} 67,4 untermauern die Aussage zur 2,3-*cis* Stereochemie am ‚unteren‘ terminalen Bausteins des dimeren Prodelphinidins ([Fletcher et al., 1977](#)). Die 4,8-Interflavanoidbindung konnte mit Hilfe von HMBC-Experimenten eindeutig ermittelt werden. Die Signale für H-4 (C) bei δ 4,63 und H-2 (F) bei δ 4,88 zeigten long-range Korrelationen zu einem Kohlenstoffsignal bei δ_{C} 155,2. Die Zuordnung dieser ^{13}C Resonanz zum C-8a (D) folgte aus HMQC- und HMBC-Experimenten. Die vorgenannten C-H Korrelationen über drei Bindungen werden nur bei einer 4,8-Interflavanoidbindung vorgefunden ([DeBruyne et al., 1996](#)) und belegten somit die Art der Verknüpfung zwischen den Flavan-3-ol Grundbausteinen. In Abb. 25 sind die wesentlichen Ergebnisse aus den HMBC-Experimenten zur Struktur dieser Verbindung dargestellt. Ein weiterer wesentlicher Gesichtspunkt bezieht sich auf die Konfiguration der Interflavanoidbindung an C-4 (C). Hierzu erwies sich die ^{13}C NMR Spektroskopie als wertvolles Hilfsmittel. [Fletcher et al. \(1977\)](#) fanden, dass der sog. γ -Shift ([Roberts et al., 1970](#); [Stothers, 1972](#); [Eliel et al., 1975](#)) eine Aussage zur absoluten Konfiguration an der Verknüpfungsstelle zulässt. Die Einführung eines *quasiauxialen* Substituenten an C-4 (C) führt für das ^{13}C Signal von C-2 (C) zu einer deutlichen Hochfeldverschiebung bis zu ca. 6 ppm, während *quasiequatoriale* Substituenten eine geringfügige Tieffeldverschiebung erkennen lassen. Die Abwesenheit dieses charakteristischen *gauche*-Effektes, kenntlich an der vergleichbaren Resonanzlage für C-2 (C) bei δ_{C} 84,0 wie für das zugrunde liegende Flavan-3-ol beschrieben, verwies auf eine *quasiequatoriale* (4α) Orientierung des 4-Arylsubstituenten. Aus den vorliegenden spektroskopischen Daten ergab sich die Struktur für das Hauptdimer als Gallocatechin- $4\alpha,8$ -epigallocatechin. Die spektroskopischen ^1H - und ^{13}C -NMR Daten sind in Tab 8 aufgelistet.

Das Vorkommen dieses Prodelphinidin wurde bisher in *Ribes* Arten ([Foo und Porter, 1978](#); [Tits et al., 1992](#)), Oolong Tee ([Hashimoto et al., 1989](#)) und *Trifolium repens* dokumentiert ([Foo et al., 2000](#))

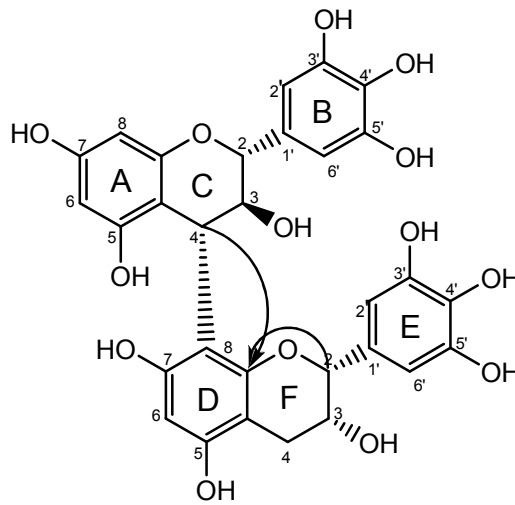


Abbildung 26: Struktur von Gallocatechin-4 α ,8-epigallocatechin mit HMBC-Korrelationen

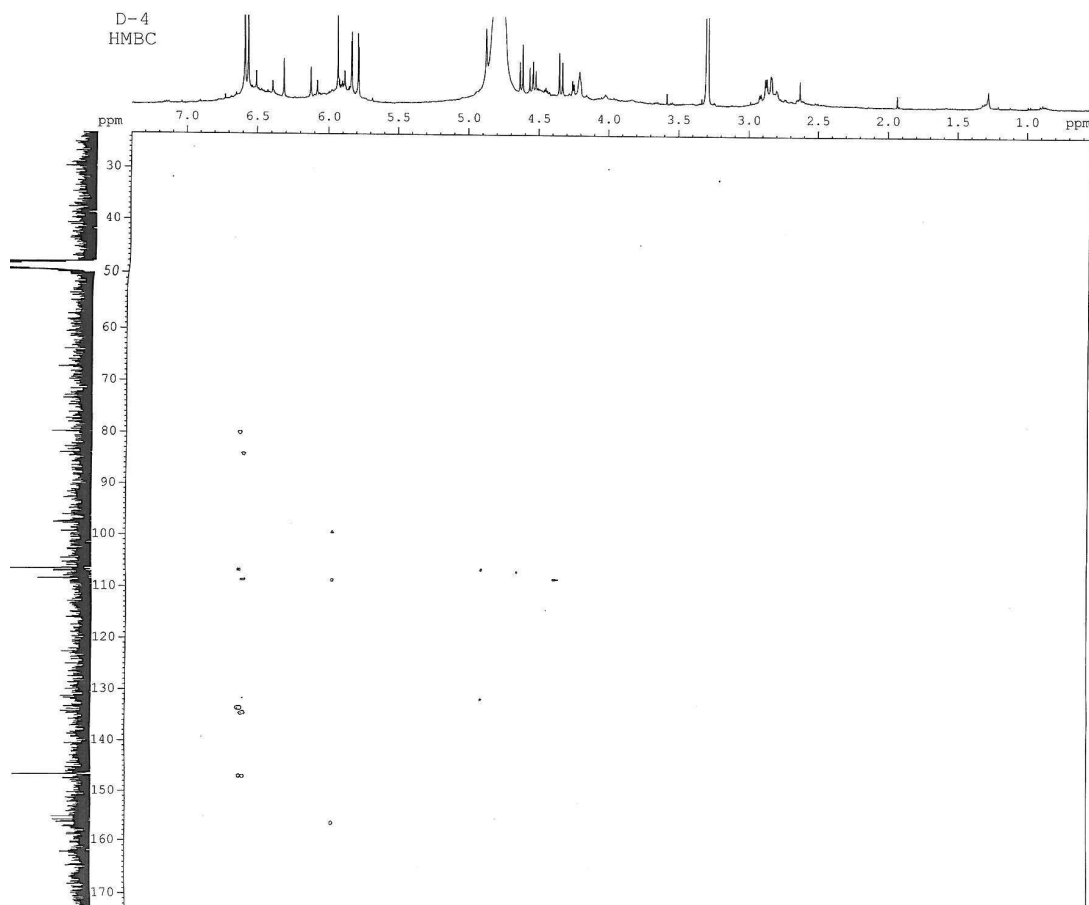


Abbildung 27: HMBC-Spektrum von Gallocatechin-4 α ,8-epigallocatechin

Tabelle 8: $^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, MeOH-d_6) und $^{13}\text{C-NMR}$ -Daten (100 MHz, MeOH-d_6) von Gallocatechin-4 α ,8-epigallocatechin

Position	δ_{H} ppm	δ_{H} ppm berechnet	Multiplizität J (Hz)	δ_{C} ppm	δ_{C} ppm berechnet
Ring C					
2	4,34	5,05	d (9,7)	84,0	83,4
3	4,55	4,87	dd (7,9/9,7)	73,7	72,6
4	4,63	4,13	d (7,9)	38,9	36,8
Ring A					
4a	-	-		106,7	100,5
5	-	-		155,2-158,7	157,3
6	5,84	5,82	d (2,4)	96,2	95,7
7	-	-		155,2-158,7	158,0
8	5,78	5,86	d (2,4)	97,5	95,2
8a				155,2-158,7	157,4
Ring B					
1'	-	-		131,4/131,7	130,9
2'	6,56	6,49	s	107,2/107,7	107,8
3'	-	-		146,7	146,3
4'	-	-		133,4	133,3
5'	-	-		146,7	146,3
6'	6,59	6,49	s	107,2/107,7	107,8
Ring F					
2	4,87	5,05	br s	79,9	83,8
3	4,21	4,49	m	67,4	67,7
4	2,8-2,9	2,83; 2,58	m	29,8	28,4
Ring D					
4a	-	-		99,4	103,5
5	-	-		155,2-158,7	154,7
6	5,98	5,96	s	108,5	95,8
7	-	-		155,2-158,7	157,3
8	-	-		97,7	106,8
8a	-	-		155,2-158,7	153,3
Ring E					
1'	-	-		131,4/131,7	130,9
2'	6,59	6,49	s	107,2/107,7	107,8
3'	-	-		146,7	146,3
4'	-	-		133,4	133,3
5'	-	-		146,7	146,3
6'	6,59	6,49	s	107,2/107,7	107,8

Epicatechin-4 β ,8-epigallocatechin

Die Substanz zeigte ein ähnliches Detektionsverhalten wie Gallocatechin-4 α ,8-Epigallocatechin nach Besprühen mit Vanillin/HCl und FeCl₃. Das MALDI-TOF Massenspektrum mit einem Molekülpeak [M]⁺ bei m/z 595 implizierte eine Summenformel von C₃₀H₂₄O₁₃. Die Differenz von 16 Masseneinheiten deutete auf die Abwesenheit einer Hydroxygruppe und damit auf die Einbindung eines (Epi)Catechinbaustein in das dimere Proanthocyanidin.

Zur Identifizierung der „oberen“ Molekülhälfte wurde etwas Substanz einer Säurehydrolyse unterworfen. Der dünnschichtchromatographische Nachweis des gebildeten Cyanidins bestätigte das Vorliegen eines 3,3',4',5,7-Pentahydroxyflavans. Im ¹H-NMR Spektrum traten im tiefen Feld ein Zwei-Protonen-Singulett bei δ 6,41 und ein AMX-Spinsystem (δ 6,5 – 6,7) in Erscheinung, die auf die Verknüpfung von zwei Flavan-3-oleinheiten mit unterschiedlichen Hydroxylierungsmustern an den aromatischen Ringen B und E hindeuteten. Auffallende Signalverbreiterungen und fehlende Auflösung im heterozyklischen Bereich erschwerten zum einen die Signalzuordnung, sind aber andererseits ein Indiz für das Vorliegen 2,3-*cis* konfigurierter Bausteine.

Die ¹³C Resonanzlagen für C-2 (F) (δ_C 79,7), C-3 (F) (δ_C 66,8), C-2 (C) (δ_C 77,1) sowie C-3 (C) (δ_C 73,5) bestätigten diese Vermutung ([Fletcher et al., 1977](#); [Sun et al., 1987](#)). HMBC-Experimente belegten über die long-range Korrelationen vom C-8a Signal zu den Resonanzen für H-4 (C) und H-2 (F), wie bereits oben beschrieben, die 4,8-Interflavanoidverknüpfung, während ein signifikanter γ -Shift Effekt für C-2 (C) ($\Delta\delta$ ca. 3 ppm) in Einklang mit einer β -Konfiguration steht. In Tabelle 9 sind die ¹H- und ¹³C-NMR Daten aufgelistet. Aus den spektroskopischen Daten konnte die Verbindung als Epicatechin-4 β ,8-epigallocatechin identifiziert werden. Dieses Procyanidin wurde bereits aus *Ziziphus jujuba* isoliert und strukturell aufgeklärt ([Malik et al., 1997](#)).

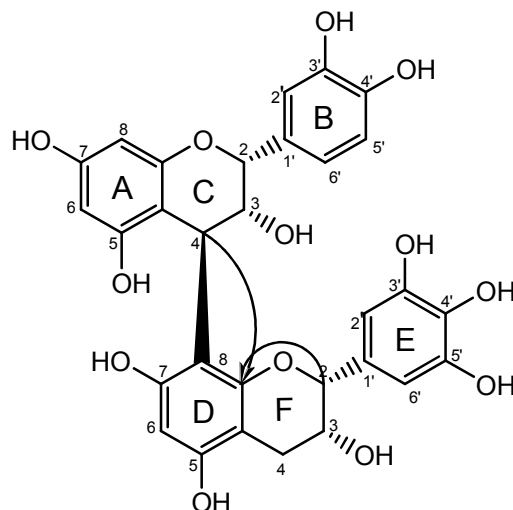


Abbildung 28: Struktur von Epicatechin-4 β ,8-epigallocatechin mit HMBC-Korrelationen

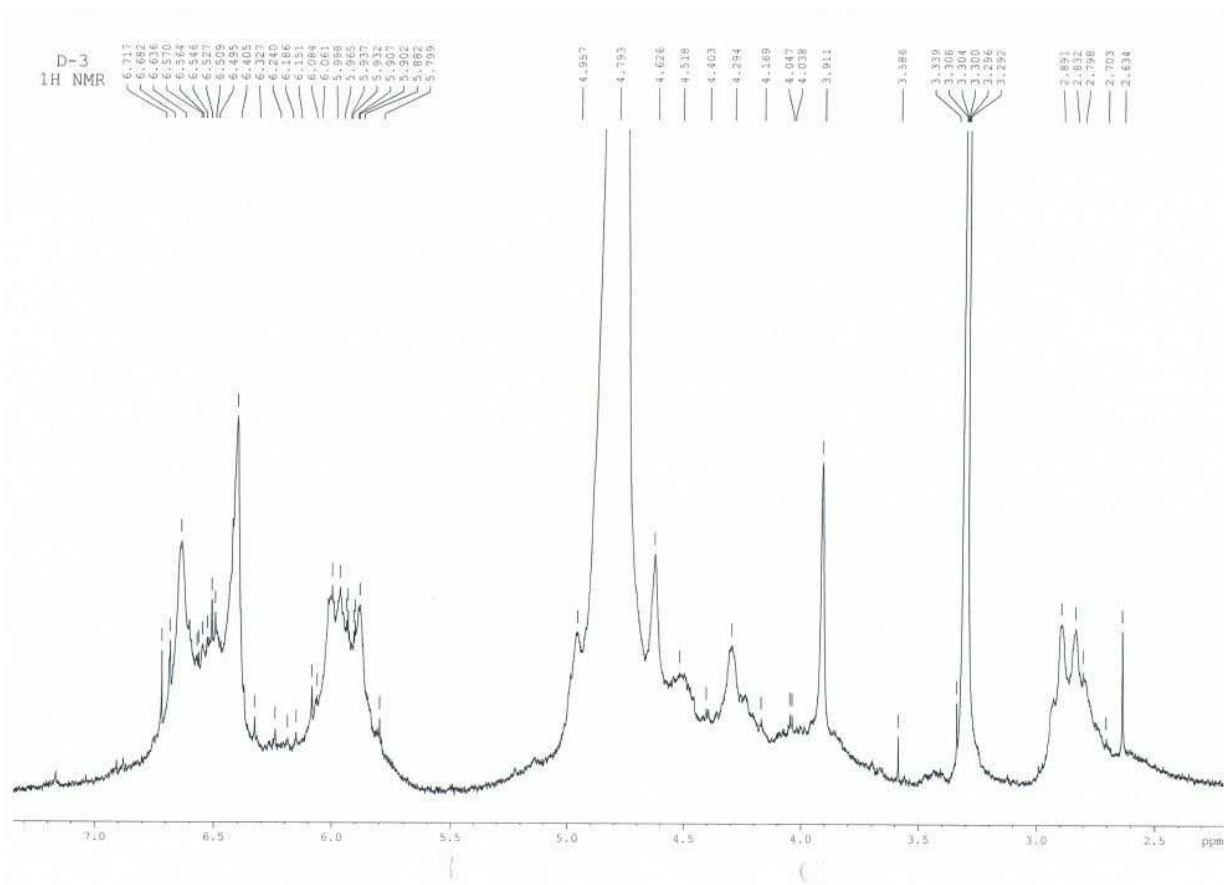


Abbildung 29: $^1\text{H-NMR}$ -Spektrum von Epicatechin-4 β ,8-epigallocatechin

Tabelle 9: $^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, MeOH-d_6) und $^{13}\text{C-NMR}$ -Daten (100 MHz, MeOH-d_6) von Epicatechin-4 β ,8-epigallocatechin

Position	δ_{H} ppm	δ_{H} ppm berechnet	Multiplizität J (Hz)	δ_{C} ppm	δ_{C} ppm berechnet
Ring C					
2	4,96	5,05	br s	77,1	83,1
3	3,91	4,87	br s	73,5	72,6
4	4,62	4,13	s	37,1	36,8
Ring A					
4a	-	-		107,2	100,5
5	-	-		156-159	157,3
6	5,88-5,99	5,82	m	96,1	95,7
7	-	-		156-159	158,0
8	5,88-5,99	5,86	m	96,6	95,2
8a	-	-		156-159	157,4
Ring B					
1'	-	-		131,3/131,9	131,5
2'	6,61-6,68	6,93	m	108-110	115,2
3'	-	-		146,7	145,8
4'	-	-		134,8	144,6
5'	6,71	6,71	br s	146,7	116,1
6'	6,61-6,68	6,75	m	108-110	121,0
Ring F					
2	4,96	5,05	s	79,7	83,8
3	4,29	4,49	br. s	66,8	67,7
4	2,85	2,83; 2,58	m	29,9	28,4
Ring D					
4a	-	-		100,6	130,5
5	-	-		156-159	154,7
6	5,88-5,99	5,96	m	97,4	95,8
7	-	-		156-159	157,3
8	-	-	m	109,7	106,8
8a	-	-		156-159	153,3
Ring E					
1'	-	-		131,3/131,9	130,9
2'	6,41	6,49	m	108-110	107,8
3'	-	-		146,7	146,3
4'	-	-		134,8	133,3
5'	-	-		146,7	146,3
6'	6,41	6,49	m	108-110	107,8

Gallocatechin-4 α ,6-gallocatechin

Einen ersten chemischen Hinweis auf die Struktur der Verbindung lieferte der Nachweis von Delphinidin durch Säurehydrolyse. Damit konnte als ‚obere‘ Molekülhälfte ein (Epi)Gallocatechinbaustein angenommen werden. Das MALDI-TOF Massenspektrum zeigte einen Molpeak $[M]^+$ bei m/z 611 und führte zur Summenformel von $C_{30}H_{26}O_{14}$ für ein dimeres Prodelphinidin mit zwei Pyrogalloteilstrukturen (Ringe B und E). Die Ähnlichkeit des 1H -NMR Spektrums mit dem des Procyanidins B-6 (Catechin-4 α ,6-catechin) ([DeBruyne et al., 1996](#)) vereinfachte die Zuordnung der Signale, welche letztendlich durch ein COSY-Spektrum abgesichert wurde. Signifikante Unterschiede traten im tiefen Feld (δ 6,0 – 6,5 ppm) durch die Anwesenheit von Zwei-Protonen-Singulets (charakteristisch für 1,3,4-trisubstituierte Aromaten) anstelle von AMX-Spinsystemen in Erscheinung. Die großen Kopplungskonstanten für die heterozyklischen Protonen an den Ringen C und F belegten die relative all-*trans* Konfiguration der Bausteine (Tabelle 10). Die durchgängige, partiell überlappende Verdoppelung von Signalen ist auf zwei rotamere Formen zurückzuführen ([Fletcher et al., 1977](#)). Das Rotamerenverhältnis (ca. 1:1) steht in Einklang mit einer 4,6-Interflavanoidbindung. Weitgehende Übereinstimmung in allen Signallagen und Kopplungskonstanten im Vergleich zum 1H -NMR Spektrum von Catechin-4 α ,6-Catechin, insbesondere die relative Tieffeldlage des AB-Spinsystems der *meta*-koppelnden Protonen H-6 und H-8 (Ring A) sowie die chemische Verschiebung von H-8 (D) gelten als Indizien für die 4,6-Interflavanbindung ([DeBruyne et al., 1996](#)). Gestützt wird diese Aussage durch HMBC-Experimente, aus denen mit der long-range Kopplung zwischen H-4 (C) und C-5 (D) sowie zwischen H-4 (F) und C-5 (D) die Art der Verknüpfung bewiesen wurde. Die Abwesenheit des charakteristischen γ -Shift Effektes, kenntlich an der vergleichbaren Resonanzlage für C-2 (C) bei δ_C 84,3 wie für das zugrunde liegende Flavan-3-ol beschrieben, verwies auf eine *quasiequatoriale* (4 α) Orientierung des 4-Arylsubstituenten. Aus den vorliegenden spektroskopischen Daten ergab sich die Struktur für die isolierte Verbindung als Gallocatechin-4 α ,6-gallocatechin. Dieser Naturstoff wurde bereits aus *Cistus incanus* isoliert ([Petereit et al., 1991](#)). Die spektroskopischen 1H - und ^{13}C -NMR Daten sind in Tabelle 10 aufgelistet.

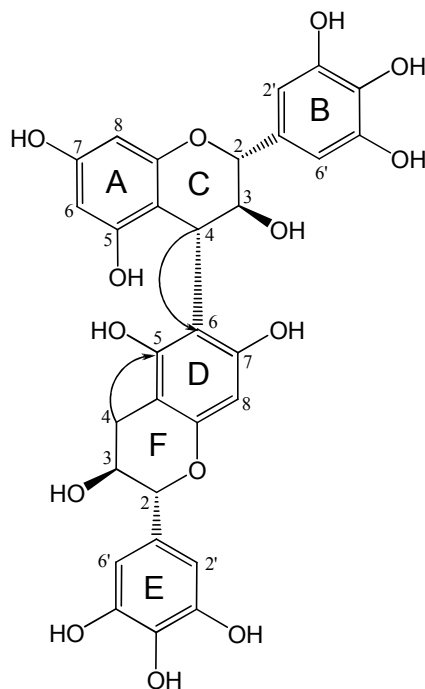


Abbildung 30: Struktur von Gallocatechin-4 α ,6-galocatechin mit HMBC-Korrelationen

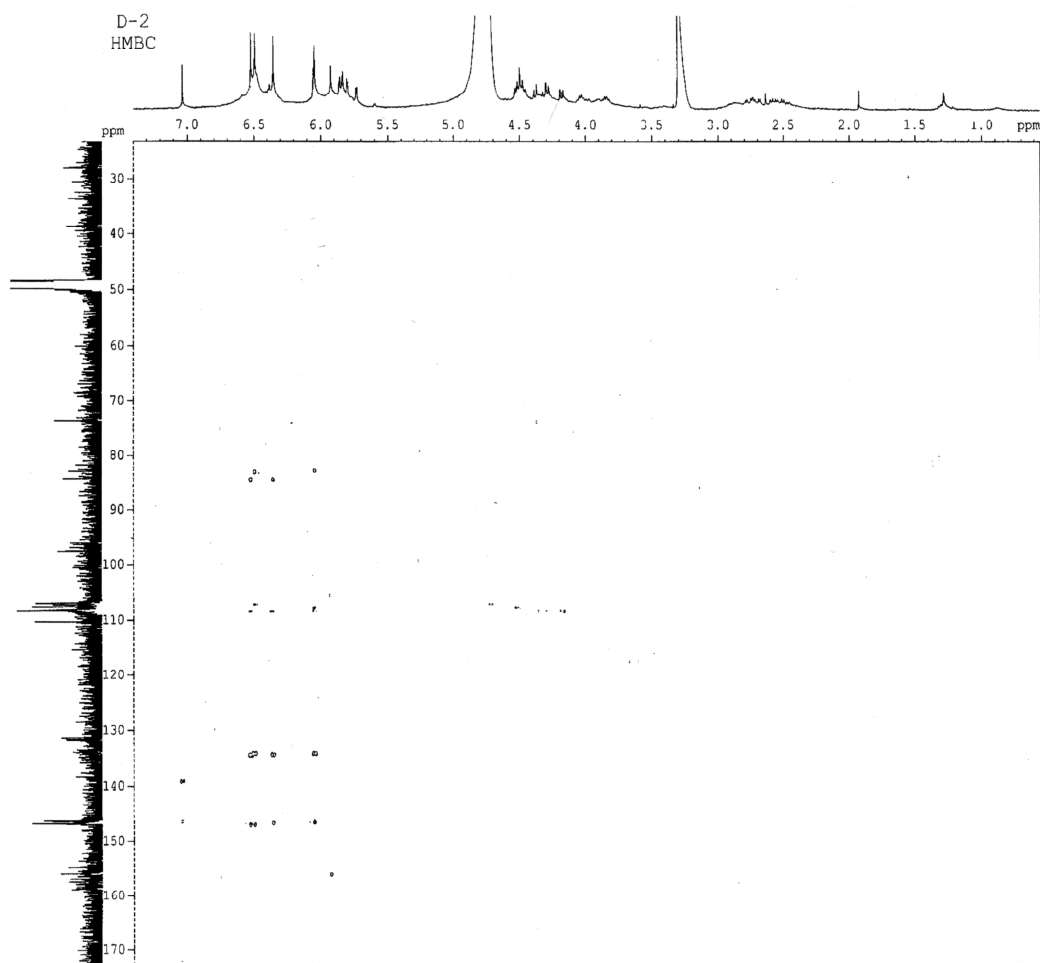


Abbildung 31: HMBC-Spektrum von Gallocatechin-4 α ,6-galocatechin

Tabelle 10: $^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, MeOH-d_6) und $^{13}\text{C-NMR}$ -Daten (100 MHz, MeOH-d_6) von Galocatechin-4 α ,6-galocatechin

Position	δ_{H} ppm Rotamer		δ_{H} ppm berechnet	Multiplizität J (Hz)	δ_{C} ppm	δ_{C} ppm berechnet
	1	2				
Ring C						
2	4,18	4,29	5,05	d (9,6/ 8,2)	84,3	83,4
3	4,52	4,52	4,87		73,7	72,6
4	4,38	4,46	4,13	d (7,8/ 8,0)	38,6	36,5
Ring A						
4a	-	-			107,1	100,5
5	-	-			154,8-158,8	157,3
6	5,84	5,86	5,82	d (2,4)	96,3	95,7
7	-	-			154,8-158,8	158,0
8	5,73		5,86	d (2,4)	96,9	95,2
8a	-	-			154,8-158,8	157,4
Ring B						
1'	-	-			131,7	130,9
2'	6,04	6,49	6,49	s	108,4-108,8	107,8
3'	-	-			146,3-146,8	146,3
4'	-	-			133,9	133,3
5'	-	-			146,3-146,8	146,3
6'	6,04	6,49	6,49	s	108,4-108,8	107,8
Ring F						
2	4,52	4,80	5,05	d (6,8/--)	82,8	86,0
3	3,84	4,04	4,49	m	68,5	67,7
4	2,4-2,8	2,4-2,8	2,83 / 2,58	m	28,0	28,4
Ring D						
4a	-	-			100,5	109,8
5	-	-			154,8-158,8	154,7
6	-	-			110,3	105,9
7	-	-			154,8-158,8	154,6
8	5,92	6,05	6,00	s	97,5	97,6
8a	-	-			154,8-158,8	154,8
Ring E						
1'	-	-			131,7	130,9
2'	6,35	6,52	6,49	s	108,4-108,8	107,8
3'	-	-			146,7	146,3
4'	-	-			133,9	133,3
5'	-	-			146,3-146,8	146,3
6'	6,35	6,52	6,49	s	108,4-108,8	107,8

Epigallocatechin-4 β ,8-epicatechin

Diese Verbindung (Abbildung 32) konnte nur in geringen Spuren isoliert werden und zeigte wiederum mit Vanillin/HCl eine rote und mit FeCl_3 eine blaue Färbung. Das MALDI-TOF Massenspektrum zeigte einen Molpeak $[\text{M}]^+$ bei m/z 595 und suggerierte eine Struktur aus zwei unterschiedlichen Flavan-3-ol Bausteinen. Das nach saurer Hydrolyse gebildete Delphinidin bestätigte das Vorliegen eines 3,3',4',5',5,7-hexahydroxylierten Flavans. Das $^1\text{H-NMR}$ Spektrum war wiederum durch markante Signalverbreiterungen und extremen Signalüberlappungen charakterisiert, welche auf das Vorliegen 2,3-*cis* konfigurierter Bausteine hindeutete (Kap. 3.4). Auf Grund von Substanzmangel konnten keine auswertbaren ^{13}C und HMBC-Spektren aufgezeichnet werden. Aus dem Datenvergleich mit Epicatechin-4 β ,8-Epigallocatechin wird die Struktur eines Epigallocatechin-4 β ,8-epicatechins abgeleitet, welche bisher noch nicht in der Literatur beschrieben wurde.

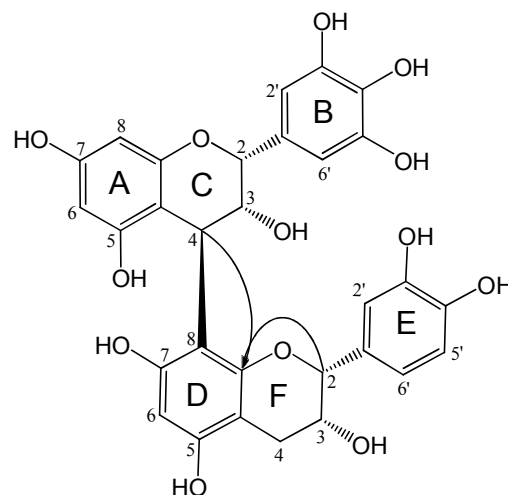


Abbildung 32: Struktur von Epigallocatechin-4 β ,8-epicatechin mit HMBC-Korrelationen

4.5. Bestimmung des Gesamtpolyphenolgehaltes

Auf Grund des bekanntlich hohen Polyphenolgehalts im Spezialextrakt EPs[®] 7630 ([Schötz et al., 2008](#)) und einem breiten Spektrum an pharmakologischen Aktivitäten für diese Sekundärstoffgruppe erschien es bedeutungsvoll, diesen Anteil in der untersuchten Charge 007 zu bestimmen. Das Prinzip ist eine photometrische Differenzbestimmung zwischen Gesamtpolyphenolen und Restpolyphenolen, aus der sich der Anteil an Hautpulver gebundenen Gerbstoffen ergibt (Abbildung 33).

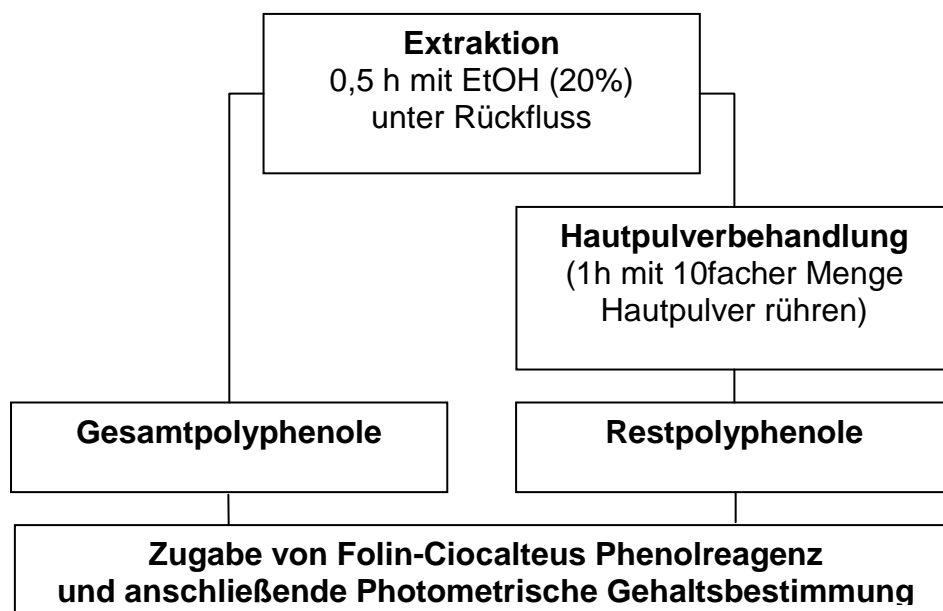


Abbildung 33: Bestimmung des Gerbstoffgehalts nach Ph. Eur. 6.0

Als Pflanzenmaterial wurde zusätzlich *P. sidoides* und *P. reniforme* aus verschiedenen Erntejahren untersucht und dazu dieses zunächst einer Heißextraktion unterworfen. Bei Extrakten (EPs[®] 7630, MIP, MSP) konnte auf diesen Schritt verzichtet werden. Extrakte wurden direkt in einem geeigneten Lösungsmittel gelöst. Ein Aliquot des Ansatzes wurde mit Folin-Ciocalteus Phenolreagenz und Natriumcarbonat versetzt. Polyphenole reagieren zu einer blauen Verbindung, deren Farbintensität photometrisch bei 760 nm vermessen wird (Gesamtpolyphenole). Ein weiteres Aliquot wurde einer Hautpulverbehandlung unterworfen, bei der Polyphenole unspezifisch gebunden und mittels Filtration aus der Probe entfernt wurden. Der nicht gebundene Anteil (Restpolyphenole) wurde ebenfalls nach Zugabe von Folin-Ciocalteus Reagenz bestimmt.

Nachteil dieser Methode ist, dass kurzkettige Gerbstoffe auf Grund einer geringen Affinität zum Hautpulver nicht unbedingt vollständig aus der Probe entfernt werden. Eine dünnschichtchromatographische Überprüfung der Hautpulver behandelten

Probe zeigte in der Tat, dass noch immer Anteile von monomeren und dimeren Flavan-3-olen in der Untersuchungslösung vorhanden waren (Kap. 4.1) Ein weiterer Nachteil ist, dass das Folin-Ciocalteus Phenolreagenz nicht nur mit Gerbstoffen reagiert, sondern auch mit anderen niedermolekularen phenolische Komponenten des Extraktes wie z.B. Gallussäure oder Flavonoiden. Außerdem wird als Referenzsubstanz Pyrogallol verwendet und folglich die Ergebnisse als Pyrogalloläquivalente dargestellt. Auch ist keine Aussage über den Polymerisationsgrad der Gerbstoffe möglich. Da mit zunehmender Kettenlänge die Wechselwirkung mit biologischen Makromolekülen stark variieren kann, sind Rückschlüsse aus dem ermittelten Gerbstoffgehalt auf Wirkeigenschaften schwerlich möglich. Die Methode muss daher, wie andere auch, als Konventionsverfahren betrachtet werden.

4.5.1. Polyphenolgehalt in *P. reniforme* und *P. sidoides*

Zu Vergleichszwecken wurde der Gerbstoffgehalt in *P. reniforme* und *P. sidoides* ermittelt. Pflanzenmaterial aus späteren Erntejahren war leider nicht verfügbar. Das Untersuchungsmaterial stammte überwiegend aus Wildsammlungen und wurde freundlicher Weise von der Fa. Schwabe zur Verfügung gestellt.

Für die untersuchte Wurzeldroge von *P. reniforme* aus den Erntejahren 1992/93 wurde ein Gehalt von ca. 2,5% ermittelt (Abbildung 34). Das im Jahr 1993 geerntete Wurzelmaterial von *P. sidoides* hatte einen fast doppelt so hohen Gerbstoffgehalt von ca. 4,7%. Im Drogenmaterial derselben Art aus dem Folgejahr wurde ein Gehalt von ca. 3,4% gemessen. Diese Ergebnisse verweisen zum einen auf einen relativ höheren Gerbstoffgehalt in *P. sidoides*, zum anderen auch auf starke jährliche Schwankungen. Ursache hierfür können biogenetische Gründe oder edaphische Faktoren sein. Für die Produktion eines standardisierten Extraktes sind daher ein ständiges Monitoring des Erntematerials und optimierte Kulturbedingungen für den Anbau des Pflanzenmaterials unerlässlich. Dies wird in letzter Zeit zunehmend realisiert ([White et al, 2008](#)).

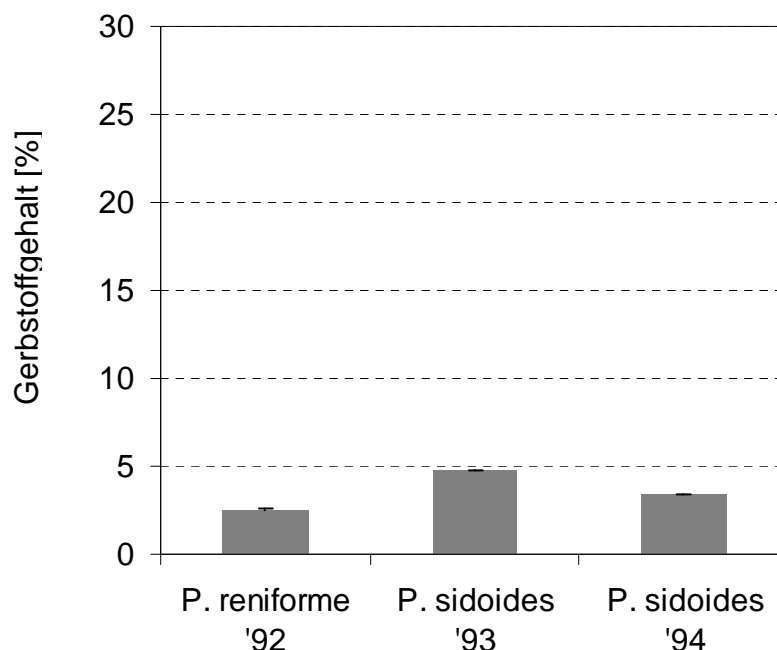


Abbildung 34: Polyphenolanteile verschiedener Pelargoniumarten

4.5.2. Polyphenolgehalt im Spezialextrakt EPs[®] 7630

Besondere Aufmerksamkeit wurde daher dem Polyphenolgehalt im Spezialextrakt EPs[®] 7630 gewidmet. Erwartungsgemäß enthielt dieser deutlich mehr Gerbstoffe (22,2%) als das zugrunde liegende Pflanzenmaterial (Abbildung 34). Die Quantifizierung bei mehreren Chargen zeigte nur geringe Gehaltsschwankungen und unterstreicht die gleichbleibende Qualität des industriellen Herstellungsverfahrens. Die Differenz zu dem publizierten doppelt hohen Gehalt von 40% erklärt sich durch einen internen Korrekturfaktor von $F=2$, ermittelt durch eine parallele gravimetrische Analyse ([Erdelmeier, 2010](#)). Die Unterfraktionen MIP (18,0%) und MSP (24,1%) haben einen ähnlich hohen Gerbstoffanteil wie der Gesamtextrakt (Abbildung 35).

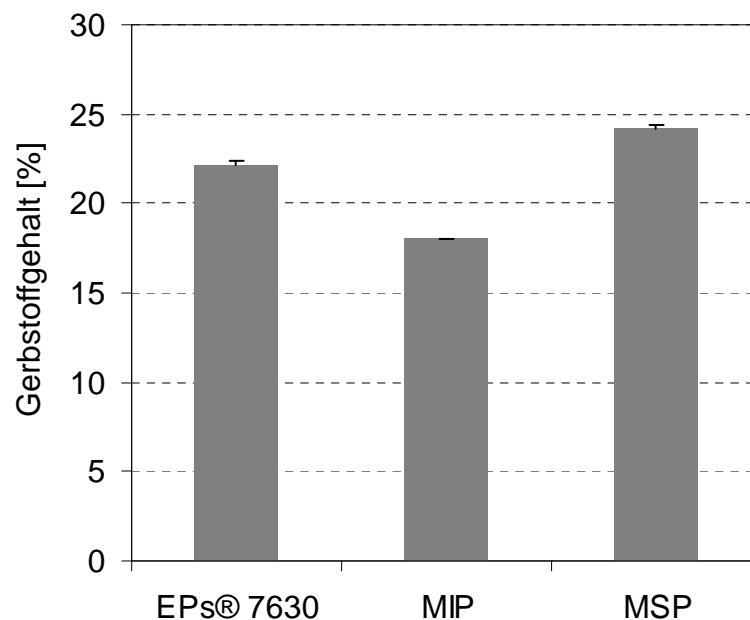


Abbildung 35: Nach der Methode im Ph. Eur. 6.0 ermittelte Polyphenolanteile im Spezialextrakt EPs[®] 7630 und den Unterfraktionen MIP sowie MSP

Biologische Untersuchungen

4.6. Adhäsionshemmung

Die Adhäsion eines Erregers an epitheliales Gewebe des Wirtsorganismus ist Voraussetzung für eine erfolgreiche Infektion. Nur nach diesem ersten Kontakt kann eine Kolonisierung und Internalisierung stattfinden ([Courtney et al., 2002](#)). Der Mechanismus dieses Vorgangs wird als zweistufiger Prozess beschrieben ([Hasty et al., 1992](#)). Zunächst findet eine unspezifische Annäherung des Erregers an das Epithel auf Grund von elektrostatischen Anziehungskräften statt. Im zweiten Schritt bindet das Bakterium gezielt mit seinen Adhäsinen an Rezeptoren der Zelloberfläche des Wirtes.

Streptococcus pyogenes ist ein häufig vorkommendes Humanpathogen, der eitrige Erkrankungen wie Tonsillitis verursacht. Streptokokken treten häufig auch als Komplikation bei einer, zunächst viral verursachten Pharyngitis auf, was den Einsatz von Antibiotika notwendig macht.

Der Spezialextrakt EPs[®] 7630 hat eine nur sehr schwache direkte antibakterielle Wirkung gegenüber einem breiten Erregerspektrum gezeigt ([Kayser und Kolodziej, 1997](#)). Nachfolgende Arbeiten von [Conrad et al.](#) (2007b) belegten jedoch eine antiinfektive Wirkung in Form von einer markanten Adhäsionshemmung von Streptokokken an HEP-2-Zellen durch EPs[®] 7630 in Konzentrationen von 1-30 µg/ml. In der vorliegenden Arbeit sollte untersucht werden, welche Inhaltsstoffe maßgeblich an der adhäsionshemmenden Wirkung beteiligt sind und welche Strukturmerkmale hierfür eine entscheidende Rolle spielen.

4.6.1. Prinzip

Die mit Calcein-AM grüengefärbten Streptokokken bzw. die epitheliale Zelllinie HEp-2 wurden mit 30 µg/ml der zu testenden Extrakte 1 h vorinkubiert. Vor Weiterverwendung der behandelten Zellen wurde die Testsubstanz rausgewaschen. Anschließend erfolgte die Koinkubation der HEp-2-Zellen mit den Bakterien im Verhältnis 1:10. Alle 60 min. wurde eine durchflusszytometrische Bestimmung der Adhäsionsrate durchgeführt (Abbildung 36). Der Anteil der unbehandelten HEp-2-Zellen mit adhärenenten unbehandelten Streptokokken (Negativkontrolle) wurde 100% gesetzt und die Messwerte der mit Proben behandelten Larynxzellen relativ dazu berechnet.

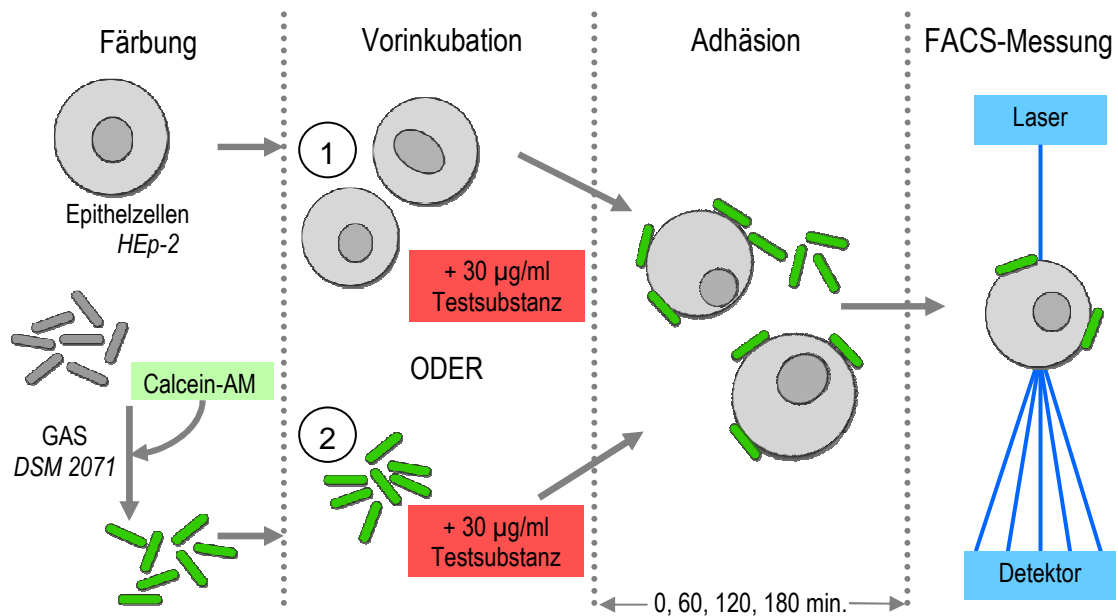


Abbildung 36: Versuchsaufbau zur Untersuchung des Adhäsionsverhaltens

4.6.2. Vorinkubation der HEp-2-Zellen

Bei Vorinkubation der Zellen mit den Extrakten konnte keine Hemmung der Anheftung von Bakterien an die Zelloberfläche festgestellt werden (Abbildung 37). Dieser Befund unterstreicht, dass die Testsubstanzen nicht mit Oberflächenstrukturen auf der Wirtszellseite interagieren.

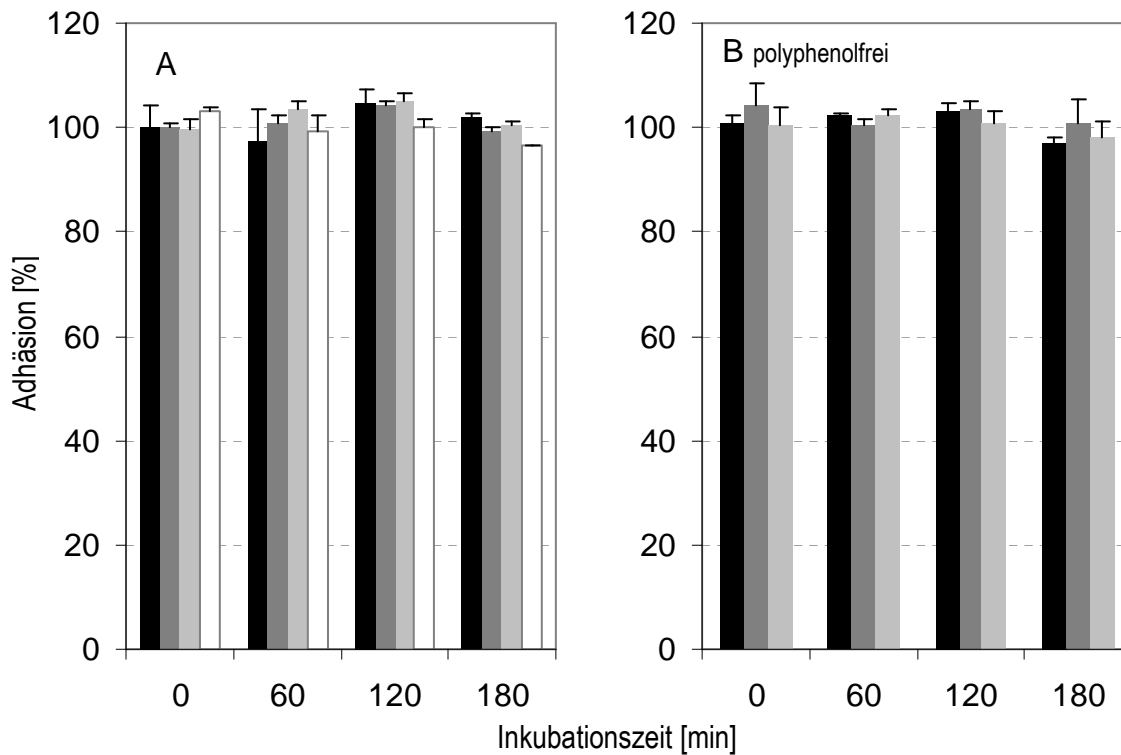


Abbildung 37: Einfluss von EPs® 7630-Fractionen auf HEp-2-Zellen

Die Zellen wurden 1 h bei 37 °C mit 30 µg/ml der Extrakte inkubiert und die Testsubstanzen ausgewaschen, bevor die Koinkubation mit den Bakterien stattfand. A: Einfluss von EPs® 7630 ■, methanolunlösliche Phase (MIP) ■, methanollöslichen Phase MSP ■ und der Dimerenfraktion □. B: Einfluss der polyphenolfreien Fraktionen EPs HP ■, MIP HP ■ und MSP HP ■ (n=3; p < 0,05 = *, p < 0,01 = **, p < 0,001 = ***).

4.6.3. Vorinkubation von A-Streptokokken

Wurden jedoch die Bakterien vorbehandelt, zeigten sich deutlich antiadhäsive Effekte für EPs[®] 7630, MIP, MSP sowie die Dimerenfraktion DIM (Abbildung 38). EPs[®] 7630 selbst reduzierte die Anheftung von Bakterien um bis zu 47%. Auch MIP (34%), MSP (30%) und DIM (39%) zeigten ein vergleichbar hohes antiadhäsives Potential. Im Gegensatz dazu bewirkten die entsprechenden polyphenolfreien Fraktionen nach Hautpulverbehandlung (EPS-HP, MIP-HP, MSP-HP) praktisch keinen inhibierenden Effekt auf die Adhäsion der Bakterien an HEp-2 Zellen. Dieses Ergebnis belegt, dass eine Wechselwirkung der Testsubstanzen mit Oberflächenstrukturen der Bakterienzellen gegeben ist und dass die in EPs[®] 7630 enthaltenen Gerbstoffe dabei eine entscheidende Rolle spielen. Da die Adhäsionshemmung der Dimerenfraktion vergleichbar war mit der für den Gesamtextrakt, spielt offensichtlich der Polymerisationsgrad eine untergeordnete Rolle.

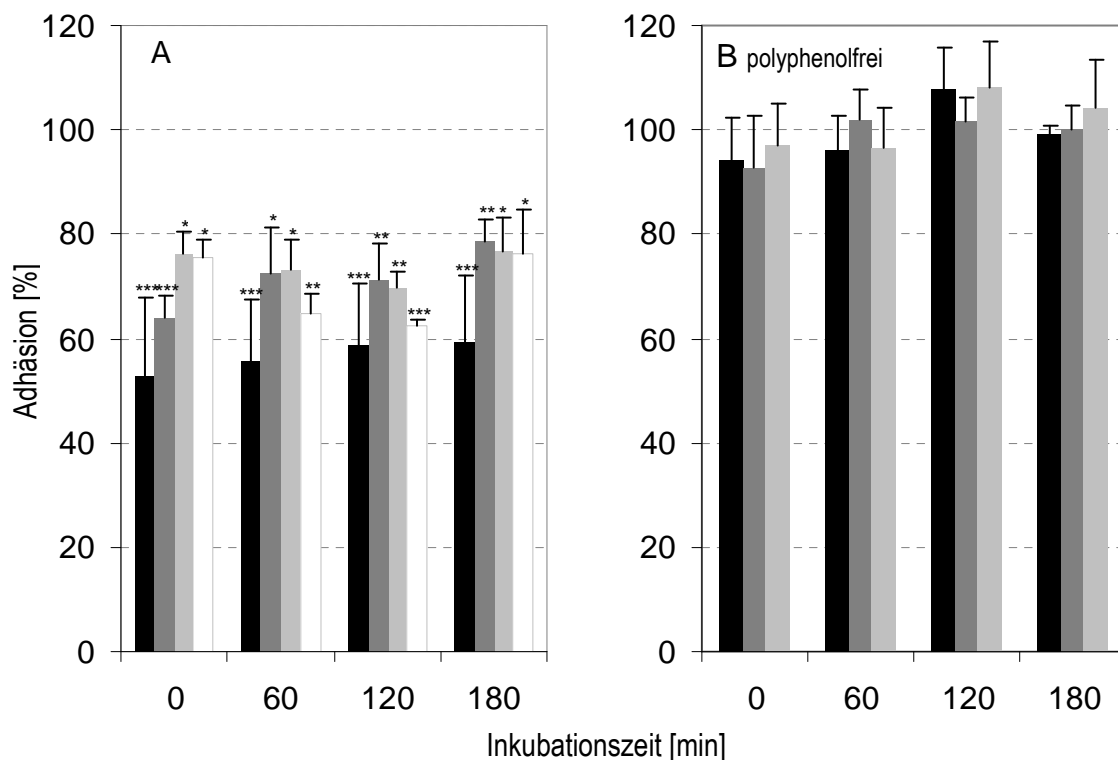


Abbildung 38: Einfluss der EPs[®] 7630-Fraktionen auf die Adhäsion von GAS an HEp-2 Zellen

Bakterien wurden 1 h bei 37 °C mit 30 µg/ml der Extrakte inkubiert. Die Testsubstanz wurde ausgewaschen, bevor die Koinkubation mit den HEp-2-Zellen stattfand. A: Einfluss von EPs[®] 7630 ■, methanolunlösliche Phase (MIP) ■, methanollöslichen Phase (MSP) ■ und der Dimerenfraktion □. B: Einfluss der polyphenolfreien Fraktionen EPs HP ■, MIP HP ■ und MSP HP ■ (n=3; p < 0,05 =*, p < 0,01 =**, p < 0,001 =***).

4.6.4. Einfluss verschiedener Gerbstofftypen auf die Adhäsion

Da nach den vorhergehenden Untersuchungen nur nach Vorinkubation der Bakterien mit den Proben ein antiadhäsiver Effekt zu beobachten war, wurden die zusätzlich getesteten Pflanzenextrakte lediglich zur Vorinkubation der A-Streptokokken eingesetzt. Dabei war die Auswahl der pflanzlichen Extrakte so gewählt, dass Aussagen zu Struktur-Wirkungsbeziehungen bei Proanthocyanidinen erzielt werden konnten.

Antiadhäsiver Effekt von B-Typ Procyanidinen

In einem ersten Schritt wurden Gerbstofffraktionen aus der Rinde von *Salix spp.*, den Blättern von *Betula spp.*, den Früchten von *Crataegus oxyacantha* L. und den Blättern von *Nelia meyeri* SCHWANTES getestet. Wie bereits in Kap. 3.2.2 erwähnt, handelt es sich bei diesen Proanthocyanidinen um Flavan-3-olketten, welche ausschließlich entweder aus Catechin- und/oder Epicatechinbausteinen aufgebaut sind und demzufolge als Procyanidine klassifiziert werden. Interessanter Weise wurden für alle diese Gerbstofffraktionen durchweg nur sehr schwache Hemmungen der Adhäsion beobachtet (Abbildung 39). Dies impliziert, dass Procyanidine als antiadhäsiv aktive Substanzen nicht in Betracht zu ziehen waren.

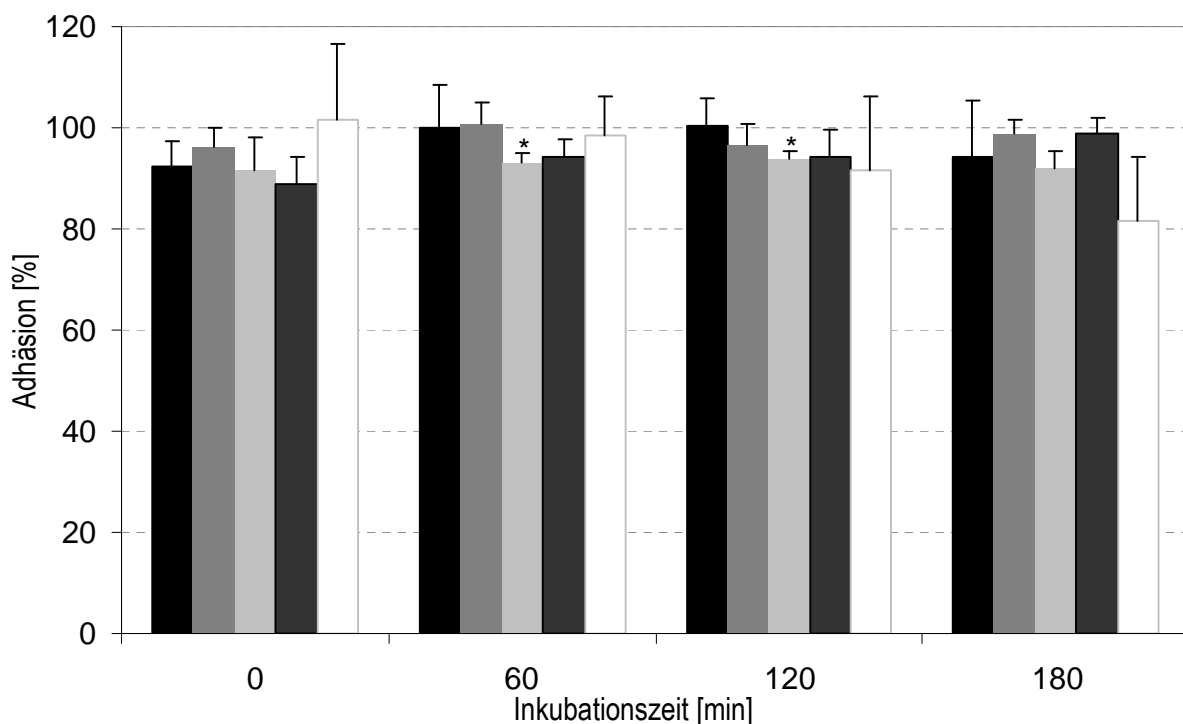


Abbildung 39: Einfluss von B-Typ Proanthocyanidinen auf die Adhäsion

Bakterien wurden 1 h bei 37 °C mit den Gerbstoffextrakten inkubiert. Die Testsubstanz wurde ausgewaschen, bevor die Koinkubation mit den HEp-2-Zellen stattfand. *Betula spp.* ■, *N. meyeri* AIT. ■, *Salix spp.* ■, *C. oxyacantha* L. ■ und *E. palida* MOENCH □ (n=3; p < 0,05 =*, p < 0,01 =**, p < 0,001 =***)

Antiadhäsiver Effekt von Prodelphinidinen

Die in den Blättern von *Ginkgo biloba* L. enthaltenen Proanthocyanidine sind überwiegend am B-Ring trihydroxyliert (=Prodelphinidine). Hierbei zeigte ein Acetoneluat aus dem Spezialextrakt EGb761, welches freundlicherweise von der Fa. Dr. Willmar Schwabe & Co KG, Karlsruhe zur Verfügung gestellt wurde, ein signifikantes antiadhäsives Potential (26% Adhäsionshemmung nach 180 min.) (Abbildung 40). Dieser Acetonextrakt zeigte nach EPs[®] 7630 die höchste antiadhäsive Aktivität in der gesamten Testreihe.

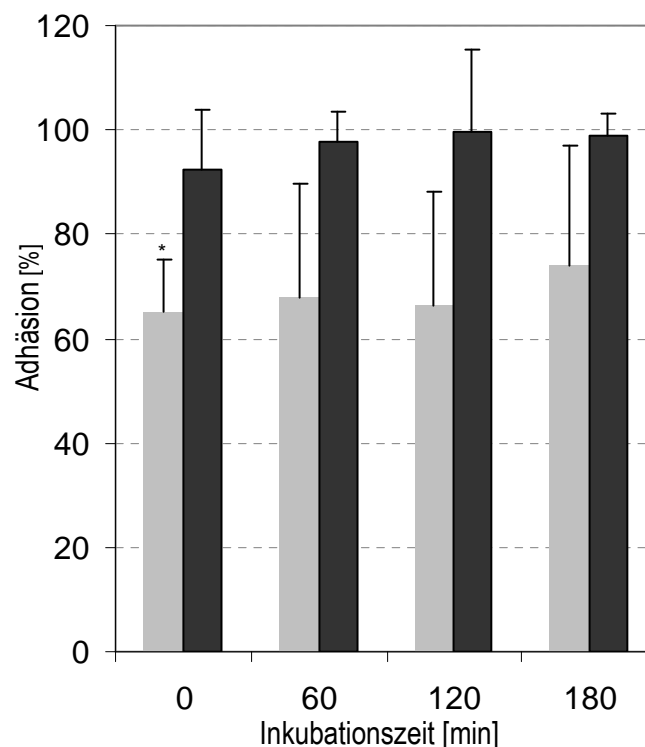


Abbildung 40: Einfluss von Prodelphinidinen und A-Typ Proanthocyanidinen auf die Adhäsion von GAS an HEp-2 Zellen

Bakterien wurden 1 h bei 37 °C mit 30 µg/ml Extrakt inkubiert. Die Testsubstanz wurde ausgewaschen bevor die Koinkubation mit den HEp-2-Zellen stattfand. Ginkgo Acetoneluat ■, Cranberryextrakt ■ (n=3; p < 0,05 =*, p < 0,01 =**, p < 0,001 =***).

Antiadhäsiver Effekt von A-Typ Proanthocyanidinen (Cranberry)

Neben Extrakten mit Proanthocyanidinen ausschließlich vom B-Typ, wurde ein Cranberryextrakt getestet. Die Beere des Strauchs *Vaccinium macrocarpon* AIT. enthält neben phenolischen Säuren wie Benzoesäure, p-Cumarsäure oder Kaffeesäure ([Zhang und Zuo, 2004](#)) sowie Anthocyanen ([Prior et al., 2001](#)) auch Proanthocyanidine aus Catechin und Epicatechineinheiten, welche aber über eine zusätzliche Etherbrücke verknüpft sind (A-Typ) ([Reed et al., 2005](#)). Diese besondere Verknüpfungsweise wurde auch in EPs[®] 7630 identifiziert ([Schötz et al., 2008](#)) und

wird als Strukturvoraussetzung für einen antiadhäsiven Effekt von Cranberryprodukten gegen *E. coli* ([Guay, 2009](#)) angesehen. Überraschender Weise zeigte der getestete Cranberryextrakt jedoch keinen signifikanten Einfluss auf die Adhäsionsfähigkeit der A-Streptokokken (Abbildung 40). Diese Beobachtung legt den Schluss nahe, dass A-Typ Strukturelemente bei Proanthocyanidinen nicht entscheidend für den antiadhäsiven Effekt bei GAS sind und deutet auf unterschiedliche Adhäsionsmechanismen für GAS und *E. coli* hin.

4.6.5. Antiadhäsiver Effekt von 30 µg/ml Flavan-3-olen

Nachdem die Testung der Ginkgoextrakte zeigte, dass das Hydroxylierungsmuster der Proanthocyanidine eine wichtige Rolle spielt, wurden (-)-Epicatechin, (-)-Epigallocatechin und (-)-Epigallocatechin-3-O-gallat als monomere Flavanol-3-ol Grundbausteine in der Konzentration von 30 µg/ml untersucht. Hierbei zeigte sich sehr deutlich, dass das antiadhäsive Potential mit steigender Anzahl der OH-Gruppen zunimmt (Abbildung 41). So besitzt (-)-Epicatechin keine Fähigkeit, die Adhäsion von GAS an HEp-2 Zellen zu hemmen, während (-)-Epigallocatechin die Anheftung der Bakterien nach 60 min bereits um ca. 18% im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle reduziert. Am stärksten antiadhäsiv wirksam erwies sich jedoch (-)-Epigallocatechin-3-O-gallat mit einer Adhäsionshemmung von ca. 39%. Dieser Effekt ist nur geringfügig schwächer als der von EPs[®] 7630 (47%). Wie bereits aufgezeigt, ist der Polymerisationsgrad der Gerbstoffe nicht entscheidend. Überraschend ist jedoch, dass bereits monomere Flavan-3-ole mit einer Trihydroxilierung am Ring B in der Lage waren, die Anheftung von GAS an HEp-2 Zellen signifikant zu inhibieren.

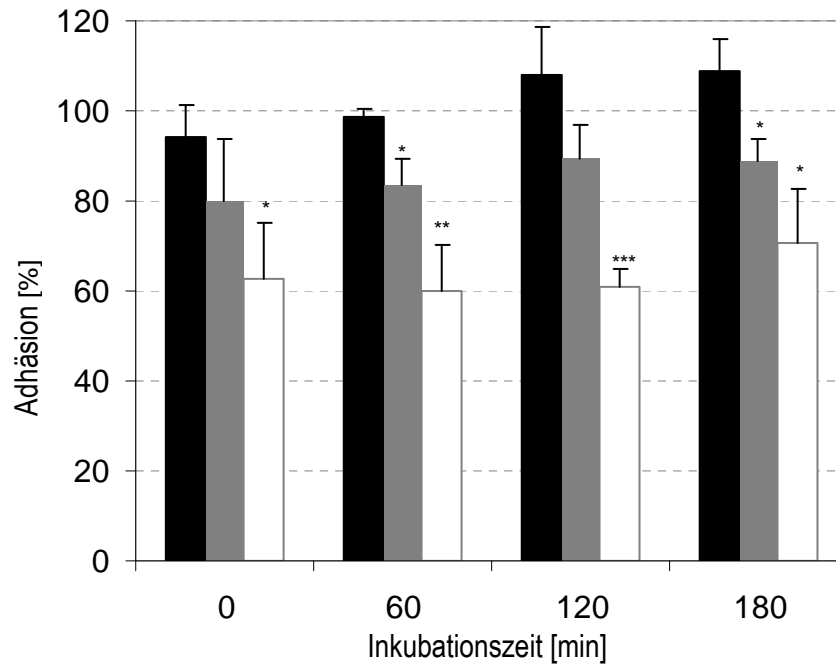


Abbildung 41: Einfluss von Flavan-3-olen auf die Adhäsion von GAS an HEp-2 Zellen

Bakterien wurden 1 h bei 37 °C mit 30 µg/ml der Proben inkubiert. Die Testsubstanz wurde ausgewaschen vor der Koinkubation mit den HEp-2-Zellen. (-)-Epicatechin ■, (-)-Epigallocatechin ■, (-)- Epigallocatechin-3-O-gallat □. (n=3; p < 0,05 =*, p < 0,01 =**, p < 0,001 =***).

4.7. Neuraminidaseinhibitionsassay

Auf Grund der essentiellen Rolle bei Infektionen und des hochkonservierten aktiven Zentrums ist die Neuraminidase besonders für die Entwicklung von selektiven Inhibitoren geeignet.

Virale Neuraminidase

Der Influenzaerreger ist ein kleines umhülltes Virus aus der Familie der Orthomyxoviridae. Das Nucleokapsid ist von einer Lipiddoppelmembran umgeben, in die unter anderem die Proteine Haemagglutinin (HA) und Neuraminidase (NA) eingelagert sind ([Varghese et al. 1992](#)). Nach dem passiven Eindringen des Virus in den respiratorischen Trakt bindet HA an die N-Acetylneuraminsäurereste von Glykolipiden oder Glykoproteinen, die ubiquitär auf der Oberfläche der Epithelzellen des Wirtes vorkommen (Abbildung 42). Dieser Schritt leitet die Endozytose ein. Im Zytosol fusioniert die virale Membran mit dem Endosom, RNA wird freigesetzt und die Replikation von Virusbausteinen kann beginnen.

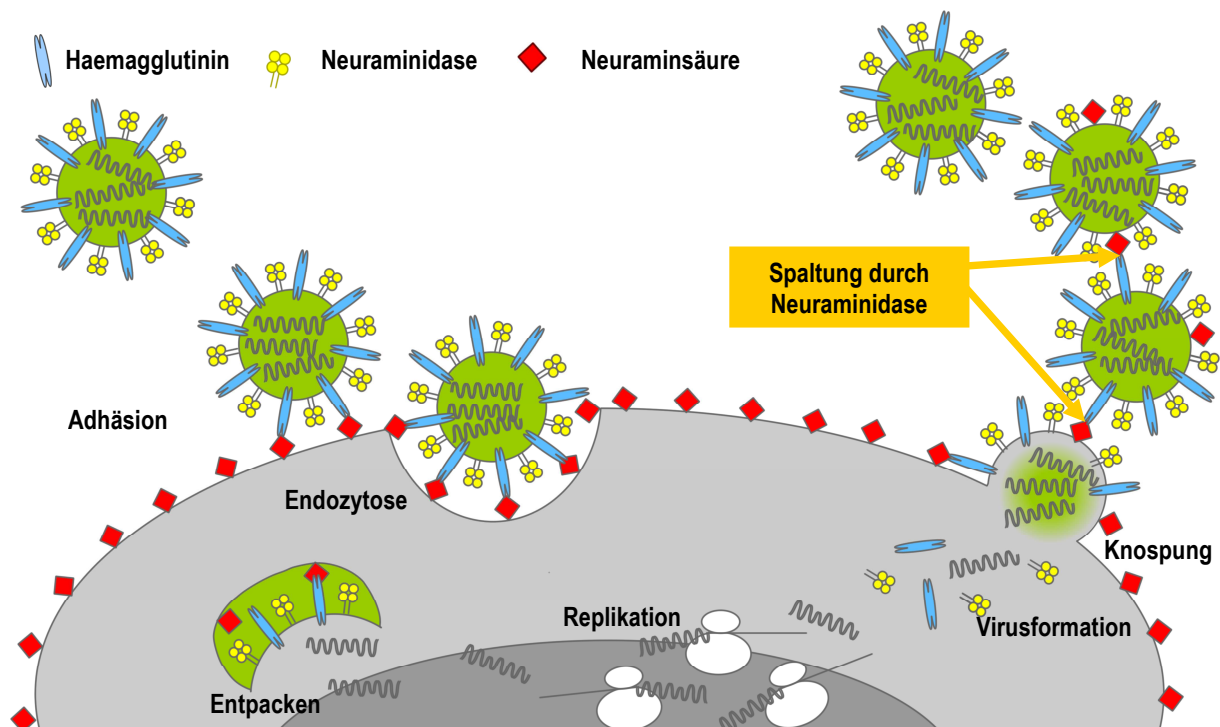


Abbildung 42: Lebenszyklus des Influenzavirus

Die Nucleokapside werden an der apikalen Seite der Zelle zusammengefügt. Dort werden HA und NA in die Wirtszellmembran eingebaut und die Tochterviren durch Knospung freigesetzt. Dabei wird die Zellmembran der Wirtszelle mitsamt ihrer neuraminsäurehaltigen Glykolipide zur neuen Hülle des Virus. HA bindet daher sofort

wieder an die Oberflächenrezeptoren. So entstehen Vernetzungen mit der Wirtszelle als auch der Viren untereinander. NA spaltet die Sialinsäure hydrolytisch von den Oberflächenrezeptoren ab. Die neu replizierten Viren können so endgültig freigesetzt werden.

Wird die Neuraminidase gehemmt, kann der Knospungsvorgang nicht abgeschlossen werden und es kommt zur Präzipitation der Viren untereinander. Derzeit sind zwei Produkte zugelassen, die das Enzym kompetitiv und reversibel hemmen können: Zanamivir (Relenza[®]) und Oseltamivir (Tamiflu[®]) (Abbildung 43). Beide sind Strukturanaloga der 5-Acetylneuraminsäure und weisen eine höhere Affinität zum aktiven Zentrum auf als das natürliche Substrat.

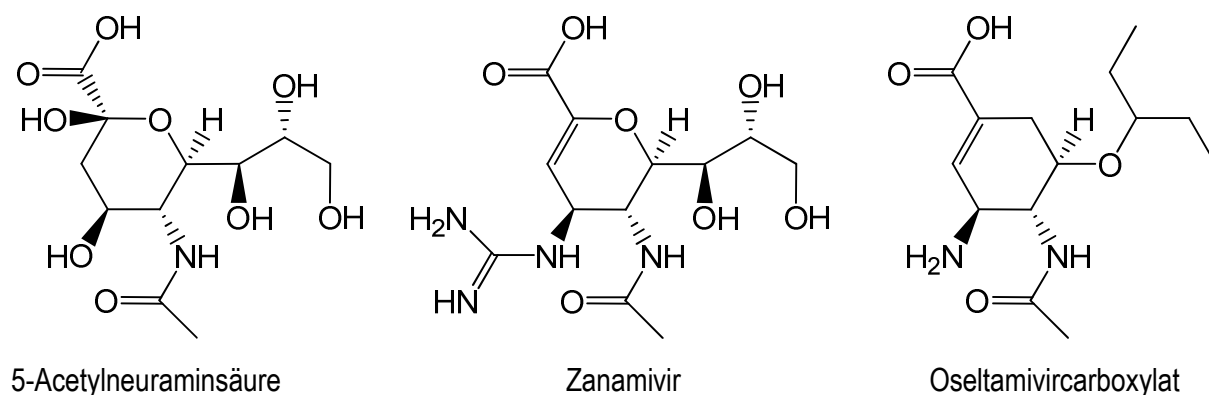


Abbildung 43: Das natürliche Substrat der Neuraminidase, 5-Acetylneuraminsäure und ihre kommerziell erhältlichen Strukturanaloga Zanamivir und Oseltamivircarboxylat

Bakterielle Neuraminidase

Auch der bakteriellen Neuraminidase wird eine wichtige Rolle beim Infektionsvorgang zugeordnet. Das Anheften eines Bakteriums an Epithelien des Wirtsorganismus ist der erste wichtige Schritt der Kolonisation. Die Adhäsion erfordert jedoch spezifische Oberflächenstrukturen, die als Rezeptoren für bakterielle Proteine fungieren. Neben den im Kap. 4.6. beschriebenen Mechanismen wird auch die Bedeutung der Neuraminidase als adhäsionsvermittelndes Enzym diskutiert. Schon seit Langem ist bekannt, dass verschiedene Bakterienstämme calciumabhängige Enzyme exprimieren ([Hayano und Tanaka, 1967](#)), die terminale Sialidinsäure von Glykoproteinen abspalten können. Zum einen kann die so gewonnene Sialidinsäure als Energiequelle genutzt werden, zum anderen scheint dieser Vorgang auch für die Adhäsion von Bedeutung zu sein. Werden Luftröhrenepithelzellen mit Neuraminidase vorbehandelt, und so die terminale Sialinsäure abgespalten, kann die Adhäsionsrate von *Streptococcus pneumoniae* deutlich erhöht werden. Im Gegensatz dazu sind

neuraminidasedefiziente Stämme nur im geringen Umfang fähig, den Nasopharynx zu kolonisieren und darin zu überleben ([Tong et al., 2000](#)). Da die Adhäsion in neuraminidasedefizienten Stämmen jedoch nicht vollständig unterbunden werden kann, wird ein weiterer neuraminidaseunabhängiger Adhäsionsmechanismus vermutet.

Insbesondere im Falle von *Vibrio cholerae* ist der genaue Mechanismus neuraminidasevermittelter Pathogenese bekannt: die Neuraminidase (VCNA) spaltet Sialidinsäurereste von höheren Gangliosiden der Enterozyten ab und demaskiert damit den GM₁-Rezeptor, an den das Cholera-toxin bindet und so seine verheerende Wirkung entfalten kann ([Hinou et al., 2005](#)).

4.7.1. Prinzip

Ziel des Versuchs war die Testung verschiedener Extrakte auf neuraminidaseinhibierende Wirkung. Dazu wurde ein *in vitro* Assay gewählt, bei dem eine aus *Vibrio cholerae* Kulturen gewonnene Neuraminidase (EC 3.2.1.18) mit dem Substrat 2'-(4-Methylumbelliferyl)- α -D-N-acetylneuraminsäure (MUNANA) inkubiert wird. Dabei wird MUNANA hydrolytisch gespalten und es entsteht das fluoreszierende Endprodukt 7-Hydroxy-4-methylcumarin, das photometrisch bei 465 nm erfasst werden kann (Abbildung 44). Die Herabsetzung der Reaktionsgeschwindigkeit kann als Maß für die kompetitive Hemmung des Enzyms herangezogen werden ([Wetherall et al., 2003](#)).

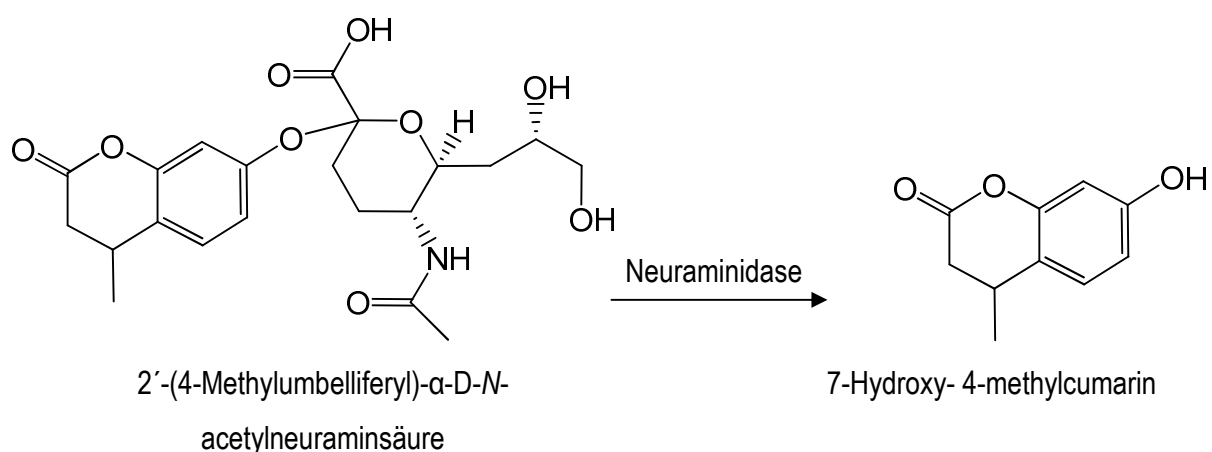


Abbildung 44: Bildung des Fluorochroms

4.7.2. Zanamivir und Oseltamivir

Die beiden kommerziell erhältlichen Strukturanaloga der Sialidinsäure, Oseltamivircarboxylat (wirksames Metabolit des Prodrugs Oseltamivir in Tamiflu®) und Zanamivir (Relenza®) (Abbildung 43), zeigten im vorliegenden Assay eine gute inhibierende Aktivität. Dabei war Zanamivir mit einem IC_{50} -Wert von 54,2 μ M (18 μ g/ml) deutlich wirksamer als Oseltamivircarboxylat mit einem IC_{50} -Wert von 171,9 μ M (53,7 μ g/ml) (Abbildung 45).

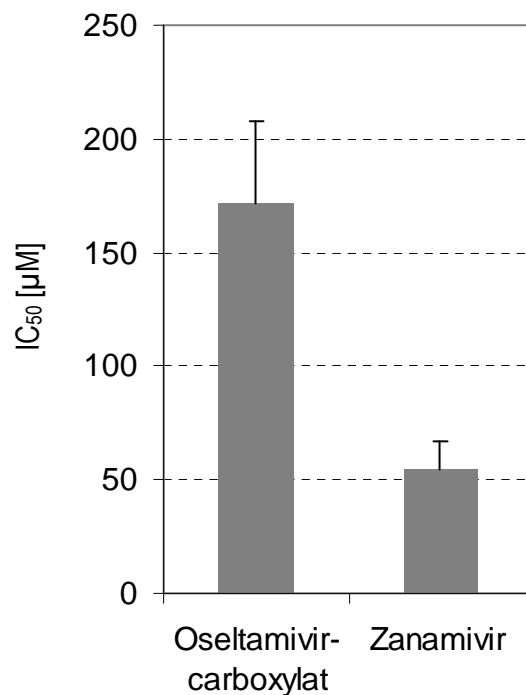


Abbildung 45: IC_{50} -Werte von Oseltamivir und Zanamivir [μ M]

4.7.3. Neuraminidasehemmende Wirkung von EPs[®] 7630

Der Spezialextrakt EPs[®] 7630, die methanolunlösliche (MIP) und die methanollösliche (MSP) Fraktion sind im Vergleich zu den genannten Positivkontrollen sehr starke Neuraminidaseinhibitoren mit IC₅₀-Werten von 1,25 µg/ml, 1,42 µg/ml bzw. 1,39 µg/ml (Abbildung 46). Interessanterweise ist die Dimerenfraktion mit einem IC₅₀-Wert von 46,9 µg/ml relativ inaktiv (Daten nicht gezeigt). Mit der Entfernung der Polyphenole mittels Hautpulverbehandlung (Kap. 3.2.1) ging auch die Enzym inhibierende Aktivität der Extrakte verloren: bis in Konzentrationen von 1000 µg/ml war keine Neuraminidase hemmende Wirkung für EPS HP, MIP HP und MSP HP nachweisbar.

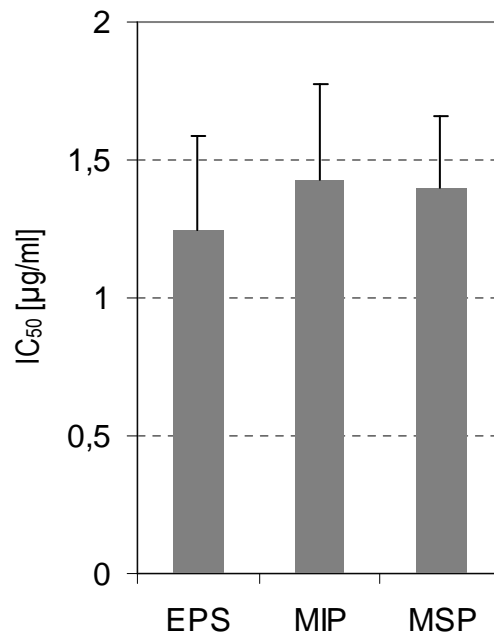


Abbildung 46: IC₅₀-Werte von EPs[®] 7630 [µg/ml]

4.7.4. Neuraminidaseinhibition durch weitere Gerbstoffextrakte

Die polyphenolhaltigen Extrakte aus Weidenrinde, Birkenrinde und Neliablättern zeigten im Vergleich zu Zanamivir (18 µg/ml) eine markante Neuraminidase hemmende Aktivität, was sich in den niedrigen IC₅₀-Werten von 3,5, 7,8 und 8,2 µg/ml widerspiegelte (Abbildung 47). Lediglich die Gerbstofffraktion aus Weißdornfrüchten wies mit einem IC₅₀-Wert von 29,4 µg/ml eine moderate Wirkung auf, war damit aber immer noch effektiver als Oseltamivircarboxylat (53,7 µg/ml).

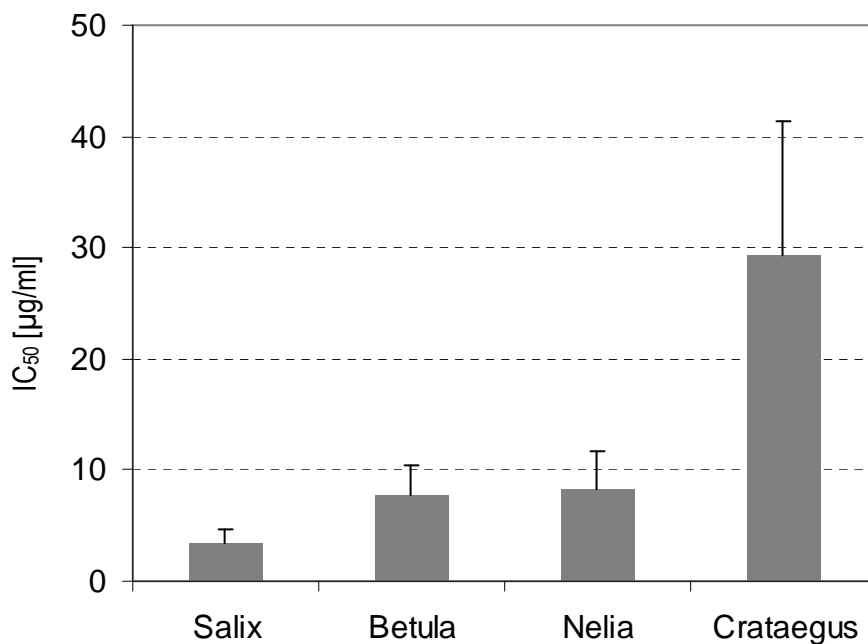


Abbildung 47: IC₅₀-Werte der Polyphenolextrakte [µg/ml]

Die Extrakte aus *Vaccinium macrocarpon* AIT., *Ginkgo biloba* L. sowie *Echinacea purpurea* (L.) MOENCH. erwiesen sich bis in Konzentrationen von 1000 µg/ml als inaktiv.

4.7.5. Neuraminidaseinhibition durch Flavan-3-ole

Catechin und Epicatechin mit einer *ortho*-Dihydroxylierung am Ring B zeigten eine vergleichbare, wenn auch sehr schwache Aktivität mit IC_{50} -Werten von 1048 bzw. 1067 μM (Abbildung 48). Das B-Ring trihydroxylierte Epigallocatechin (EGC) war unerwartet schwächer aktiv (IC_{50} -Wert 1426 μM). Dagegen zeigte Epicatechin-3-O-gallat (ECG) eine deutlich stärkere inhibierende Wirkung (IC_{50} -Wert 298 μM), was offensichtlich auf die Anwesenheit des Gallussäurerestes zurückzuführen ist. Diese Vermutung wird durch die ausgeprägte neuraminidasehemmende Aktivität von Epigallocatechin-3-O-gallat (EGCG) mit einem IC_{50} -Wert von 37 μM untermauert. Interessanter Weise ist die Aktivität von EGCG in diesem *in vitro* Assay stärker als die der Dimerenfraktion und insbesondere auch der von Zanamivir. Die neuraminidaseinhibierende Aktivität der monomeren Flavan-3-ole wird offensichtlich durch das Vorhandensein eines Gallussäurerestes bestimmt.

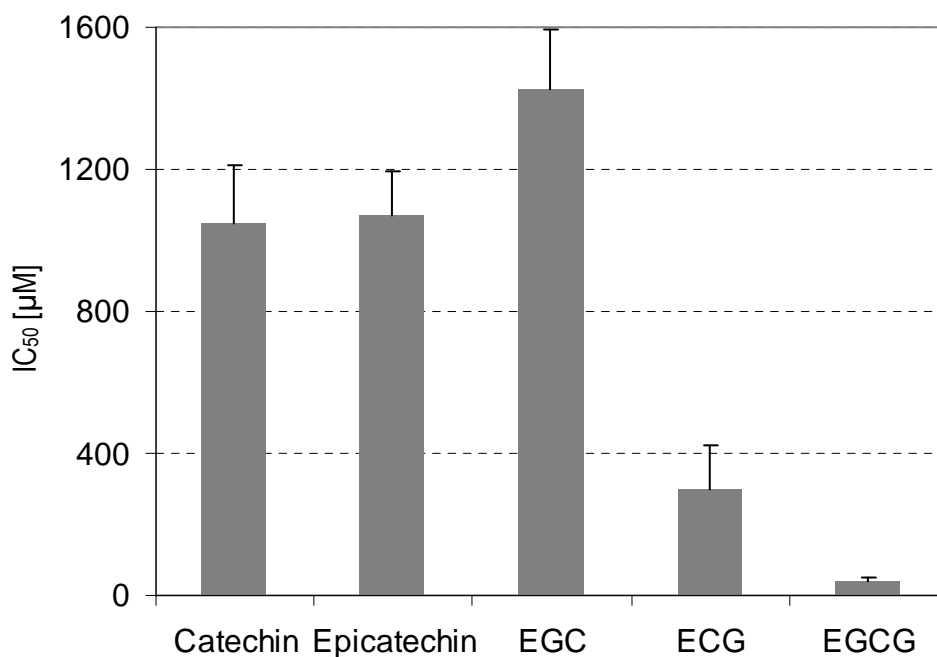


Abbildung 48: IC_{50} -Werte von Flavan-3-olen [μM]

4.8. Leishmanieninfektionsmodell

Leishmanien, Protozoen aus der Familie Trypanosomatidae, sind in tropischen und subtropischen Regionen weit verbreitete Erreger. Die Flagellaten werden im Laufe ihres biphasischen Lebenszyklus von Insekten auf Wirbeltiere und auf den Menschen übertragen. Die Manifestation der Erkrankung kann verschiedene Formen annehmen und reicht von einer selbstlimitierenden Infektion der Haut über ausgedehnte Läsionen bis zu einer tödlich verlaufenden Ausprägungsform durch Befall von inneren Organen. Je nach der verursachenden Leishmanien-Spezies ist ein viszeraler, kutaner oder mucokutaner Verlauf möglich ([Kubba und Al-Gindan, 1989](#)).

Im Blut des Vertebraten werden die Leishmanien von Makrophagen in eine Vakuole aufgenommen und gehen intrazellulär eine morphologische Transformation vom begeißelten, promastigoten Stadium in die amastigote Form über. Die Erreger sind in der Lage, das normale Abwehrverhalten des Makrophagen (Bildung von reaktiven Sauerstoffspezies) so zu manipulieren, dass sie sich intrazellulär vermehren können und vor einer Immunantwort teilweise geschützt sind ([Handman und Bullen, 2002](#); [Basu und Ray, 2005](#)). Die Makrophagen präsentieren jedoch auf ihrer Oberfläche Leishmanien-Antigene, die T_H1-Zellen zur Sezernierung von IFN- γ anregen. Dieses wiederum induziert in den Makrophagen die Expression der iNOS und damit auch die Bildung von NO und nachfolgend von weiteren mikrobiziden Effektormolekülen. Die reaktiven Stickstoffspezies tragen wesentlich zur Abtötung der intrazellulären Erreger bei.

Die im Rahmen dieser Arbeit zu testenden Extrakte (EPs[®] 7630 und Subfraktionen) sowie einige phenolische Einzelsubstanzen haben in früheren PCR-basierten Untersuchungen Hinweise auf eine immunstimulierende Wirkung gezeigt ([Trun et al., 2004](#)). Dabei wurde eine verstärkte Genexpression von IL-1, IL-12, IL-18, TNF- α und der iNOS in infizierten Makrophagen nach Inkubation mit EPs[®] 7630 und bestimmten Subfraktionen festgestellt und die Polyphenolfraktion als ein wesentliches Wirkprinzip ausgemacht. Des Weiteren zeigten [Thäle et al.](#) (2010) im Leishmanieninfektionsmodell, dass eine EPs[®] 7630-Stimulation tatsächlich eine Eliminierung der intrazellulären Erreger bewirkte.

Um einen genaueren Einblick in die Natur der immunmodulierenden Polyphenole zu erhalten, soll im Folgenden durch vergleichende Studien mit ausgewählten hochgereinigten Proanthocyanidinfraktionen und phenolischen Reinsubstanzen untersucht werden, welche Strukturvoraussetzungen für eine erfolgreiche Aktivierung von zytotoxischen Abwehrmechanismen in Makrophagen entscheidend sind.

4.8.1. Prinzip

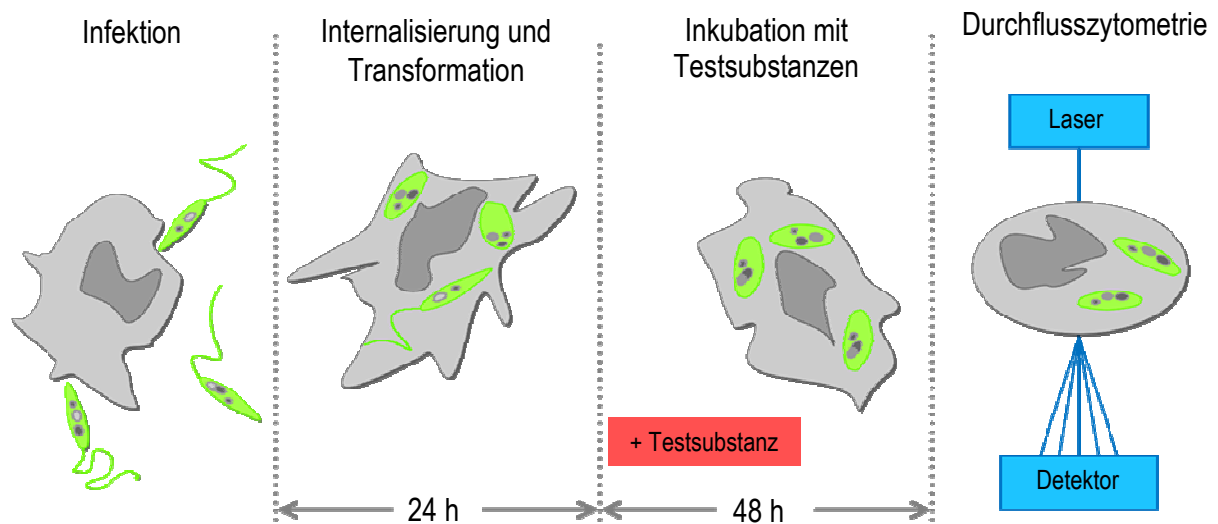


Abbildung 49: Versuchsaufbau des Leishmanieninfektionsmodells

Hierzu wurde ein FACS-basiertes Modell herangezogen, bei dem murine Knochenmarksmakrophagen mit Leishmanien (*L. major* GFP) infiziert werden (Abbildung 49). Der Erreger trägt das Gen für das grün fluoreszierende Protein (gfp), welches ursprünglich aus der im Pazifik vorkommenden Quallenart *Aequorea victoria* stammt. Das GFP-Protein besteht aus 238 Aminosäuren und emittiert nach Anregung mit einer Wellenlänge von 395 nm im grünen Bereich bei 506 nm ([Prasher et al. 1992](#)). Da die Leishmanien das Chromophor kontinuierlich exprimieren, sind diese auch innerhalb der Makrophagen gut durchflusszytometrisch detektierbar. Makrophagen und Erreger wurden im Verhältnis 1:8 (10^6 Makrophagen: $8 \cdot 10^6$ Leishmanien) über einen Zeitraum von 24 h inkubiert. Während dieser Inkubationsdauer kommt es zur Infektion der Zellen und Umwandlung des Erregers von der promastigoten in die amastigote Form. Nachfolgend wurden $30 \mu\text{g/ml}$ der Testsubstanzen zugegeben, welche entweder direkt toxisch auf die intrazellulären Leishmanien wirken oder aber die Aktivierung von zytotoxischen Abwehrsystemen in den Wirtszellen induzieren. Aktivierte Makrophagen produzieren eine Reihe

toxischer Metabolite wie $\cdot\text{NO}$ oder ROS, welche den Erreger idealer Weise abtöten. Die grüne Fluoreszenz der ursprünglich vitalen Leishmanien geht dabei verloren ([Kram et al. 2008](#)). Die Verringerung der Erregerlast wurde nach einer Inkubationsdauer von 48 h über die Reduktion des GFP-Signales durchflusszytometrisch bestimmt.

Der Anteil toter Makrophagen wurde simultan durch Zugabe von PI festgestellt und spiegelt die zytotoxische Potenz der Testsubstanz für die Wirtszellen wider. PI besitzt eine hohe Affinität zur DNA, kann allerdings eine intakte Zellmembran auf Grund seiner Ladung nicht passieren (Abbildung 50). Ist die Membranintegrität gestört, was gleichgesetzt werden kann mit dem Tod der Zelle, kann PI in den Zellkern gelangen und zwischen die Basen der DNA interkalieren. Dies geht mit einer Erhöhung der roten Fluoreszenzintensität der betroffenen Zellen einher. Nach Anregung mit Licht der Wellenlänge 488 nm fluoreszieren PI-positive Zellen bei 620 nm.

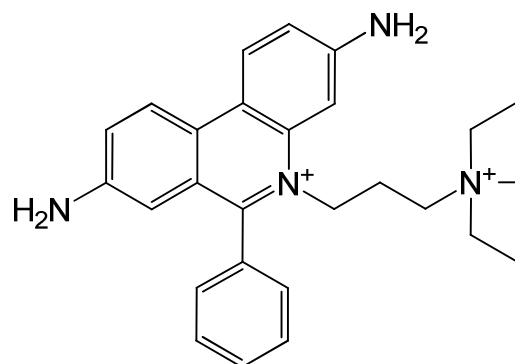


Abbildung 50: Struktur von Propidiumiodid (PI)

Um eine erfolgreiche Makrophagenaktivierung nachzuweisen, wurde im Überstand der Zellkulturen zum einen mittels ELISA die sezernierte Menge von TNF- α und IL-12 quantifiziert und zum anderen mittels Griess Assay auf eine erhöhte $\cdot\text{NO}$ -Bildung untersucht. Während $\cdot\text{NO}$ als mikrobizides Effektormolekül fungiert, regen die proinflammatorischen Zytokine TNF- α und IL-12 die T_H -Zell vermittelte Immunantwort an. Die Anwesenheit dieser Faktoren im Zellkulturüberstand sind somit deutliche Belege für eine immunstimulierende Wirkung.

4.8.2. Kontrollen

Als Negativkontrolle dienten infizierte Makrophagen, welche lediglich mit dem Lösungsmittel DMSO in einer Endkonzentration von 0,3% inkubiert wurden (entspricht derselben Konzentration wie bei den Proben). Der Anteil infizierter Makrophagen nach 48 h Inkubationsdauer betrug im Durchschnitt 37%. Der Wert der Negativkontrolle wurde gleich 100% gesetzt und die Infektionsraten der behandelten Proben relativ dazu berechnet. Für die Positivkontrolle wurden die Makrophagen mit 100 U/ml rIFN- γ und 10 ng/ml LPS behandelt. Diese Kombination simuliert eine bakterielle Infektion, aktiviert eine Immunantwort der Wirtszelle und führt zum Abtöten der intrazellulären Erreger. Dies ist deutlich an der signifikanten Reduktion der Anzahl infizierter Makrophagen von 100% auf ca. 24% zu erkennen (Abbildung 51A). Bei der unbehandelten Negativkontrolle liegt der Anteil PI-positiver Zellen bei 7%. Die Positivkontrolle hat mit 11% einen etwas höheren Anteil an toten Zellen (Abbildung 51B).

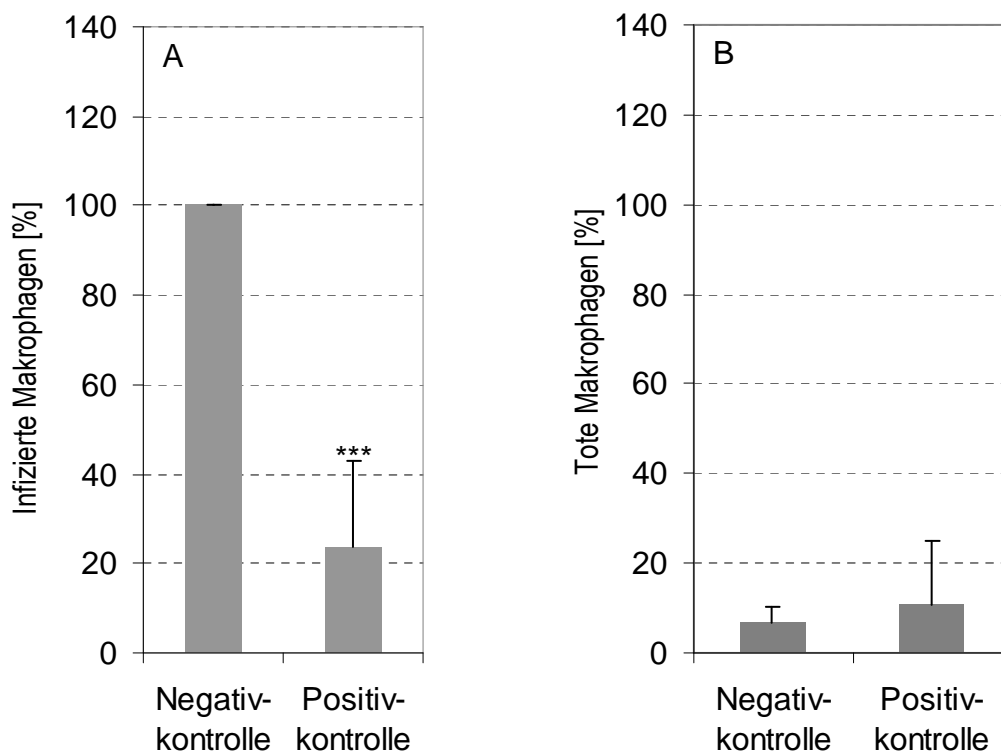


Abbildung 51: Aktivierung von antileishmaniellen Abwehrmechanismen in infizierten Makrophagen

Murine Knochenmarksmakrophagen wurden mit Leishmanien über 24 h infiziert und für weitere 48 h mit der Testsubstanz behandelt. Danach wurde die Infektionsrate durchflusszytometrisch bestimmt und relativ zur Rate infizierter, unbehandelter Makrophagen (100%) gesetzt. Als Positivkontrolle dienten infizierte Makrophagen, behandelt mit 100 U/ml rIFN- γ und 10 ng/ml LPS. In Abb. A ist der Anteil infizierter Makrophagen, in Abb. B der Anteil toter Makrophagen gezeigt. Dargestellt sind die Mittelwerte \pm Standardabweichung aus mindestens drei unabhängigen Versuchen ($p < 0,05 = *$, $p < 0,01 = **$, $p < 0,001 = ***$).

4.8.3. Aktivierung von Makrophagen durch EPs[®] 7630 und Subfraktionen

EPs[®] 7630 und polyphenolhaltige Subfraktionen

Nach 48 h Inkubation der mit *L. major gfp* infizierten Makrophagen mit EPs[®] 7630 wurde eine signifikante Reduktion der Infektionsrate um 48% beobachtet. Ein ähnlich starkes antileishmaniellles Potential hatte die methanolunlösliche Fraktion (MIP) mit 47%. Diese Fraktion besteht nach dünn-schichtchromatographischen Untersuchungen (Kap. 4.1.2) überwiegend aus hochmolekularen Proanthocyanidinen. Dagegen erwies sich die methanollösliche Fraktion (MSP) als inaktiv (Abbildung 52A). Letztere besteht aus oligomeren Proanthocyanidinen mit bis zu ca. vier Flavan-3-ol Grundbausteinen und einfachen Phenolen. Für die Aktivierung der Makrophagen ist demnach eine Kettenlänge von ca. vier monomeren Bausteinen notwendig. Die Extrakte zeigten keinen zytotoxischen Effekt gegenüber den Makrophagen. Der Anteil PI-positiver Zellen lag unter 10%, (Abbildung 52B), was im Bereich der Negativkontrolle angesiedelt ist (Abbildung 51B)

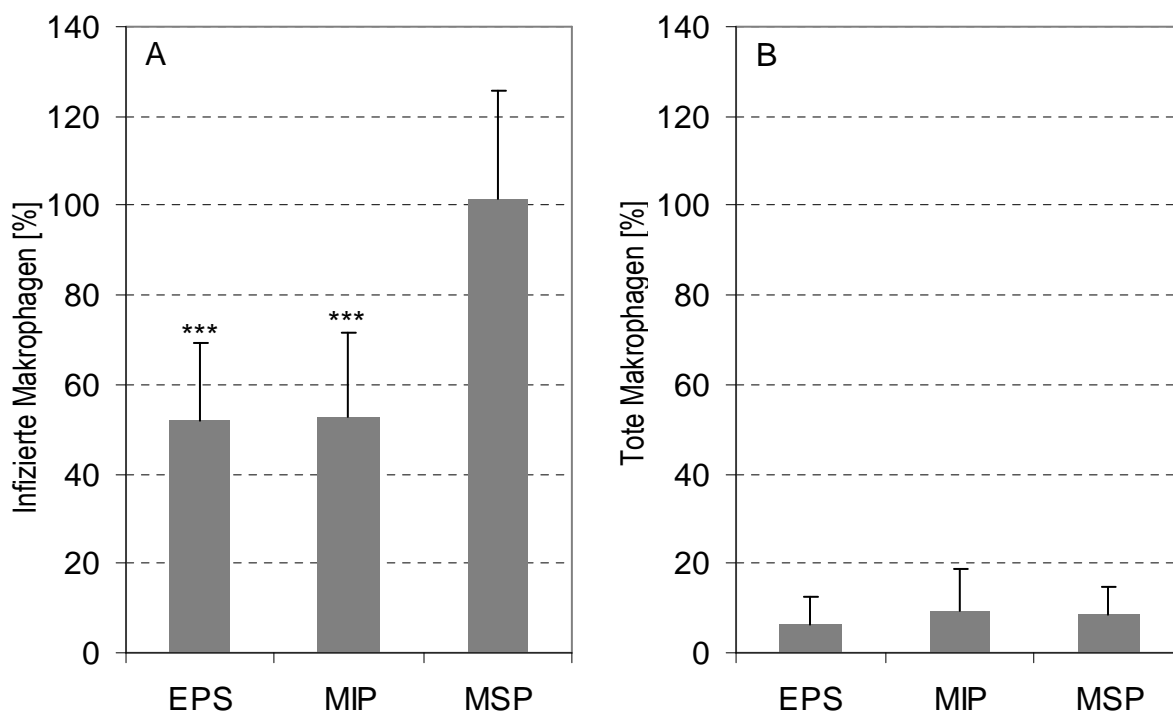


Abbildung 52: Aktivierung von antileishmaniellen Abwehrmechanismen in Makrophagen nach Inkubation mit EPs[®] 7630, methanolunlöslicher Fraktion (MIP) und methanollöslicher Fraktion (MSP) im FACS-basierten Assay

BMMΦ wurden mit Leishmanien über 24 h infiziert und für weitere 48 h mit 30 µg/ml der Testsubstanz behandelt. Danach wurde die Infektionsrate durchflusszytometrisch bestimmt und relativ zur Rate infizierter, unbehandelter Makrophagen (100%) gesetzt. In Abb. A ist der Anteil infizierter, gfp-positiver Makrophagen, in Abb. B der Anteil toter, PI-positiver Makrophagen gezeigt. Dargestellt sind die Mittelwerte ± Standardabweichung aus mindestens drei unabhängigen Versuchen ($p < 0,05 = *$, $p < 0,01 = **$, $p < 0,001 = ***$).

Abhängigkeit der leishmaniziden Wirkung von der NO -Bildung

Um sicher zu stellen, ob die leishmanizide Wirkung von EPs[®] 7630 auf einem direkten toxischen Effekt gegen intrazelluläre Leishmanien beruht oder ob es sich viel mehr um eine Aktivierung der Makrophagen zur Bildung von NO handelt (und damit einer indirekten Abtötung der Erreger), wurde eine Koinkubation mit dem selektiven iNOS-Hemmer L-NMMA und EPs[®] 7630 durchgeführt. Durch Zugabe dieses kompetitiven Inhibitors wird die NO -Bildung verhindert und eine Abtötung der Leishmanien findet trotz erfolgter Aktivierung nicht statt (Abbildung 53). Die NO -Bildung ging dabei von 50 μM auf 23 μM zurück (bei Behandlung mit 500 μM L-NMMA). Gleichzeitig stieg die Infektionsrate von 40% auf das Normalniveau von unbehandelten Makrophagen an. Dieser Effekt war auch bei Stimulierung mit EPs[®] 7630 zu beobachten. Die aktivierten Makrophagen waren nach Zugabe von L-NMMA nicht mehr in der Lage die Erregerlast im selben Ausmaß zu reduzieren, wie nach Behandlung mit EPs[®] 7630 allein. Die Bildung von NO wurde drastisch von 36 μM auf 10 μM reduziert während die Infektionsrate von 31% auf 92% stieg. Die aktivierende Wirkung von EPs[®] 7630 führt demnach letztlich zur Bildung von NO .

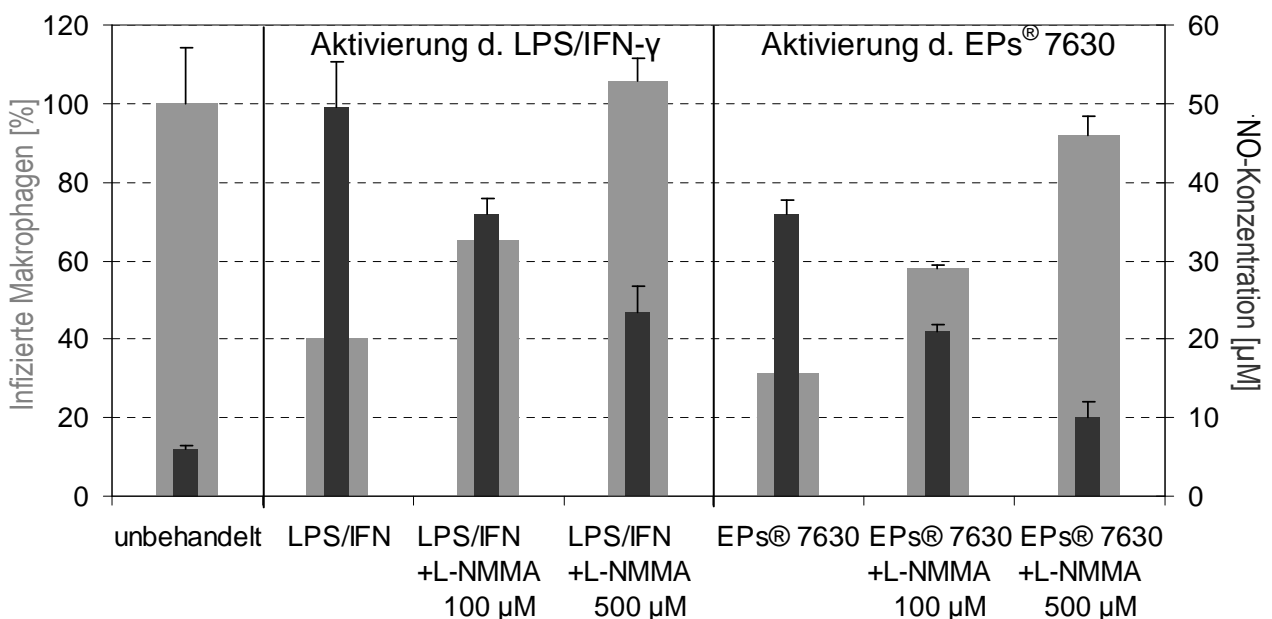


Abbildung 53: Aktivierung von antileishmaniellen Abwehrmechanismen in Makrophagen nach Inkubation mit EPs[®] 7630 bzw. Koinkubation mit L-NMMA im FACS-basierten Assay

BMM Φ wurden mit Leishmanien über 24 h infiziert und für weitere 48 h mit 30 $\mu\text{g}/\text{ml}$ der Testsubstanz behandelt. Danach wurde die Infektionsrate durchflusszytometrisch bestimmt und relativ zur Rate infizierter, unbehandelter Makrophagen (100%) gesetzt. ■ infizierte, gfp-positive Makrophagen, ■ NO -Konzentration [μM]. Dargestellt sind die Mittelwerte \pm Standardabweichung aus mindestens drei unabhängigen Versuchen ($p < 0,05 = *$, $p < 0,01 = **$, $p < 0,001 = ***$).

Polyphenolfreie Fraktionen und weitere EPs[®] 7630-Inhaltsstoffe

Nach Entfernung der Polyphenole mittels Hautpulver zeigte EPs[®] 7630 ein sehr schwaches Aktivierungspotential für infizierte Makrophagen was sich in einer hohen Infektionsrate von ca. 91% widerspiegelte. Für die beiden Unterfraktionen MIP und MSP wurde sogar eine höhere Infektionsrate (109% und 117%) als für die Kontrolle beobachtet. Dieses Ergebnis unterstreicht die Aussage, dass die in EPs[®] 7630 enthaltenen oligo- und polymeren Proanthocyanidine die entscheidenden antiinfektiven Substanzen in diesem Testmodell sind (Abbildung 54A).

Die Zytotoxizität der gerbstofffreien Extrakte gegenüber Makrophagen war leicht erhöht im Vergleich zu den polyphenolhaltigen Proben. So waren nach Inkubation mit hautpulverbehandeltem EPs[®] 7630 bereits 20% der Zellen tot. Beim gerbstoffhaltigem Extrakt waren es dagegen lediglich 6%. Der Grund könnte in der Anreicherung von toxischen Substanzen liegen (Abbildung 54B).

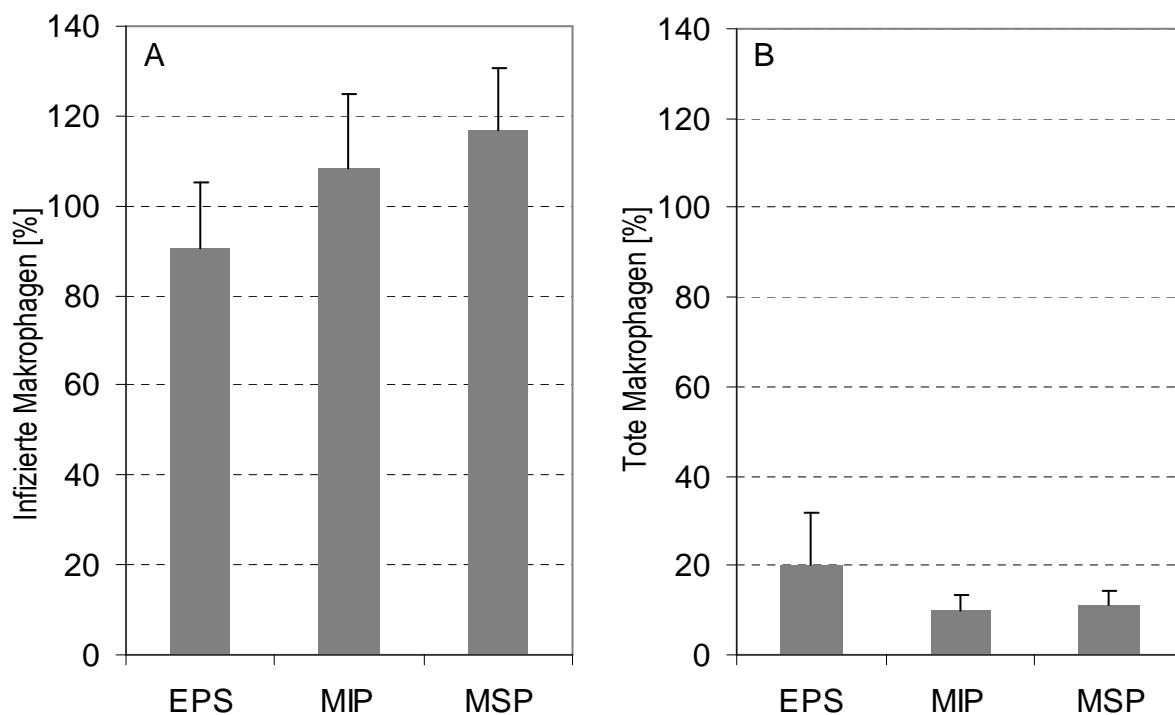


Abbildung 54: Aktivierung von antileishmaniellen Abwehrmechanismen in Makrophagen durch polyphenolfreie Zubereitungen aus EPs[®] 7630, methanolunlöslicher Fraktion (MIP) und methanollöslicher Fraktion (MSP) im FACS-basierten Assay

BMMΦ wurden mit Leishmanien über 24 h infiziert und für weitere 48 h mit 30 µg/ml der Testsubstanz behandelt. Danach wurde die Infektionsrate durchflusszytometrisch bestimmt und relativ zur Rate infizierter, unbehandelter Makrophagen (100%) gesetzt. In Abb. A ist der Anteil infizierter, gfp-positiver Makrophagen, in Abb. B der Anteil toter, PI-positiver Makrophagen gezeigt. Dargestellt sind die Mittelwerte ± Standardabweichung aus mindestens drei unabhängigen Versuchen ($p < 0,05 = *$, $p < 0,01 = **$, $p < 0,001 = ***$).

Bei Inkubation mit einer Dimerenfraktion (Kap. 3.2. und 4.4.3), welche überwiegend aus (Epi-)Gallocatechinbausteinen aufgebaut ist, lag die Infektionsrate bei ca. 116% und damit höher als beim Gesamtextrakt mit oligomeren und polymeren Proanthocyanidinen. Dieses Ergebnis bekräftigt, dass eine Mindestkettenlänge für die Aktivierung von Makrophagen erforderlich ist und dass weniger das Hydroxylierungsmuster einen entscheidenden antiinfektiven Parameter in diesem Testmodell darstellt. Des Weiteren wurde das in *P. sidoides* quantitativ dominierende Cumarin Umckalin getestet ([Kayser und Kolodziej, 1995](#)). Dieses hatte keinen Effekt auf die Infektionsrate (Abbildung 55A), was auch für andere Cumarine zutreffen dürfte. Dies deckt sich mit früheren Untersuchungen ([Kayser et al. 2001](#)), in denen Umckalin sowie drei weitere Vertreter der Cumarine aus *P. sidoides*, 6-Hydroxy-7-methoxycumarin, 5,6,7-Trimethoxycumarin und 6,8-Dihydroxy-5,7-dimethoxycumarin, in Konzentrationen bis zu 25 µg/ml keinen Effekt gegen intrazelluläre Leishmanien zeigten. Keine der Testsubstanzen zeigte einen toxischen Effekt auf die Wirtszellen in der verwendeten Konzentration von 30 µg/ml (Abbildung 55B).

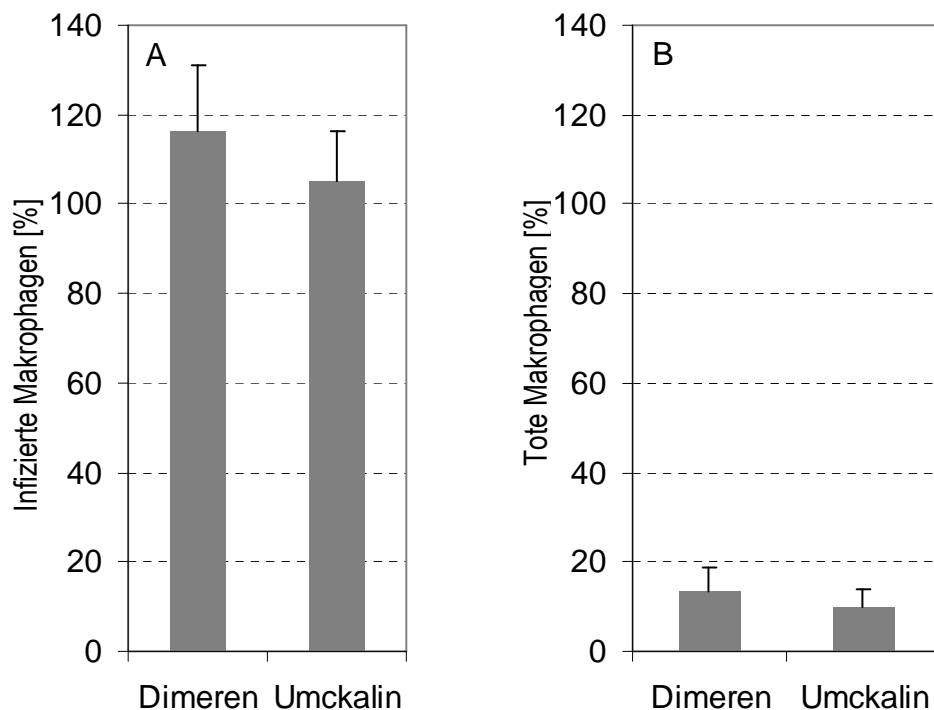


Abbildung 55: Aktivierung von antileishmaniellen Abwehrmechanismen in infizierten Makrophagen durch eine Dimerenfraktion aus EPs® 7630 und Umckalin

BMMΦ wurden mit Leishmanien über 24 h infiziert und für weitere 48 h mit 30 µg/ml der Testsubstanzen behandelt. Danach wurde die Infektionsrate durchflusszytometrisch bestimmt und relativ zur Rate infizierter, unbehandelter Makrophagen (100%) gesetzt. In Abb. A ist der Anteil infizierter, gfp-positiver Makrophagen, in Abb. B der Anteil toter, PI-positiver Makrophagen gezeigt. Dargestellt sind die Mittelwerte ± Standardabweichung aus mindestens drei unabhängigen Versuchen ($p < 0,05 = *$, $p < 0,01 = **$, $p < 0,001 = ***$).

4.8.4. Aktivierung von Makrophagen durch Procyanidine

Inwieweit die Art der Flavan-3-ol Bausteine von Procyanidinen die immunstimulierende Wirkung beeinflusst, wurde in Analogie zur Testung auf antiadhäsive Eigenschaften (Kap. 4.6) mit hoch aufgereinigten Proanthocyanidinextrakten untersucht. Infizierte Makrophagen, behandelt mit Extrakten aus der Birkenrinde (Oligomere aus Catechin- und Epicatechineinheiten) sowie aus Blättern von *Nelia meyeri* SCHWANT. (Oligomere ausschließlich aus Epicatechineinheiten) erwiesen sich als inaktiv. Im Gegensatz, die Leishmanienlast war im Vergleich zur Kontrolle signifikant erhöht (118% bzw. 120%). Lediglich der Salix-Extrakt, bestehend aus oligomeren Procyanidinen mit Catechin als Flavan-3-oleinheiten, konnte die Leishmanienlast um 20% reduzieren, allerdings nicht signifikant. Auch ein Extrakt aus Weißdornfrüchten (Procyanidine aus Epicatechinbausteinen und einem geringen Anteil an Catechineinheiten) war antileishmaniell inaktiv. Dies legt den Schluss nahe, dass eine 2,3-*trans* Konfiguration in Procyanidinmolekülen vom B-Typ ein wesentliches Strukturmerkmal für die Aktivität ist.

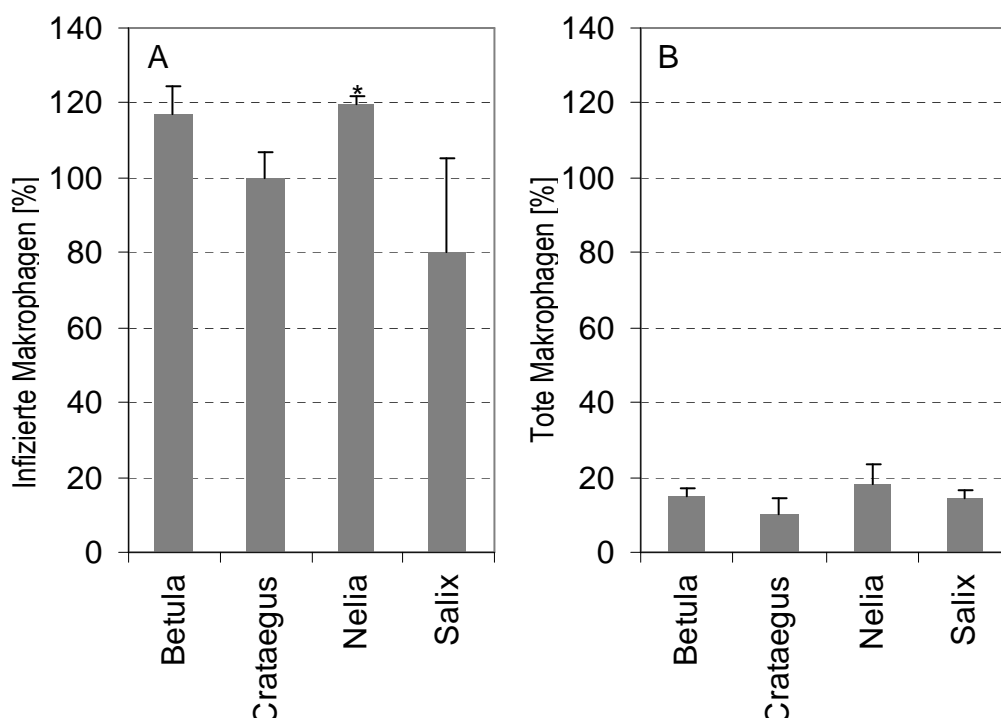


Abbildung 56: Aktivierung von antileishmaniellen Abwehrmechanismen in infizierten Makrophagen durch Procyanidine mit unterschiedlicher Verteilung von Catechin- und Epicatechinbausteinen.

BMM ϕ wurden mit Leishmanien über 24 h infiziert und für weitere 48 h mit 30 μ g/ml der Testsubstanz behandelt. Danach wurde die Infektionsrate durchflusszytometrisch bestimmt und relativ zur Rate infizierter, un behandelter Makrophagen (100%) gesetzt. In Abb. A ist der Anteil infizierter, gfp-positiver Makrophagen, in Abb. B der Anteil toter, PI-positiver Makrophagen gezeigt. Dargestellt sind die Mittelwerte \pm Standardabweichung aus mindestens drei unabhängigen Versuchen ($p < 0,05 = *$, $p < 0,01 = **$, $p < 0,001 = ***$).

4.8.5. Aktivierung von Makrophagen durch Extrakte aus *Ginkgo biloba*, *Vaccinium macrocarpon* und *Echinacea purpurea*

Das Acetoneluat des prodelphinidinhaltigen Spezialextraktes EGb761 (*Ginkgo biloba* L.) bewirkte keine Reduktion der Erregerlast. Dagegen war die Intensität des GFP-Signales nach Behandlung von infizierten Makrophagen mit einem Methanoleluat um ca. 25% reduziert. Der untersuchte wässrige Cranberryextrakt (*Vaccinium macrocarpon* AIT.) und ein *Echinacea purpurea* L. Presssaft inhibierten nicht das Wachstum der Leishmanien (Abbildung 57).

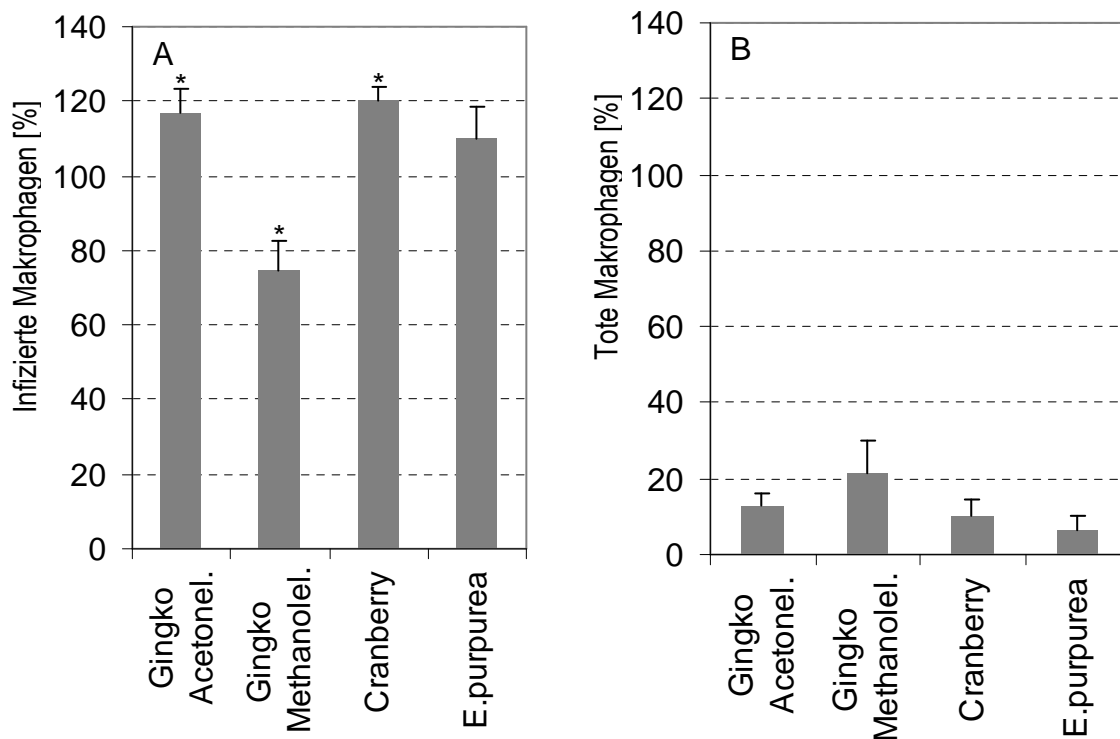


Abbildung 57: Aktivierung von antileishmaniellen Abwehrmechanismen in Makrophagen durch das Acetoneluat und Methanoleluat aus EGb761, Cranberryextrakt und einen *E. purpurea* Presssaft im FACS-basierten Assay

BMM Φ wurden mit Leishmanien über 24 h infiziert und für weitere 48 h mit 30 $\mu\text{g/ml}$ der Testsubstanz behandelt. Danach wurde die Infektionsrate durchflusszytometrisch bestimmt und relativ zur Rate infizierter, unbehandelter Makrophagen (100%) gesetzt. In Abb. A ist der Anteil infizierter, gfp-positiver Makrophagen, in Abb. B der Anteil toter, PI-positiver Makrophagen gezeigt. Dargestellt sind die Mittelwerte \pm Standardabweichung aus mindestens drei unabhängigen Versuchen ($p < 0,05 = *$, $p < 0,01 = **$, $p < 0,001 = ***$).

4.8.6. Aktivierung von Makrophagen durch Quercetin und Quercetinglykoside

Infizierte Makrophagen wurden mit 30 µg/ml des Flavonols Quercetin inkubiert. Außerdem wurde das Aktivierungspotential der Glykoside Quercitrin und Rutosid untersucht. Keine der Testsubstanzen hatte einen signifikanten Einfluss auf die Infektionsrate (Abbildung 58A) oder auf die Anzahl von toten Wirtszellen (Abbildung 58B). Dieses Ergebnis deckt sich mit Arbeiten, in denen Quercetin sowie Quercetinglykoside als Inhibitoren der iNO-Bildung beschrieben wurden ([Mu et al., 2001](#), [Comalada et al., 2006](#); [Wadsworth et al., 2001](#)). Außerdem wurde beobachtet, dass Quercetin die Bildung der iNOS sowie von proinflammatorischen Zytokinen, wie TNF- α , inhibiert ([Qureshi et al. 2011](#)).

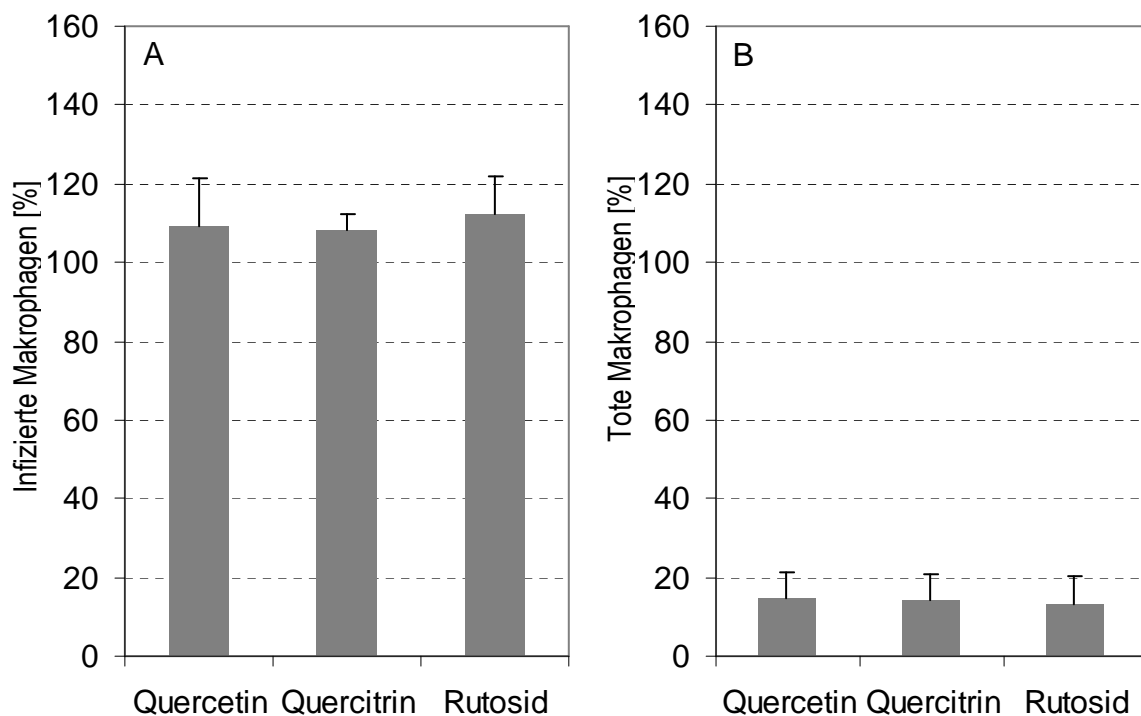


Abbildung 58: Aktivierung von antileishmaniellen Abwehrmechanismen in Makrophagen durch Quercetin und Quercetinglykoside im FACS-basierten Assay

BMM Φ wurden mit Leishmanien über 24 h infiziert und für weitere 48 h mit 30 µg/ml der Testsubstanz behandelt. Danach wurde die Infektionsrate durchflusszytometrisch bestimmt und relativ zur Rate infizierter, unbehandelter Makrophagen (100%) gesetzt. In Abb. A ist der Anteil infizierter, gfp-positiver Makrophagen, in Abb. B der Anteil toter, PI-positiver Makrophagen gezeigt. Dargestellt sind die Mittelwerte \pm Standardabweichung aus mindestens drei unabhängigen Versuchen ($p < 0,05 = *$, $p < 0,01 = **$, $p < 0,001 = ***$).

4.8.7. Aktivierung der Makrophagen durch Flavan-3-ole

Die getesteten Flavan-3-ole Epicatechin (EC) und Epigallocatechin (EGC) konnten keine Reduktion der Infektionsrate induzieren. Auch Epigallocatechin-3-O-gallat (EGCG) hatte keinen signifikanten Effekt auf die Parasitenlast, dafür aber eine deutlich erhöhte Zytotoxizität von 27% gegenüber den Wirtszellen (Abbildung 59).

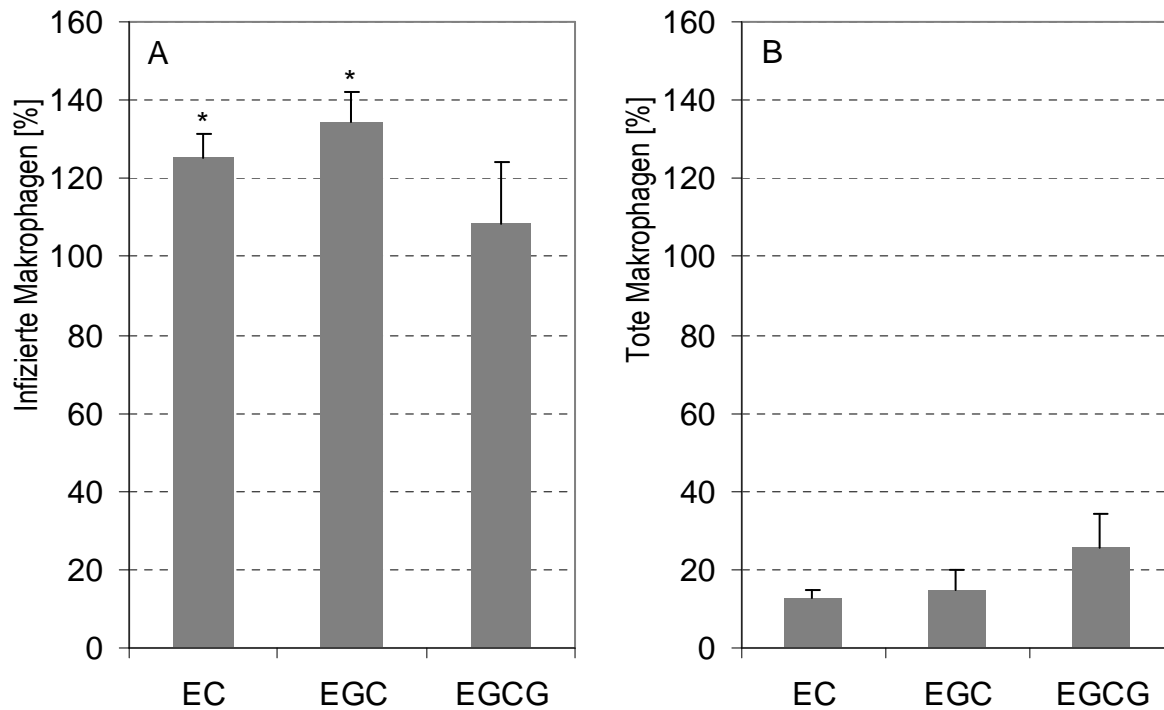


Abbildung 59: Aktivierung von antileishmaniellen Abwehrmechanismen in Makrophagen durch Flavan-3-ole im FACS-basierten Assay

BMM Φ wurden mit Leishmanien über 24 h infiziert und für weitere 48 h mit 30 μ g/ml der Testsubstanz behandelt. Danach wurde die Infektionsrate durchflusszytometrisch bestimmt und relativ zur Rate infizierter, unbehandelter Makrophagen (100%) gesetzt. In Abb. A ist der Anteil infizierter, gfp-positiver Makrophagen, in Abb. B der Anteil toter, PI-positiver Makrophagen gezeigt. Dargestellt sind die Mittelwerte \pm Standardabweichung aus mindestens drei unabhängigen Versuchen ($p < 0,05 = *$, $p < 0,01 = **$, $p < 0,001 = ***$).

Als weiteren Beweis für eine aktivierende Wirkung von EPs[®] 7630 auf Makrophagen sollen folgende Experimente dienen, die sich mit dem Nachweis von Zytokinen und der Bildung von NO beschäftigen.

4.9. Induktion von IL-12 murinen Knochenmarksmakrophagen

Das Zytokin IL-12 zählt zu den proinflammatorischen Zytokinen, welche eine Reihe weiterer Immunzellen aktivieren können. Gebildet wird es unter anderem von Monozyten und Makrophagen. Die Stimulation kann durch den Kontakt mit Erregerantigenen oder T-Lymphozyten erfolgen. IL-12 induziert IFN- γ -Bildung in T_H1 sowie natürlichen Killerzellen und reguliert das Gleichgewicht zwischen T_H1 und T_H2-vermittelter Immunantwort.

Die Knochenmarksmakrophagen wurden wie in Kap. 3.5.3. beschrieben behandelt. Nach 48 h wurde der Zellkulturüberstand entnommen und der IL-12-Gehalt mittels Sandwich-ELISA quantifiziert. Die Positivkontrolle 100 U/ml IFN- γ und 10 ng/ml LPS, induzierte eine deutliche Immunantwort. Die nicht infizierten Makrophagen produzierten 337 pg/ml IL-12. Die mit Leishmanien infizierten BMM Φ reagierten deutlich stärker und sezernierten 527 pg/ml IL-12. Die getesteten Pflanzenextrakte sowie Reinsubstanzen hatten jedoch keinen Einfluss auf die IL-12-Produktion. Es ist jedoch bekannt, dass Leishmanien die Bildung von IL-12 verhindern und so die T_H1-Immunantwort unterdrücken können ([Olivier et al., 2005](#)).

4.10. Induktion von TNF- α in murinen Knochenmarksmakrophagen

Das Zytokin TNF- α ist ein wichtiger Stimulierungsfaktor für eine Reihe Immunzellen. Es induziert die NO-Bildung und die Expression von Chemokinen in Makrophagen. Außerdem induziert es die Bildung von spezifischen Selektinen auf Epithelzellen, die wichtig für den Eintritt von Leukozyten in das Stroma sind.

Der Makrophagenüberstand (Kap. 3.5.3) wurde mittels Sandwich-ELISA auf das Vorhandensein von TNF- α untersucht. Die mit 100 U/ml IFN- γ und 10 ng/ml LPS behandelte Positivkontrolle wies einen TNF- α -Gehalt von 225 pg/ml bei nicht infizierten Zellen auf und einen ca. doppelt so hohen Gehalt von 462 pg/ml bei mit Leishmanien infizierten BMM Φ . EPs[®] 7630 und MIP induzieren beide große Mengen TNF- α , sowohl in nicht infizierten (332 bzw. 434 pg/ml) als auch in infizierten Zellen (432 bzw. 402 pg/ml) (Abbildung 60). Der Extrakt ist also in der Lage eine Immunantwort zu induzieren, die mit der Positivkontrolle vergleichbar ist. Die wirkbestimmenden Substanzen befinden sich lediglich in der methanolunlöslichen Fraktion. Da nach Entfernen der hochmolekularen Proanthocyanidine (Kap. 3.2.1 und 4.1.2.) aus dieser Fraktion die Aktivität verloren geht, ist davon auszugehen, dass diese für die Induktion von TNF- α verantwortlich sind. Wie im Kap. 4.3. und von [Schötz und Nöldner \(2007\)](#) beschrieben, handelt es sich dabei hauptsächlich um Prodelphinidine. Des Weiteren war eine geringe TNF- α -Induktion bei infizierten Zellen durch das Methanolextrakt aus Ginkgo messbar. In diesem Extrakt sind auch, wenn auch in einem geringeren Umfang, Prodelphinidine enthalten.

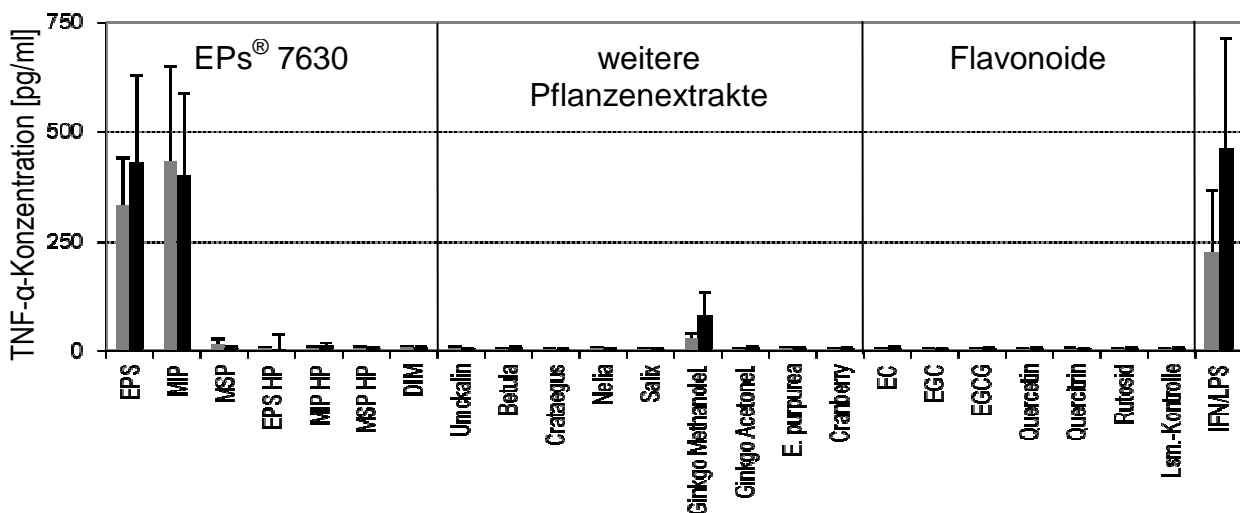


Abbildung 60: Induktion von TNF- α in murinen Knochenmarksmakrophagen

BMM Φ wurden mit Leishmanien infiziert und nach 24 h mit 30 μ g/ml Extrakt behandelt. Nach 48 h wurden die Überstände abgenommen und der TNF- α mittels Sandwich-ELISA quantifiziert. ■ nicht infizierte BMM Φ , ■ infizierte BMM Φ . Dargestellt sind die Mittelwerte \pm Standardabweichung aus mindestens drei unabhängigen Versuchen.

4.11. Induktion zytoprotektiver Effekte in murinen Fibroblasten

4.11.1. Prinzip

Eine weitere Möglichkeit die Immunabwehr zu steigern, ist die Induktion der Interferon-Synthese. Dadurch können infizierte Zellen eine Aktivierung des angrenzenden Gewebes einleiten und die intrazelluläre Synthese von Virenbestandteilen hemmen (IFN- α und IFN- β) oder eine verstärkte NO-Bildung in Makrophagen induzieren (IFN- γ). Als Maß für den Virusschutz dient die Überlebensrate von L929-Zellen, nach einer EMCV-Infektion. Sind die Zellen geschützt, so kann das Virus sich nicht vermehren und der Zellrasen bleibt unbeschädigt. Sind die Zellen nicht ausreichend aktiviert, kommt es auf Grund des zytopathischen Effektes zur Lyse der infizierten und der unmittelbar benachbarten Zellen und es entstehen runde zellfreie Bereiche (Plaques), die eine verminderte Einlagerung von Kristallviolett zur Folge haben (Kap. 3.5.5). Der Virusschutz kann prinzipiell auf mehreren Wegen induziert werden: direkt durch die Behandlung der L929-Zellen mit Extrakten ODER durch Interferone, die von extraktbehandelten Makrophagen sezerniert wurden.

Da in vorangegangenen Experimenten die verwendeten Extrakte mit den eingesetzten Erregern interagierten wurde zunächst jedoch der Effekt der Testsubstanzen direkt auf das Virus untersucht, um eine Beeinflussung von Oberflächenrezeptoren des Virus auszuschliessen.

4.11.2. Vorinkubation des EMCV

Die L929-Zellen wurden in 96-Wellplatten ausgestreut. Am dritten Tag wurde das EMC-Virus eine Stunde lang mit 30 $\mu\text{g/ml}$ Extrakt bei 37 $^{\circ}\text{C}$ vorinkubiert und die Testsubstanz ausgewaschen. Anschließend wurde der L929-Monolayer mit den vorbehandelten Virussuspensionen infiziert. Nach 24 h wurde die Anzahl der überlebenden Fibroblasten mittels Kristallviolett färbung bestimmt. Dabei konnte keine Reduktion der Infektion durch Vorbehandlung der Viren mit Extrakten beobachtet werden. Unabhängig von der verwendeten Testsubstanz, waren alle L929-Zellen gleich stark infiziert und die Vitalität massiv reduziert.

4.11.3. Vorinkubation der L929- Zellen mit Extrakten

Die L929-Zellen wurden wie in Kap. 3.5.5 beschrieben ausgestreut. Am zweiten Tag wurde das Medium abgesaugt und sofort mit 30µg/ml Extrakt in R5 ersetzt. Nach Infektion und Färbung der Fibroblasten konnte ebenfalls kein Effekt der Extrakte auf die Überlebensrate der L929-Zellen beobachtet werden. Das bedeutet, dass die getesteten Substanzen weder die für die Infektion benötigten Rezeptoren an der Oberfläche der Zellen verändern können, noch die Fähigkeit besitzen in den L929-Zellen die Produktion von Virusschutzproteinen zu induzieren.

4.11.4. Vorinkubation der L929-Zellen mit Makrophagenüberständen

Knochenmarksmakrophagen wurden 24 h lang mit 30 µg/ml Extrakt inkubiert und der Überstand zur Vorbehandlung des L929-Monolayers verwendet. Dazu wurde das Medium abgesaugt und sofort mit der entsprechenden Verdünnung des Überstandes ersetzt. Die so behandelten Zellen wurden 24 h inkubiert. Nach Infektion und Färbung konnten lediglich durch EPs[®] 7630 sowie die methanolunlösliche Phase (MIP) ein Virusschutz induziert werden (Abbildung 61). Alle weiteren Extrakte hatten keinen Einfluss auf die Infektion. Dabei konnte der Überstand, der mit 30 µg/ml EPs[®] 7630 inkubierten Makrophagen, einen Virusschutz induzieren, der verglichen mit dem IFN-γ-Standard $23,49 \pm 8,21$ U/ml IFN-γ entspricht. MIP zeigte sogar einen stärkeren Effekt mit $45,87 \pm 6,81$ U/ml IFN-γ. In der methanolunlöslichen Phase scheinen also die für die Wirkung verantwortlichen Substanzen angereichert worden zu sein. Aus dc und massenspektrometrischen Untersuchungen (Kap. 4.1.1 und 4.2) ist ersichtlich, dass es sich dabei vor allem um hochmolekulare Polyphenole handelt. Außerdem wirken EPs[®] 7630 und MIP lediglich auf die Makrophagen und nicht auf die Fibroblasten, was für einen spezifischen Rezeptor spricht, der nur auf den Leukozyten vorhanden sein muss.

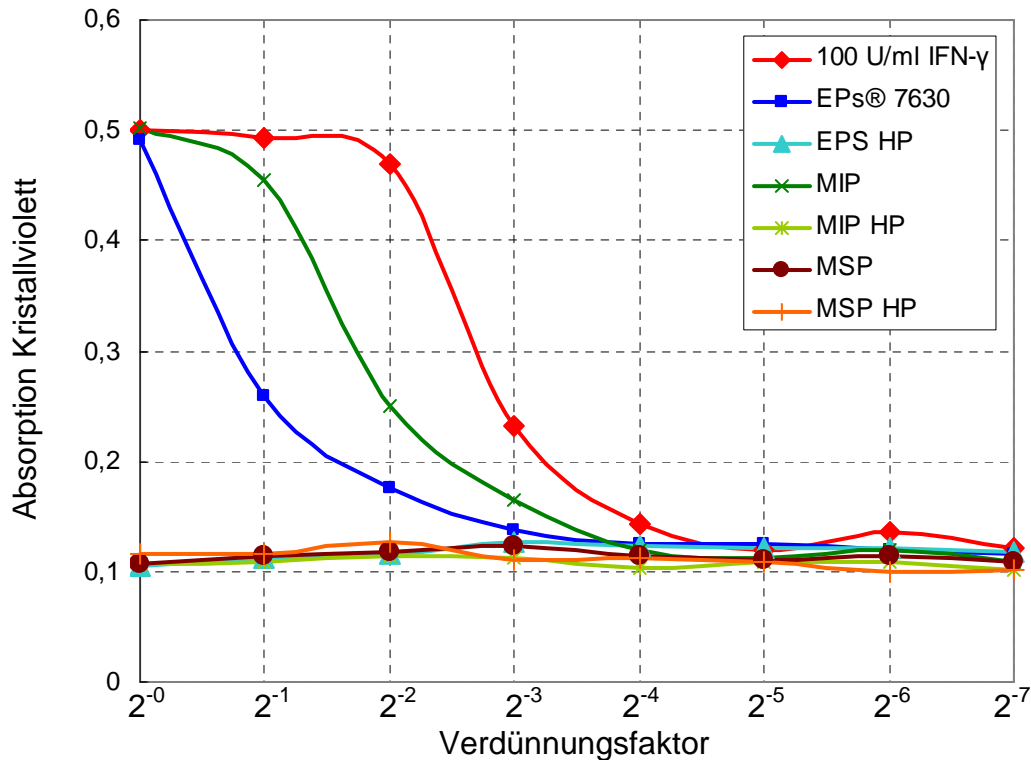


Abbildung 61: Aktivierung von Virusschutzmechanismen in L929-Zellen durch Makrophagenüberstände, die mit 30 µg/ml Extrakt 24 h inkubiert wurden.

Serielle Verdünnungen der Makrophagenüberstände wurden auf die L929-Zellen gegeben. Als Positivkontrolle diente eine Verdünnungsreihe des IFN-γ-Standards. Nach 24 h Inkubation wurden die aktivierenden Substanzen entfernt und die L929-Fibroblasten für weitere 24 h mit EMCV infiziert. Die Vitalität der überlebenden Zellen wurde mittels Kristallviolett färbung quantifiziert und gegen den Verdünnungsfaktor aufgetragen. Dargestellt sind die Mittelwerte aus drei unabhängigen Versuchen.

4.12. Induktion von $\cdot\text{NO}$ -Radikalen in Knochenmarksmakrophagen

Das Nitrosylradikal ($\cdot\text{NO}$) spielt eine wichtige Rolle bei der Bekämpfung von Infektionen (Kap. 4.13) und kann daher als Indikator für eine erfolgreiche Aktivierung der Makrophagen dienen. Daher wurden die in Kap. 3.5.3 gewonnenen Überstände mittels Griess-Assay (Kap. 3.5.7) auf den Gehalt von Nitrit untersucht. Dieser ist proportional zur gebildeten Menge des $\cdot\text{NO}$ -Radikals. Als Positivkontrolle für die Stimulierung von Makrophagen wurden 100 U/ml IFN-γ und 10 ng/ml LPS eingesetzt. Diese Kombination simulierte eine Infektion und induzierte in den Makrophagen große Mengen $\cdot\text{NO}$. Dabei sezernierten die mit *Leishmanien* infizierten Makrophagen etwas mehr $\cdot\text{NO}$ (82 µM) als nicht infizierte (76 µM) Zellen. Durch 48 h Inkubation mit jeweils 30 µg/ml der Pflanzenextrakte oder Reinsubstanzen, konnte eine erhöhte Produktion von $\cdot\text{NO}$ durch EPs® 7630 und die methanolunlösliche Phase (MIP) beobachtet werden. EPs® 7630 induzierte in nicht infizierten Makrophagen 10 µM

\cdot NO, was nur unwesentlich mehr ist als bei der Lösemittelkontrolle (6 μ M). Die infizierten Zellen reagierten deutlich stärker auf EPs[®] 7630 (28 μ M). MIP konnte bereits in nicht infizierten Zellen 29 μ M \cdot NO induzieren, bei infizierten Makrophagen waren es 41 μ M (Abbildung 62). Diese Ergebnisse zeigen zum einen, dass EPs[®] 7630 ein guter Immunaktivator ist. Zum anderen wird auch deutlich, dass bei gesunden, nicht infizierten Zellen keine bzw. nur eine schwache Aktivierung erfolgt, was einen unnötigen Stress der Zellen verhindert.

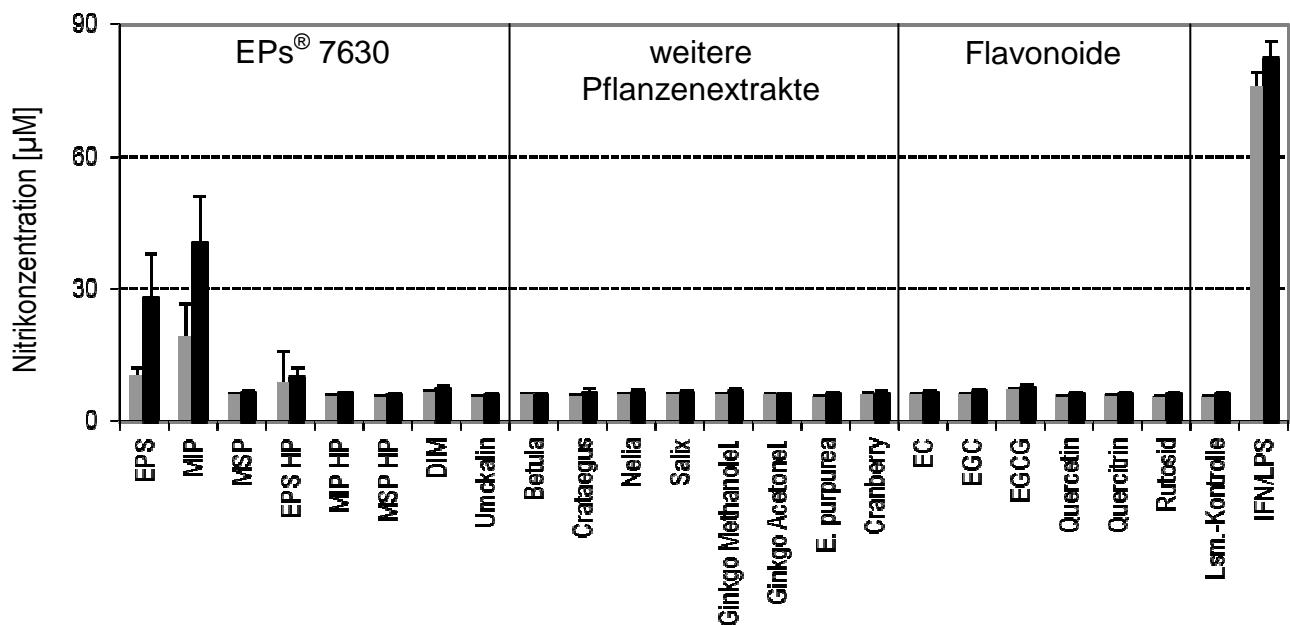


Abbildung 62: Induktion von \cdot NO in murinen Knochenmarksmakrophagen

BMMφ wurden mit Leishmanien infiziert und nach 24 h mit 30 μ g/ml Extrakt/Testsubstanz behandelt. Nach 48 h wurden die Überstände abgenommen und der Nitritgehalt mittels Griess-Assay quantifiziert. ■ nicht infizierte BMMφ, ■ infizierte BMMφ. Dargestellt sind die Mittelwerte \pm Standardabweichung aus mindestens drei unabhängigen Versuchen.

4.13. $\dot{\text{NO}}$ -Scavenging

Das $\dot{\text{NO}}$ ist ein wichtiger Mediator in physiologischen Prozessen. Neben seiner Rolle als Neurotransmitter und Vasodilator spielt es eine essentielle Rolle bei der Abwehr von Pathogenen. Produziert wird es vom Enzym $\dot{\text{NO}}$ -Synthase (NOS). Es gibt mehrere Isoformen, welche je nach Herkunft als eNOS (endotheliale NOS), nNOS (neuronal NOS) und mtNOS (mitochondriale NOS) bezeichnet werden. Die Expression der für immunologische Prozesse wichtigen, induzierbaren Form (iNOS, z.B. in Makrophagen und neutrophilen Granulozyten) wird durch Endotoxine (LPS) sowie verschiedene Zytokine ausgelöst ([Daff, 2010](#)). Trotz seiner radikalischen Natur besitzt $\dot{\text{NO}}$ eine vergleichsweise lange Halbwertszeit in physiologischen Lösungen. Je nach Literaturquelle wird diese mit einer Dauer von 1-500 Sekunden angegeben ([Wink et al., 1993](#); [Hakim et al., 1996](#)). Auf Grund seiner geringen Größe und elektrischen Neutralität, kann $\dot{\text{NO}}$ leicht biologische Membranen passieren und ist deshalb gut als extrazellulärer Botenstoff sowie biozides Agens mit lokal begrenzter Wirkung geeignet. Durch Reaktion mit Sauerstoff entsteht aus dem Radikal das stabile Nitrit bzw. Nitrat ([Tanennbaum, 1979](#); [Moshage et al., 1995](#)), welches mit Hilfe des Griess-Assays detektiert werden kann ([Sun et al., 2003](#); [Tsikas, 2007](#)).

Das Radikal sowie seine Folgeprodukte sind durch hohe Reaktivität gekennzeichnet und in der Lage Mikroorganismen durch Schädigung der DNA, Lipide und Proteine abzutöten. Naturstoffe mit antioxidativem Potential können durch Abfangen der Radikale (Scavenging) eine wichtige Schutzfunktion erfüllen. Derzeit existieren vor allem Arbeiten zum Scavengingpotential von reaktiven Sauerstoffspezies sowie von Peroxynitrit durch Naturstoffe ([Rice-Evans et al., 1996](#); [Choi et al., 2002](#); [Terao, 2009](#)). Das Scavengingpotential einer Substanz kann allerdings je nach Radikaltyp stark variieren.

4.13.1. Prinzip

Zum Nachweis von $\dot{\text{NO}}$ -Radikalfängereigenschaften wurde ein Modell gewählt, bei dem aus Nitroprussidnatrium (häufig auch als SNP -Sodium-nitroprussidat-bezeichnet) *in situ* $\dot{\text{NO}}$ -Radikale generiert werden. Diese reagieren schnell weiter zum stabilen Nitrit, welches mittels Griess-Assay einfach und schnell quantifiziert werden kann. Die gemessene Nitritkonzentration ohne Zugabe von Testsubstanzen entspricht einer relativen $\dot{\text{NO}}$ -Bildung von 100% (Positivkontrolle). Der durch Testsubstanzen abgefangene Anteil an $\dot{\text{NO}}$ -Radikalen entzieht sich der

Nitritmessung im Griess Assay. Das Ausmaß der reduzierten Nitritkonzentration vermittelt das Radikalfängerpotential der Testsubstanz. Als Negativkontrolle diente die Testsubstanz ohne SNP.

In ersten Experimenten stellte sich schnell heraus, dass der Versuch sehr lichtsensitiv war und je nach Wetterlage und Sonneneinstrahlung zu sehr unterschiedlichen Werten führte. Alle Versuche wurden daher nachfolgend in einer Dunkelkammer mit einer konstanten Lichtquelle durchgeführt. In Vorversuchen wurde eine Position ermittelt, bei der eine gleichmäßige Bestrahlung über die gesamte Mikrotiterplatte gewährleistet war.

Als SNP-Konzentration wurde eine 0,5 mmol Lösung gewählt, da mit höheren Konzentrationen zu hohe Absorptionswerte erreicht wurden. Die optimale Bestrahlungsdauer wurde ermittelt, indem 100 μ l der SNP-Lösung pro Well aufgetragen wurden, die Mikrotiterplatte unter der Lichtquelle positioniert und in Abständen von 5 min. zu jeweils zwei Reihen Griess-Reagenz zugegeben und die Absorption vermessen wurde (Abbildung 63). Auf Grund des Lambert Beer'schen Gesetzes wurde als optimale Absorption ein Wert von 0,8 gewählt. Mit Hilfe einer Regressionsgerade wurde die Inkubationsdauer von 7 min. errechnet.

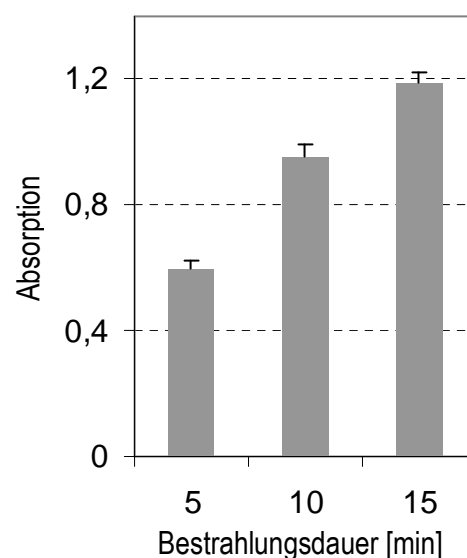


Abbildung 63: Nitritbildung in Abhängigkeit von der Bestrahlungsdauer

Eine 0,5 mmol SNP-Lösung wurde bei Raumtemperatur unter einer UV-Lampe 5, 10 und 15 min. bestrahlt. Zu der Lösung wurde anschließend Griess-Reagenz zugegeben und die Probe bei 570 nm vermessen.

4.13.2. Radikalfängerpotential von Quercetin und Quercetinglykosiden

In der Literatur ist das Flavonol Quercetin als hervorragender Radikalfänger beschrieben ([van Acker et al., 1995](#); [Terao, 2009](#)). Als entscheidend für die Fähigkeit Radikale abzufangen wird vor allem die Catecholstruktur (ortho-Dihydroxygruppierung am B-Ring, rot markiert) angesehen.

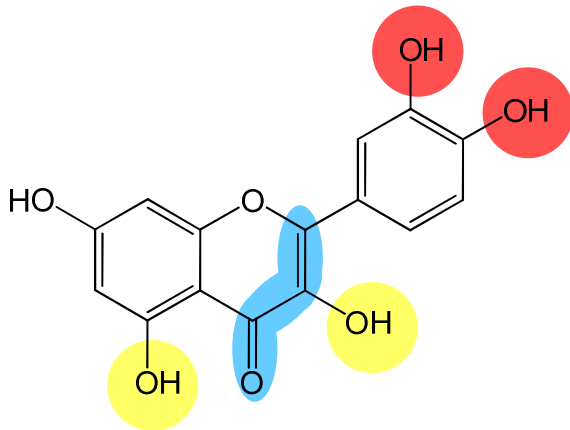


Abbildung 64: Strukturelle Voraussetzungen für das Radikalfängerpotential von Quercetin

Die phenolischen Hydroxygruppen dienen als Protonendonatoren. Durch die Doppelbindung zwischen C-2 und C-3 in Konjugation zur 4-Oxogruppierung (blau markiert) ist das ungepaarte Elektron des Flavonolradikals mesomeriestabilisiert. (Abbildung 64) ([Bors et al., 1990](#)). Die Hydroxygruppen in Position 3 und 5 ermöglichen intramolekulare Wasserstoffbrückenbindungen, was eine weitere Erhöhung der Radikalstabilität bedingt.

Wie erwartet war Quercetin ein moderat guter $\cdot\text{NO}$ -Radikalfänger mit einem IC_{50} -Wert von $366 \mu\text{M}$ ($111 \mu\text{g/ml}$). Die Glykoside zeigten mit zunehmender Anzahl der Zuckerreste niedrigere IC_{50} -Werte von $295 \mu\text{M}$ ($132 \mu\text{g/ml}$) für Quercitrin und $245 \mu\text{M}$ ($149 \mu\text{g/ml}$) für Rutosid (Abbildung 65). Eine freie Hydroxygruppe am C-3 gilt als wichtiges Strukturmerkmal ([Choi et al., 2002](#)) für eine starke antioxidative Wirkung. Diese ist durch die Glykosidierung jedoch blockiert, was im Widerspruch zu den erzielten Ergebnissen steht.

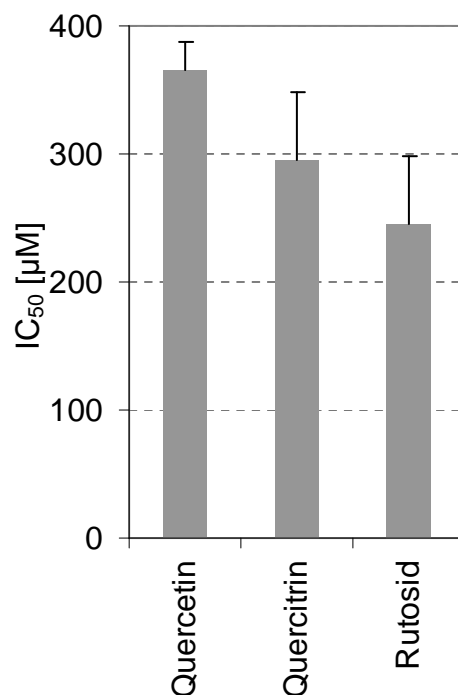


Abbildung 65: $\cdot\text{NO}$ -Radikalfängerpotential Quercetin, Quercitrin und Rutosid

Die Substanzen wurden bei Raumtemperatur 7 min. mit einer $0,5 \text{ mmol}$ SNP-Lösung unter gleichmäßiger UV-Bestrahlung inkubiert. Das entstandene Nitrit wurde mittels Griess-Assay quantifiziert. Dargestellt ist der Mittelwert mit der Standardabweichung aus drei unabhängigen Versuchen.

4.13.3. Radikalfängerpotential von EPs[®] 7630 und Unterfraktionen

Nachfolgend wurde das Radikalfängerpotential von EPs[®] 7630 untersucht (Abbildung 66). Der Spezialextrakt zeigte eine ausgeprägte antioxidative Aktivität mit einem IC₅₀-Wert von 160 µg/ml (Zum Vergleich: Quercetin 111 µg/ml). Die an oligomeren Proanthocyanidinen reiche methanollösliche Phase (MSP) erreichte einen annähernd gleichen IC₅₀-Wert von 163 µg/ml. Die Dimerenfraktion zeigte das stärkste Abfangpotential mit einem IC₅₀-Wert von 92 µg/ml. Der methanolunlösliche Anteil (MIP) mit hochpolymeren Gerbstoffen war dagegen deutlich schwächer aktiv (IC₅₀-Wert von 400 µg/ml). Diese Befunde legen nahe, dass die Radikalfängereigenschaft mit steigender Kettenlänge der Proanthocyanidine abnimmt.

Nach Entfernung der Gerbstoffe (Kap. 4.1.2) verloren die Extrakte ihre Aktivität, erkennbar an hohen IC₅₀-Werten der polyphenolfreien Proben. Die in EPs[®] 7630 enthaltenen Proanthocyanidine sind offensichtlich maßgeblich an der antioxidativen Wirkung des Extraktes beteiligt.

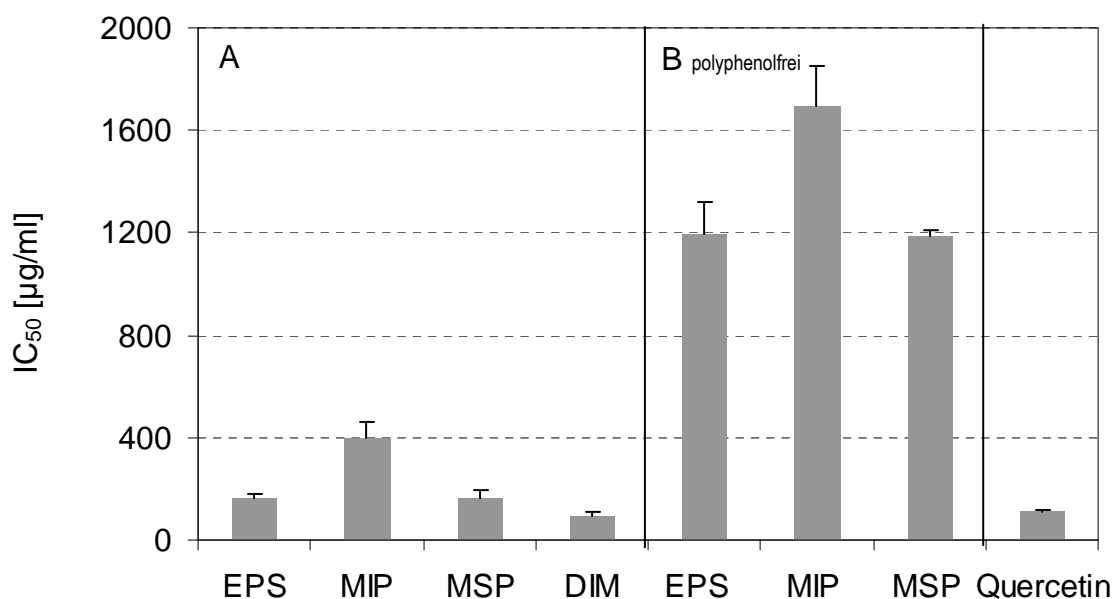


Abbildung 66: ·NO-Radikalfängerpotential von EPs[®] 7630, methanolunlöslicher (MIP), methanollöslicher Phase (MSP) sowie polyphenolfreier Zubereitungen

Die Substanzen wurden bei Raumtemperatur 7 min. mit einer 0,5 mmol SNP-Lösung unter gleichmäßiger UV-Bestrahlung inkubiert. Das entstandene Nitrit wurde mittels Griess-Assay quantifiziert. Dargestellt ist der Mittelwert mit der Standardabweichung aus drei unabhängigen Versuchen.

In nachfolgenden Studien an Gerbstofffraktionen mit unterschiedlichen Hydroxylierungsmustern der Proanthocyanidinbausteinen sollten Strukturvoraussetzungen für einen potenziellen antioxidativen Effekt bei diesem Gerbstofftyp aufgezeigt werden.

4.13.4. Rolle des Hydroxylierungsmusters von Proanthocyanidinen

Um herauszufinden, inwieweit das Hydroxylierungsmuster der Flavan-3-ol Grundbausteine eine wichtige Rolle für die Radikalfängereigenschaften spielt, wurden in einem ersten Schritt hoch aufgereinigte oligomere Procyanidine untersucht (Kap. 3.2.2.). Diese besitzen nur zwei phenolische Hydroxygruppen in Position C3' und C4'. Eine Oligomerenfraktion aus Birkenrinde (aufgebaut aus Catechin- und Epicatechinbausteinen) zeigte die niedrigste Aktivität mit einem IC₅₀-Wert von 466 µg/ml, während für eine Oligomerenfraktion aus Crataegusfrüchten (Di- bis Tetramere aufgebaut vorwiegend aus Epicatechinbausteinen) ein IC₅₀-Wert von 263 µg/ml ermittelt wurde (Abbildung 67).

Ginkgoextrakte enthalten überwiegend Prodelphinidine, aufgebaut aus (Epi)Gallocatechingrundbausteinen (C3'/C4'/C5'-Trihydroxylierung). Für ein Methanoleluat wurde ein IC₅₀-Wert von 154 µg/ml und für ein Acetoneluat ein IC₅₀-Wert von 172 µg/ml bestimmt. Die ermittelten IC₅₀-Werte waren ähnlich hoch wie der von EPs® 7630 und legen nahe, dass Prodelphinidine mit Pyrogalloyelementen ein höheres antioxidatives Potential haben als Procyanidine mit einer Catecholteilstruktur.

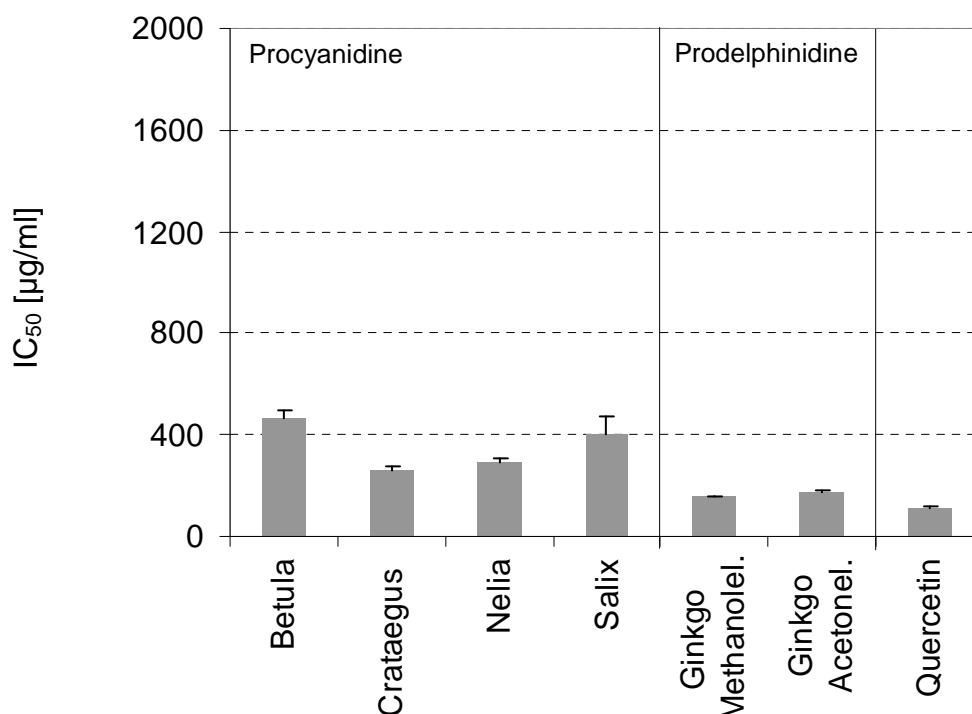


Abbildung 67: ·NO-Radikalfängerpotential von B-Typ Procyanidinen und Prodelphinidinen

Die Substanzen wurden bei Raumtemperatur 7 min. mit einer 0,5 mmol SNP-Lösung unter gleichmäßiger UV-Bestrahlung inkubiert. Das entstandene Nitrit wurde mittels Griess-Assay quantifiziert. Dargestellt ist der Mittelwert mit der Standardabweichung aus drei unabhängigen Versuchen.

4.13.5. **¹NO-Radikalfängerpotential von Cumarinen**

Cumarin (o-Hydroxyzimtsäurelacton) stellt die unsubstituierte Ausgangsverbindung dar, welche in Konzentrationen bis 1 mM inaktiv war. Das lediglich am C-7 hydroxylierte Umbelliferon zeigte ein sehr schwaches ¹NO-Radikalfängerpotential (IC₅₀-Wert 2196 µM) (Abbildung 70). Der entsprechende Methylether (Herniarin, erwies sich als deutlich weniger aktiv (IC₅₀-Wert 3980 µM).

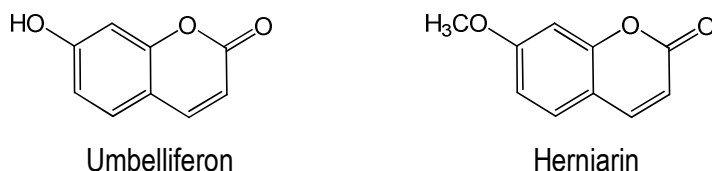


Abbildung 68: Strukturformeln monoxygenierter Cumarine

Die getesteten dioxygenierten Strukturanaloga zeichneten sich durch ein deutlich gesteigertes, wenn auch immer noch moderates ¹NO-Radikalfängerpotential aus. So wies Aesculetin einen IC₅₀-Wert von 233 µM auf. Das Glykosid Aesculin (Aesculetin-6-O-β-D-glucosid) (IC₅₀-Wert 923 µM) war wie erwartet schwächer aktiv als das Aglykon, da eine der phenolischen Hydroxygruppen durch den Zuckerrest maskiert ist. Interessanterweise führt die Methylierung der 7-OH-Gruppe zu einer Steigerung der Aktivität (Scopoletin, IC₅₀-Wert von 141 µM). Trotz einer zusätzlichen Hydroxygruppe, wie sie beim trioxygenierten Umckalin vorliegt, ist keine wesentliche Steigerung der Aktivität mehr möglich (IC₅₀-Wert von 114 µM).

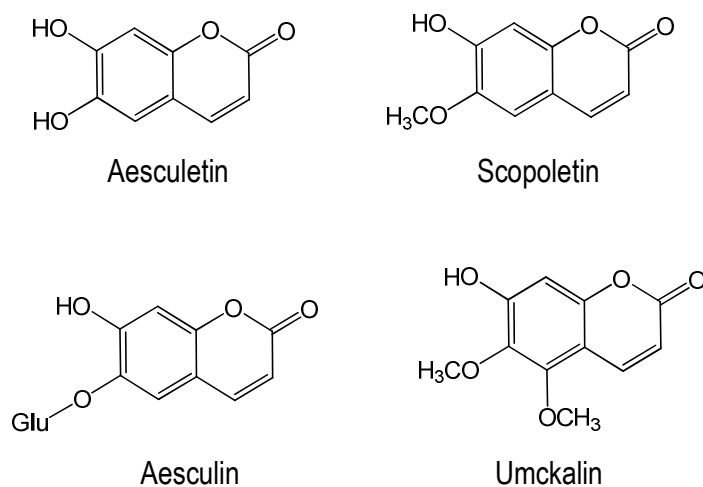


Abbildung 69: Strukturen von di- und trihydroxylierten Cumarinen

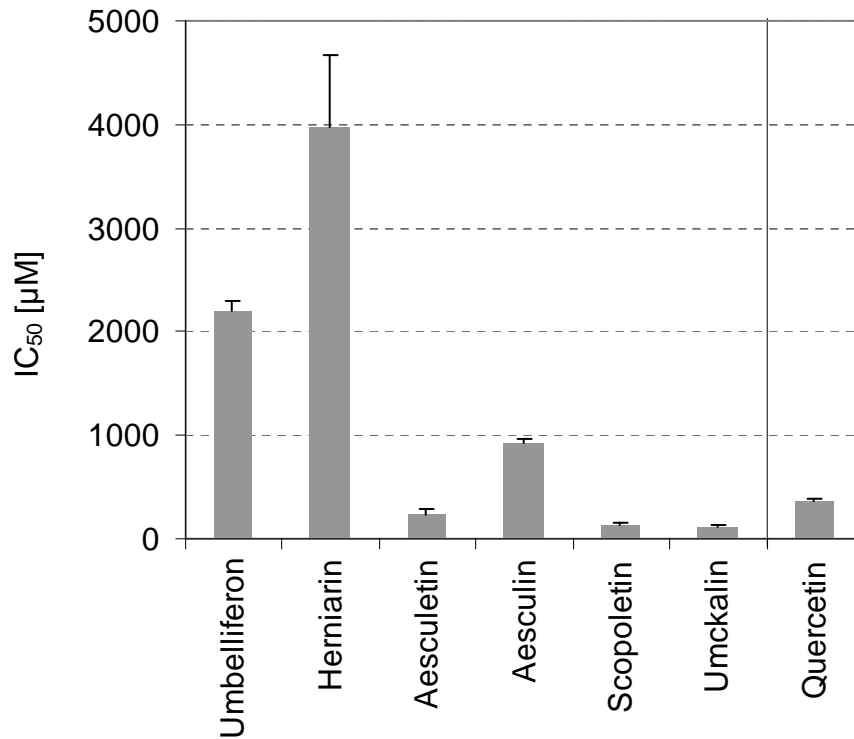


Abbildung 70: ·NO-Radikalfängerpotential von Cumarinen

Die Substanzen wurden bei Raumtemperatur 7 min. mit einer 0,5 mmol SNP-Lösung unter gleichmäßiger UV-Bestrahlung inkubiert. Das entstandene Nitrit wurde mittels Griess-Assay quantifiziert. Dargestellt ist der Mittelwert mit der Standardabweichung aus drei unabhängigen Versuchen.

4.13.6. ·NO-Radikalfängerpotential von Flavan-3-olen

Dem Flavan-3-ol Epicatechin wird ähnlich wie Quercetin ein hohes Radikalfängerpotential zugeschrieben ([Kondo et al., 1999](#)). Jedoch konnte sowohl für Epicatechin wie Epigallocatechin keine besonders hohe Aktivität ermittelt werden, ·NO-Radikale abzufangen. Beide Verbindungen haben einen IC_{50} -Wert von ca. 1,1 mM und liegen damit etwa dreimal so hoch wie der für Quercetin (0,37 mM). Für Epigallocatechin-3-O-gallat wurde ein moderater IC_{50} -Wert von 0,51 mM bestimmt.

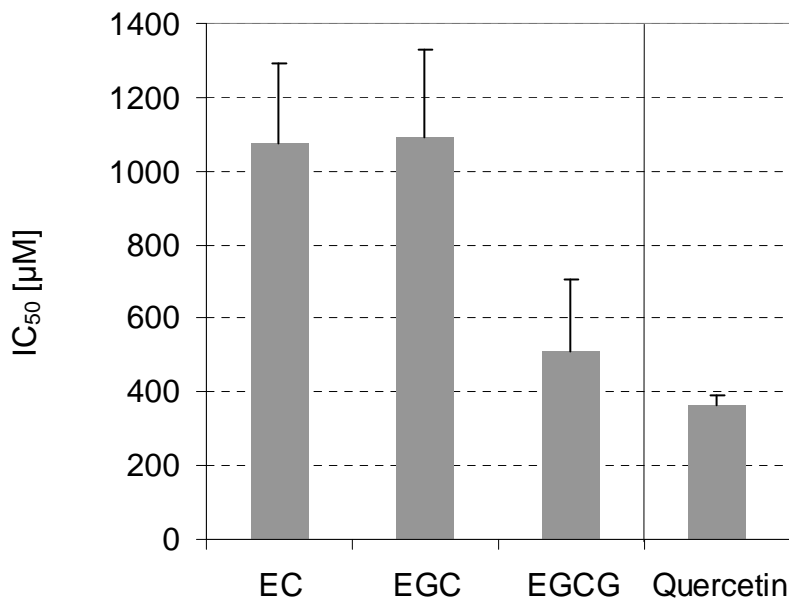
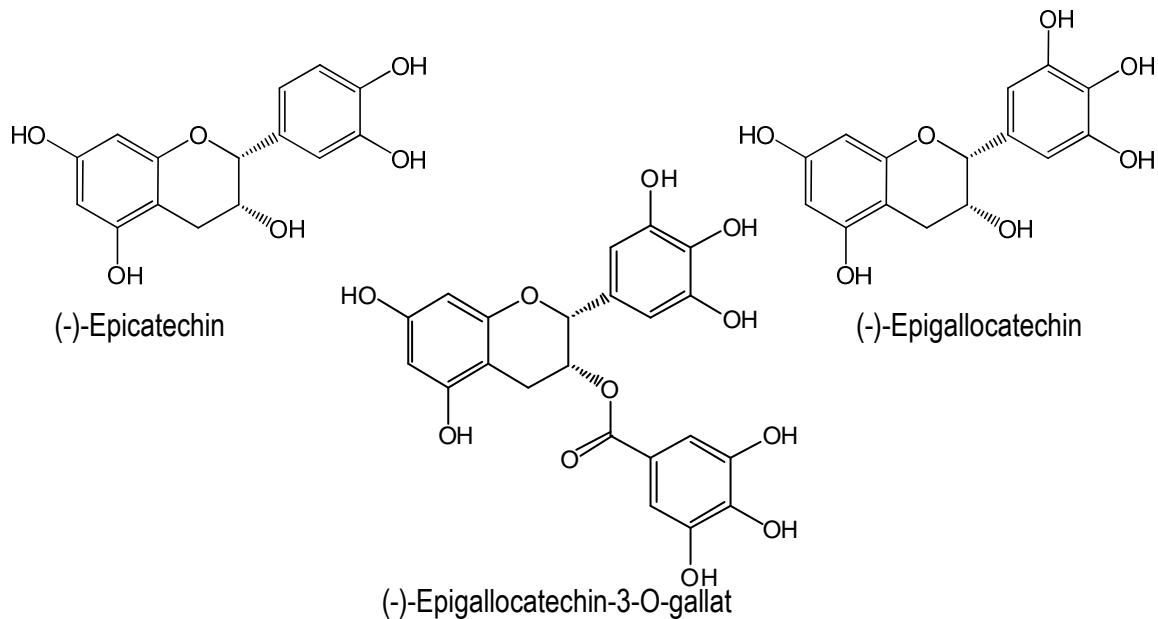


Abbildung 71: ·NO-Radikalfängerpotential von Flavan-3-olen

Die Substanzen wurden bei Raumtemperatur 7 min. mit einer 0,5 mmol SNP-Lösung unter gleichmäßiger UV-Bestrahlung inkubiert. Das entstandene Nitrit wurde mittels Griess-Assay quantifiziert. Dargestellt ist der Mittelwert mit der Standardabweichung aus drei unabhängigen Versuchen.

5. Diskussion

5.1. Phytochemischer Teil

Im Rahmen dieses Dissertationsvorhabens wurde der Spezialextrakt EPs[®] 7630 phytochemisch untersucht. Es handelt sich hierbei um einen wässrig ethanolischen Extrakt aus den Wurzeln von *P. sidoides* DC., der zur Bereitung des Fertigarzneimittels Umckaloabo[®] verwendet wird. Vorangegangene Arbeiten befassten sich vorwiegend mit der Untersuchung des Wurzelmaterials und daraus selbsthergestellter Extrakte ([Kayser, 1995](#); [Gödecke, 2005](#)). Zwar wurde dort eine Vielzahl von Verbindungen isoliert und deren Strukturen aufgeklärt, jedoch differieren die angewendeten Extraktionsmethoden vom patentierten Herstellungsverfahren der Arzneimittelfirma Dr. Willmar Schwabe & Co KG, Karlsruhe ([Erdelmeier et al., 2003](#)). Daher ist die Übertragung der Ergebnisse auf das Fertigarzneimittel nur bedingt möglich.

In der vorliegenden Arbeit wurden neben bereits nachgewiesenen Verbindungen wie 6,8-Dihydroxy-5,7-dimethoxycumarin, Umckalin ([Trun, 2004](#)), Gallocatechin/Epigallocatechin ([Schötz und Nöldner, 2007](#)) auch zwei neue Cumarinsulfate in EPs[®] 7630 detektiert. Die spektroskopischen Daten stützen das Vorliegen eines 5-Hydroxy-6,7-dimethoxycumarin-8-sulfats und Monohydroxy-monomethoxycumarinsulfats, erlaubten aber keine eindeutige Charakterisierung des Substitutionsmusters. Ein besonderes Augenmerk lag auf der Charakterisierung der Proanthocyanidine. In diesem Zusammenhang gelang die erstmalige Identifizierung von Catechin/Epicatechin als weitere monomere Flavan-3-ol Grundbausteinen oligomerer Proanthocyanidine. Die Bestimmung des Gerbstoffgehaltes nach dem Europäischen Arzneibuch zeigte, dass der Extrakt reich an Polyphenolen ist (22%). Der publizierte Wert von ca. 40% ([Schötz und Nöldner, 2007](#)) beruht auf einem Korrekturfaktor aus parallelen gravimetrischen Bestimmungen ([Erdelmeier, 2010](#)). Mittels hochauflösender Massenspektroskopie konnten dimere bis hexamere Proanthocyanidine nachgewiesen werden. Dabei dominieren Prodelphinidine gegenüber Procyanidinen. Diese Beobachtung konnte untermauert werden, in dem der Extrakt einer Säurehydrolyse unterworfen und die entstandenen Anthocyane identifiziert wurden. Dabei war, neben geringen Mengen Cyanidin, überwiegend Delphinidin nachweisbar.

Des Weiteren konnte zum ersten Mal die Struktur von vier Proanthocyanidindimeren genau aufgeklärt werden. Die isolierten Verbindungen Gallocatechin-4 α ,8-Epigallocatechin, Epicatechin-4 β ,8-Epigallocatechin, und Gallocatechin-4 α ,6-gallocatechin wurden bereits in anderen Pflanzen nachgewiesen ([Foo und Porter, 1978](#); [Malik, 1997](#); [Petereit, 1991](#)). Bei Epigallocatechin-4 β ,8-epicatechin handelt es sich um einen neuen Naturstoff. Bei biologischen Testungen (s. u.) erwies sich eine Dimerenfraktion aus EPs[®] 7630 häufig als aktiv, was die Strukturaufklärung einzelner Dimere besonders wertvoll macht.

Neben der analytischen Arbeit wurden geeignete Fraktionen aus EPs[®] 7630 hergestellt, die auf Grund der Inhaltsstoffprofile wertvolle Hinweise auf Wirksubstanzen und Strukturvoraussetzungen ermöglichten. Hier ist vor allem die Bereitung polyphenolfreier Fraktionen mit Hilfe der Hautpulvermethode ([Europäisches Arzneibuch, 2008](#)) zu betonen, die zum ersten Mal die Rolle der Proanthocyanidine des Spezialextraktes EPs[®] 7630 in *in vitro* Experimenten verdeutlichte.

5.2. Biologische Untersuchungen

Die relativ schwachen direkten antimikrobiellen Eigenschaften von Umckaloabo[®] legen den Schluss nahe, dass die in klinischen Studien nachgewiesene positive Wirkung des Extraktes bei akuter Bronchitis auf einem anderen Effekt beruhen muss. Dabei sind verschiedene Angriffspunkte denkbar. Beschrieben sind bereits immunmodulatorische, antivirale und antiinfektive Effekte (Kap. 1.7). In meiner Dissertationsarbeit wurde der Kenntnisstand zur Rolle von Inhaltsstoffen als Wirksubstanzen im Hinblick auf die vorhandenen Proanthocyanidine erweitert. Als hilfreich erwiesen sich vergleichende Untersuchungen des Extraktes sowie von Subfraktionen mit verschiedenen hochgereinigten Proanthocyanidinproben aus unterschiedlichen pflanzlichen Quellen.

5.2.1. Hemmung der Infektion

- Inhibierung der Adhäsion

Eine akute Bronchitis (Indikation von Umckaloabo[®]) ist in der Regel viral bedingt. Jedoch kommt es häufig zu einer bakteriellen Superinfektion mit A-Streptokokken, die mit einer Verschlechterung des Krankheitsverlaufes einhergeht. EPs[®] 7630 kann eine erfolgreiche Infektion durch Bakterien verhindern ([Conrad et al., 2007b](#); [Wittschier et al., 2007](#)). Dabei wird angenommen, dass die EPs[®] 7630-Inhaltsstoffe mit Oberflächenrezeptoren der Bakterien (*Streptococcus pyogenes*, *Helicobacter pylori*) interagieren und dadurch die Adhäsion der Erreger an die Wirtszellen erschwert wird. Es kommt zu keiner oder nur verminderter Kolonisierung und Invasion des Pathogens in tiefere Gewebsschichten, wodurch die Manifestation der Krankheit verhindert werden kann. Um die antiadhäsiven Eigenschaften von EPs[®] 7630 zu untersuchen, wurde der Stamm DSM 2071 (A-Streptokokken) als Testerreger verwendet. Nur bei Vorbehandlung der Bakterien (nicht der Wirtszellen) mit EPs[®] 7630 war ein antiadhäsiver Effekt zu beobachten (Reduktion der Adhäsionsrate um 47%). Dies verdeutlicht, dass lediglich die bakteriellen Adhäsine vom Extrakt beeinträchtigt werden, was obenerwähnte Publikationen bestätigt. In der vorliegenden Arbeit konnte der Kenntnisstand durch Testung verschiedener Fraktionen sowie Vergleichssubstanzen erweitert und die antiadhäsive Wirkung vorwiegend den Proanthocyanidinen zugeordnet werden. Die starken antiadhäsiven Effekte der Proanthocyanidine sind offensichtlich nicht von einer bestimmten Kettenlänge abhängig, denn sowohl die methanollösliche (MSP, dimere bis oligomere Proanthocyanidine) wie methanolunlösliche Fraktion (MIP, langkettige Proanthocyanidine) als auch eine Dimerenfraktion waren etwa gleich aktiv. Als wesentliches Strukturmerkmal hat sich die Trioxygenierung des B-Rings erwiesen: es waren lediglich Prodelphinidine aktiv, während Procyanidine keine Wirkung zeigten. Die Korrelation zwischen dem Hydroxylierungsgrad und dem antiadhäsiven Effekt wurde auch bei Flavan-3-olen an Hand steigender Aktivität mit zunehmender Anzahl von OH-Gruppen sichtbar (Epicatechin < Epigallocatechin < Epigallocatechingallat). EPs[®] 7630 bzw. die darin enthaltenen Proanthocyanidine sowie deren monomere Vorstufen sind demnach in der Lage, bakterielle Infektionen zu verhindern und können bei einer viralen Atemwegsinfektion als geeignete Präventionsmaßnahme helfen eine Komplikation durch Sekundärinfektionen zu verhüten.

- Inhibierung der Neuraminidase

Neben der Inaktivierung von Adhäsinen könnte eine Hemmung der Neuraminidase eine weitere Erklärung für die infektionshemmende Wirkung von EPs[®] 7630 sein. Dieses Enzym spielt sowohl bei bestimmten bakteriellen als auch bei einigen viralen (Influenza) Infektionen eine wichtige Rolle. Für Streptokokken scheint das Abspalten von Sialidinsäureresten an Wirtszelloberflächen mittels Neuraminidasen eine Voraussetzung für die Adhäsion zu sein ([Tong et al., 2000](#); [Gut et al., 2008](#)). Durch das enzymatische Entfernen der Sialidinsäure werden endogene Liganden auf Wirtszelloberflächen demaskiert und so erst eine Adhäsion ermöglicht. [Schwerdtfelger und Melzig \(2008\)](#) zeigten einen ausgeprägten inhibierenden Effekt *in vitro* auf eine bakterielle Neuraminidase (aus *Vibrio cholerae*) durch Umckaloabo[®] (IC₅₀ = 10 µg/ml). Im Rahmen dieses Dissertationsvorhabens wurden zusätzlich vergleichende Untersuchungen durchgeführt, die eine differenziertere Betrachtung ermöglichten. Im Vergleich zu den kommerziell erhältlichen Neuraminidasehemmern Oseltamivircarboxylat (IC₅₀ 53,7 µg/ml) und Zanamivir (IC₅₀ 18 µg/ml) war EPs[®] 7630 hochaktiv (IC₅₀ 1,25 µg/ml); die beiden Unterfraktionen MIP und MSP zeigten ähnliche IC₅₀-Werte. Die Dimerenfraktion war dagegen relativ schwach wirksam (47 µg/ml), was auf eine Abhängigkeit des Effektes von der Kettenlänge hindeutet. Auch hier zeigten die proanthocyanidinfreien Fraktionen keinen Effekt auf die Aktivität der Neuraminidase. Interessanterweise waren die im Adhäsionshemm-Experiment inaktiven Procyanidinfraktionen aus Birke, Weide, Weißdorn und Nelia (Tri- bis oligomere Procyanidine) relativ starke Neuraminidaseinhibitoren (IC₅₀ 3,5 - 29,4 µg/ml), wenn auch schwächer als EPs[®] 7630. Catechin hatte einen sehr schwachen hemmenden Effekt auf die Neuraminidase (IC₅₀ 436 µg/ml bzw. 1426 µM). Die Anwesenheit eines Gallussäurerestes führte wieder zu einer erheblichen Aktivitätssteigerung (IC₅₀ 131 µg/ml bzw. 298 µM für ECG und 16 µg/ml bzw. 37 µM für EGCG). Bei Monomeren ist demnach eine Trihydroxylierung am Ring B bzw. ein Gallussäurerest erforderlich, um eine starke Wirkung zu erzielen.

Eine Hemmung der Neuraminidase ist auch im Hinblick auf virale Infektionen interessant. Die Neuraminidase spielt bei der Knospung von Tochterviren eine entscheidende Rolle. Die neugebildeten Viren haften zunächst mit Hilfe von Hämagglutinin an Sialidinsäureresten der Wirtszelle. Durch Neuraminidasen werden diese Vernetzungen gespalten und die Viren in den interzellulären Raum entlassen

(Kap. 4.7.). Wird die Neuraminidase gehemmt, kommt es zu großen Virenaggregationen, die von Makrophagen vernichtet werden. Dadurch kann die Ausbreitung der Infektion unterbunden werden. Da die Substratbindungsstelle des Enzyms stark konserviert ist ([Grebe et al., 2008](#)) und auch Oseltamivircarboxylat und Zanamivir (Inhibitoren der Influenza-Neuraminidase) gegen die bakterielle Neuraminidase aus *Vibrio cholerae* bzw. *Streptococcus pneumoniae* ([Gut et al., 2011](#)) aktiv sind, ist bedingt davon auszugehen, dass Substanzen, die die bakterielle Neuraminidase inhibieren können auch gegen virale Neuraminidasen wirksam sind. Da bei den kommerziell verwendeten Substanzen zunehmend Resistenzen beobachtet werden ([Thorlund et al., 2011](#)), könnte EPs[®] 7630 hier eine sinnvolle Alternative bieten.

5.2.2. Immunmodulatorische Effekte

Eine weitere Erklärung der guten klinischen Wirksamkeit von Umckaloabo[®] könnte eine Verstärkung der Immunabwehr sein, wodurch eine bereits erfolgte Infektion besser bekämpft wird. Die Aktivierung von Makrophagen spielt dabei eine zentrale Rolle. Diese sind Teil der unspezifischen Immunabwehr und kommen in der Regel als erstes mit dem Pathogen in Kontakt. Nach der Phagozytose präsentiert der Makrophage mit Hilfe von MHC (I oder II) Antigene des Erregers auf seiner Oberfläche (Abbildung 72) ([Erza et al., 2010](#)). Diese Komplexe werden von naiven CD4⁺ (T_H0-Zellen) erkannt und induzieren die Reifung zu T_H-1 und T_H-2-Zellen, die wiederum die humorale (T_H-2) bzw. zelluläre (T_H-1) Immunantwort einleiten. In Folge ihrer Reifung sezernieren T_H-1-Lymphozyten IFN- γ und TNF- α , wodurch eine positive Rückkopplung auf den Makrophagen bewirkt wird und dieser nach der Aktivierung von Transkriptionsfaktoren zu vermehrter NO-Bildung angeregt wird, was zur intrazellulären Abtötung des Erregers führt. Außerdem sezernieren die durch IFN- γ stimulierten Makrophagen weitere proinflammatorische Zytokine wie IL-10, IL-12 und IL-18, die wiederum weitere Immunreaktionen wie Chemotaxis, Bildung von IgG in B-Zellen oder die Reifung von zytotoxischen Zellen zur Folge haben. Auf Grund dieser wichtigen Schlüsselstellung von Makrophagen in der Immunabwehr wurde die Wirkung von EPs[®] 7630 auf diesen Zelltyp in einem geeigneten Modell untersucht.

Der gewählte Versuchsaufbau (Kap. 3.5.3), bei dem murine Knochenmarksmakrophagen mit grün fluoreszierenden Leishmanien infiziert wurden,

ist ein gutes Modell zur Evaluierung der aktivierenden Eigenschaften von Testsubstanzen. Zum einen kann die Abtötung des intrazellulären Erregers relativ einfach durchflusszytometrisch bestimmt werden, zum anderen können im Zellkulturüberstand die produzierten Zytokine sowie das Folgeprodukt von NO , das Nitrit, nachgewiesen werden ([Kram et al., 2008](#)). Mit Hilfe dieser Daten konnte ein vielschichtiges Bild über die immunologischen Vorgänge gewonnen werden.

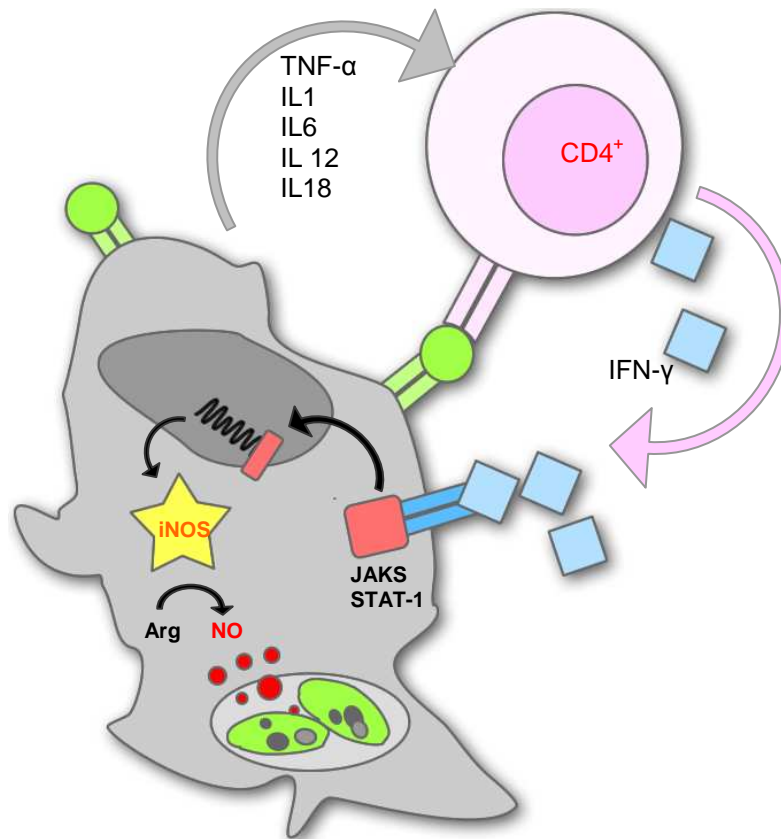


Abbildung 72: Schematische Darstellung der Aktivierung von Makrophagen.

Als Positivkontrolle wurden die Makrophagen mit 100 U/ml IFN- γ und 10 ng/ml LPS inkubiert. Diese Kombination induziert in Makrophagen eine starke NO -Produktion und damit verbunden die Abtötung des intrazellulären Erregers ([Kiderlen und Kaye, 1990](#)). Durch die Behandlung mit diesen Stimulanzen wurde die Parasitenlast der infizierten Makrophagen von 100% (Negativkontrolle) auf 24% verringert. Nach Inkubation mit EPs[®] 7630 bzw. MIP wurde die Erregerlast in den Makrophagen signifikant um 53% bzw. 52% reduziert. Bei beiden Extrakten (sowie der Positivkontrolle) war zudem eine hohe Nitritkonzentration im Zellkulturüberstand nachweisbar. Die Koinkubation von EPs[®] 7630 mit L-NMMA, einem selektiven Inhibitor der iNOS ([Liew et al., 1990](#)), hatte wieder eine „normale“ Infektionsrate von

100% und nur geringe Nitritkonzentration (somit auch geringe Bildung von $\cdot\text{NO}$) zur Folge. Diese Beobachtung lässt den Schluss zu, dass der antileishmanielle Effekt von EPs[®] 7630 auf einer induzierten Expression der iNOS beruht und nicht etwa auf einer direkten leishmaniziden Wirkung. Die Erreger befinden sich zum Zeitpunkt der Exposition mit der Testsubstanz im Phagosom der Makrophagen und sind auf diese Weise örtlich von den Testsubstanzen getrennt, was nur eine indirekte Wirkung der Extrakte zulässt. Diese Annahme wurde in vorangegangenen Studien von [Kayser \(1997\)](#) bestätigt. Hierzu wurden promastigote *Leishmanien* mit Umckaloabo[®] und ausgewählten isolierten Inhaltsstoffen (25,0-100 $\mu\text{g/ml}$) 24 h inkubiert. Im Vergleich zu Pentostam[®], einem Therapeutikum mit direkter antileishmanieller Wirkung, erwies sich Umckaloabo[®] nicht als leishmanizid und zeigte sogar einen wachstumsfördernden Effekt (ebenso Catechin und Gallussäure).

MSP sowie die hautpulverbehandelten, polyphenolfreien Extrakte als auch die Dimerenfraktion wiesen keine makrophagenaktivierende Wirkung auf. Dadurch wird klar, dass die in EPs[®] 7630 enthaltenen hochmolekularen Proanthocyanidine (MIP) die Bildung von $\cdot\text{NO}$ einleiten. Dies deckt sich auch mit den Studien von [Trun et al. \(2006\)](#). Mit *Leishmanien* infizierte RAW 264,7-Zellen zeigten dort lediglich nach Inkubation mit EPs[®] 7630 und MIP (nicht mit MSP) eine verstärkte Expression der iNOS mRNA. Mit den nun vorliegenden Ergebnissen konnte auch bewiesen werden, dass die gesteigerte Expression der iNOS mRNA letztlich auch zur Transkription des Enzyms und zur Bildung von $\cdot\text{NO}$ führt, das für das Abtöten des intrazellulären Erregers verantwortlich ist.

Vergleichende Testungen mit definierten Procyanidinfraktionen (Kap. 3.2.2) zeigten keine signifikante Abtötung der *Leishmanien*. Lediglich das Methanoleluat aus Ginkgoblättern konnte die Infektionsrate um 25% reduzieren. Die in diesem Extrakt enthaltenen Proanthocyanidine sind vorwiegend aus Delphinidineinheiten aufgebaut und weisen somit eine große strukturelle Ähnlichkeit zu den Proanthocyanidinen aus EPs[®] 7630 auf. Daher ist als Strukturvoraussetzung für die aktivierende Wirkung das Vorhandensein einer Trihydroxilierung am B-Ring anzunehmen.

Flavan-3-ole (EC, EGC, EGCG) sowie Quercetin und Quercetinglykoside induzieren keine Abwehrmechanismen in infizierten Makrophagen. Die Beobachtungen lassen eher eine immunsupprimierende Wirkung vermuten (leichte Erhöhung der Infektionsrate im Vergleich zur Kontrolle). Für monomere Flavan-3-ole wurden bereits eine Reihe antiinflammatorischer Effekte aufgezeigt, wie die Inhibierung der

iNOS ([Lin und Lin, 1997](#)), Hemmung der Bildung von TNF- α ([Yang et al. 1998](#)) oder auch die Hemmung des proinflammatorischen Zytokins IL-1 β . Diese Effekte könnten auch im vorliegenden Experiment für die fehlende antileishmanielle Aktivität der Testsubstanzen mitverantwortlich sein.

Zusätzlich zur durchflusszytometrischen Bestimmung der Infektionsrate wurde in Zellkulturüberständen der Makrophagen eine Quantifizierung des IL-12 und TNF- α Gehaltes mittels ELISA durchgeführt.

Wie bereits beschrieben, ist IL-12 ein wichtiges proinflammatorisches Zytokin, das aus zwei, über Disulfidbrücken verbundenen, Polypeptidketten (p35 und p40) aufgebaut ist. Während die p35-Untereinheit von vielen Zelltypen produziert wird, wird die p40-Untereinheit nur von zur Phagozytose fähigen Zellen (wie Makrophagen, neutrophilen Granulozyten oder dendritischen Zellen) transkribiert. Nur das Heterodimer (IL-12 p70) aus beiden Untereinheiten ist biologisch aktiv ([Hayes et al., 1995](#)) und wurde hier mit spezifischen Antikörpern erfasst. IL-12 spielt eine entscheidende Rolle bei der Bekämpfung von intrazellulären Erregern, in dem es vor allem die adaptive Immunantwort reguliert. Es induziert in natürlichen Killerzellen und T-Zellen die Bildung weiterer Lymphokine wie IFN- γ und TNF- α . Ferner ist es maßgeblich an der Differenzierung der CD4⁺-T-Lymphozyten zu T_H-1 Zellen beteiligt ([Trinchieri, 2003](#)). EPs[®] 7630 sowie sämtliche getestete Substanzen (außer der Positivkontrolle IFN- γ und LPS) waren aber nicht in der Lage, die infizierten Makrophagen zu einer nachweisbaren IL-12-Antwort zu stimulieren. Dies kann an der Manipulation der Makrophagen durch Leishmanien liegen, mit der der Erreger versucht, der intrazellulären Bekämpfung zu entkommen.

Interessanterweise zeigten mit EPs[®] 7630 behandelte Makrophagen jedoch eine ausgeprägte Bildung von TNF- α . Auch MIP, mit einem dominierenden Anteil an langkettigen Proanthocyanidinen, induzierte eine ähnliche Freisetzungsrates wie der Gesamtextrakt. Das Methanoleluat aus Ginkgoblättern induzierte ebenfalls eine - wenn auch deutlich schwächere - TNF- α -Bildung. Hier wurde wiederholt die Bedeutung der Trihydroxilierung des B-Ringes der Proanthocyanidine ersichtlich.

TNF- α ist ein weiteres proinflammatorisches Zytokin mit vielfältiger Wirkung. Neben dem Auslösen von Fieber und Unterdrückung des Appetits, stimuliert es rückkoppelnd Makrophagen zur vermehrten Phagozytose. Außerdem dient es als

Attractant für neutrophile Granulozyten ([Hehlgans und Pfeffer, 2005](#); [Roach et al., 2002](#)).

Weitere wichtige Mediatoren in der Immunabwehr sind Interferone, die in der Lage sind, einen Virusschutz in vielen Zelltypen zu induzieren und zytopathische Effekte nach einer viralen Infektion zu reduzieren. Ungeschützte Zellen dagegen werden in Folge der Infektion lysiert, was im *in vitro* Modell mikroskopisch als zellfreie Plaques sichtbar ist. Der durch Interferone vermittelte Virusschutz beruht nicht auf einer direkten Wirkung auf das Virus. Vielmehr binden die Zytokine an spezifische Rezeptoren der Wirtszellen und induzieren die Expression von bestimmten Genen („interferon stimulated genes“), die wiederum Proteine transkribieren, wie z. B. das M_x-Protein oder die 2'-5'-Oligoadenylatsynthase. Diese Enzyme hemmen selektiv die Translation viraler mRNA bzw. die Synthese viraler Proteine. Dabei ist die Wirkung der Interferone nicht spezifisch gegen eine bestimmte Virusart gerichtet ([Rolle und Mayr, 2007](#)). Für das Experiment wurde als Modellorganismus das murine Encephalomyocarditis Virus gewählt, mit dem IFN-sensitive L929-Fibroblasten infiziert wurden.

Wie vermutet hatte eine Vorbehandlung des Virus mit den Extrakten keinerlei Effekt auf die Infektionsrate. Ebenso waren vorbehandelte L929-Fibroblasten nicht vor einer Infektion geschützt. Die Extrakte sind also nicht in der Lage, die L929-Zellen direkt zur Bildung von antiviralen Proteinen zu stimulieren. Wurden jedoch murine BMM Φ mit EPs[®] 7630 24 h vorbehandelt, sezernierten diese offensichtlich Interferone, die (nach Übertragung des Überstandes auf die Fibroblasten) wiederum in L929-Zellen einen ausgeprägten Virusschutz induzierten, was sich in einer hohen Überlebensrate widerspiegelte. Neben EPs[®] 7630 war nur noch MIP wirksam. Diese Fraktion, bestehend aus hochpolymeren Proanthocyanidinen, bot einen doppelt so hoch ausgeprägten Virusschutz wie EPs[®] 7630. Die Tatsache, dass alle anderen Testsubstanzen (polyphenolfreie Fraktionen, Proanthocyanidine aus Weide, Birke, Weißdorn und Nelia, sowie monomere Vorstufen) keinen Effekt bewirkten, zeigt, dass in EPs[®] 7630 bzw. MIP besondere, langkettige Proanthocyanidine mit einer Trihydroxilierung am B-Ring vorliegen müssen, die in der Lage sind spezifische Rezeptoren der Makrophagen zu aktivieren und sie zu einer Ausschüttung von „Virusschutzproteinen“ anzuregen.

In den aktivierenden Makrophagenüberständen wurden demnach Interferone vermutet. Jedoch konnte kein IFN- γ mittels ELISA nachgewiesen werden. Auch der Nachweis von IFN- α und IFN- β war ohne Erfolg ([Thäle et al., 2011](#)). Die Ursache dafür könnte an der geringen Konzentration der Zytokine unterhalb der Nachweisgrenze liegen. Es ist aber auch nicht auszuschließen, dass es sich um einen bisher unbekanntem Aktivierungsmechanismus handelt.

5.3. Antioxidatives Potential

Im verwendeten Leishmanieninfektionsmodell spielte das Stickstoffoxid ($\cdot\text{NO}$) als mikrobizides Effektormolekül eine wichtige Rolle. Die biozide Wirkung ist nicht nur auf das $\cdot\text{NO}$ -Radikal selbst zurück zu führen, sondern viel mehr auf das hochreaktive Folgeprodukt aus $\cdot\text{NO}$ und Superoxid ($\text{O}_2^{\cdot-}$), das Peroxynitrit ($\text{ONOO}^{\cdot-}$) ([Mikkelsen et al., 2003](#); [Wardman, 2007](#)). Diese Verbindungen werden bei inflammatorischen Prozessen in großer Menge freigesetzt. Sie reagieren auf Grund ihres hohen Oxidationspotentials mit empfindlichen organischen Substanzen, wie der DNA, ungesättigten Fettsäuren in Zellmembranen oder Tyrosin- und Cysteinresten in Proteinen/Enzymen. Dadurch wird eine Reihe physiologischer Prozesse gestört und das Pathogen abgetötet. Diese Reaktionen sind normalerweise auf Grund der Kurzlebigkeit der Radikale lokal begrenzt, jedoch kann es bei lang anhaltenden bzw. besonders intensiven Immunreaktionen auch zur Schädigung des Wirtes kommen. Dieser Effekt wird in der Literatur als „Nitrosativer Stress“ beschrieben ([Habib und Ali, 2011](#); [Ignarro, 2011](#)) und mit Krankheiten, wie Bluthochdruck, Alzheimer oder Asthma in Verbindung gebracht.

Vor diesem Hintergrund könnte die Aktivierung von Makrophagen und Bildung großer Mengen an $\cdot\text{NO}$ durch EPs[®] 7630 neben der erwünschten Wirkung (Abtöten von Erregern) auch negative Folgen für den Organismus haben. Auf Grund der im Extrakt enthaltenen Polyphenole war jedoch von einer antioxidativen und damit gewissen protektiven Wirkung auszugehen. Zur Quantifizierung dieses Potentials wurden *in situ* generierte $\cdot\text{NO}$ -Radikale mit den Testsubstanzen kokubiert und der IC_{50} -Wert ermittelt (Kap. 4.13). Dabei zeigte EPs[®] 7630 ein ausgeprägtes $\cdot\text{NO}$ -Scavengingpotential (IC_{50} 160 $\mu\text{g}/\text{ml}$). Die daraus gewonnenen Fraktionen zeigten mit abnehmender Kettenlänge der Proanthocyanidine eine steigende Aktivität (MIP < MSP < Dimerenfraktion). Dagegen zeigten sich Flavan-3-ole vergleichsweise

schwach antioxidativ wirksam. Lediglich das EGCG wies eine moderate Aktivität auf (IC_{50} 513 μ M), die aber deutlich unter der von Quercetin (IC_{50} 366 μ M bzw. 111 μ g/ml) lag. Grund hierfür könnte die fehlende 4-Oxogruppierung bei EGCG sein, ohne die keine Mesomeriestabilisierung des Radikals erfolgen kann ([Bors et al, 1990](#)). Bei den getesteten Cumarinen war eine Steigerung der Aktivität mit zunehmenden Oxygenierungsgrad zu beobachten. Umckalin wies den niedrigsten IC_{50} -Wert von 114 μ M auf. Damit tragen die Cumarine trotz des geringen Gehaltes im EPs[®] 7630 zu der antioxidativen Wirkung bei.

Mit den vorliegenden Ergebnissen wurde zum ersten Mal das \cdot NO-Scavengingpotential von EPs[®] 7630 bestimmt. Das durch den Extrakt induzierte \cdot NO wird demnach durch die enthaltenen Polyphenole und Cumarine wieder neutralisiert, wodurch die unerwünschte zerstörerische Wirkung des Radikals wieder eingegrenzt werden kann.

6. Zusammenfassung

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurden sowohl photochemische als auch antiinfektive sowie immunmodulierende Eigenschaften des Spezialextraktes EPs[®] 7630 untersucht. Zu Vergleichszwecken wurden parallel selbsthergestellte Fraktionen, Reinsubstanzen sowie bereits im Arbeitskreis vorhandene definierte Proanthocyanidinextrakte mitgeführt. Auf diese Weise war es möglich Struktur-Wirkungsbeziehungen abzuleiten.

6.1. Phytochemische Ergebnisse

Mit Hilfe von präparativen Trennverfahren, wie der Säulenchromatografie oder der präparativen HPLC, konnten insgesamt 11 Inhaltstoffe (Tabelle 11) isoliert und mittels spektroskopischen Methoden (MS, NMR) strukturell aufgeklärt werden.

Tabelle 11: Isolierte Verbindungen aus EPs[®] 7630
Cumarine
Umckalin
6,8-Dihydroxy-5,7-dimethoxycumarin
5-Hydroxy-6,7-dimethoxycumarin-8-sulfat
Flavan-3-ole
Catechin/Epicatechin
Gallocatechin/Epigallocatechin
Proanthocyanidindimere
Gallocatechin-4 α ,8-epigallocatechin
Epicatechin-4 β ,8-epigallocatechin
Gallocatechin-4 α ,6-gallocatechin
Epigallocatechin-4 β ,8-epicatechin

Im Focus der Arbeit standen die Proanthocyanidine. Neben der erstmaligen detaillierten Strukturaufklärung von Dimeren aus EPs[®] 7630, mit Epigallocatechin-4 β ,8-epicatechin als neuen Naturstoff, konnten massenspektroskopisch oligomere Verbindungen mit bis zu sechs Untereinheiten nachgewiesen werden, die vorwiegend als Prodelphinidine anzusehen sind. Als Reaktionsprodukt nach Säurehydrolyse wurde das pentahydroxylierte Delphinidin, in Einklang mit den Daten aus den Massenspektren, identifiziert. Die spektroskopischen und chemischen Untersuchungen der Proanthocyanidine wurden durch die Bestimmung des

Gerbstoffanteils nach der Methode Europäischen Arzneibuch im Extrakt abgerundet (Polyphenolgehalt von ca. 22%).

Ergänzend zu der bekannten Vielzahl an Cumarinen war das Auffinden weiterer ungewöhnlicher Cumarine ein zusätzlicher phytochemischer Aspekt. In diesem Zusammenhang konnte das einzigartige Vorkommen sulfatierter Vertreter erneut belegt und mit 5-Hydroxy-6,7-dimethoxycumarin-8-sulfat und einem Monohydroxy-monomethoxy-cumarinsulfat in einer Mischung Hinweise auf neue Verbindungen in EPs[®] 7630 erhalten werden.

6.2. Ergebnisse biologischer Aktivitätsstudien

- Antiadhäsive Eigenschaften

EPs[®] 7630 bzw. die darin enthaltenen Proanthocyanidine verminderten das Adhäsionsvermögen von A-Streptokokken um bis zu 47% (bei einer Inkubationskonzentration von 30 µg/ml). Dabei war die Trihydroxilierung des B-Ringes der Flavan-3-ol Untereinheiten von entscheidender Bedeutung für die Aktivität, während der Polymerisierungsgrad eine untergeordnete Rolle spielte.

- Inhibition der Neuraminidase

EPs[®] 7630 zeigte eine bemerkenswert hohe inhibitorische Aktivität gegenüber der Neuraminidase (IC₅₀ ca. 1 µg/ml). Die kommerziell erhältlichen Arzneistoffe Zanamivir (IC₅₀ ca. 18 µg/ml) und Oseltamivircarboxylat (IC₅₀ ca. 54 µg/ml) waren deutlich schwächer aktiv in dem verwendeten *in vitro* Modell. Das Enzym wurde insbesondere von Proanthocyanidinen gehemmt, die eine Mindestkettenlänge von drei Untereinheiten haben.

- Makrophagenaktivierung zur Infektabwehr

EPs[®] 7630 zeigte ausgeprägte immunstimulierende Eigenschaften auf Makrophagen. Durch Inkubation von leishmanieninfizierten Makrophagen mit EPs[®] 7630 wurde die Erregerlast auf 52% verringert. Die biozide Wirkung korrelierte gut mit der induzierten Bildung von NO-Radikalen und beruhte somit nicht auf einer direkten toxischen Wirkung gegen Leishmanien, sondern auf der Aktivierung von zytotoxischen Abwehrmechanismen.

Makrophagen wurden nach Inkubation mit EPs[®] 7630 auch zur Sekretion von Zytokinen angeregt. Zwar konnte lediglich TNF- α mittels ELISA im Überstand nachgewiesen werden, nicht jedoch IL-12 und IFN- γ . Die mit EPs[®] 7630 behandelten nicht infizierten (332 pg/ml) als auch infizierten (432 pg/ml) Makrophagen produzierten im Vergleich zur Positivkontrolle (IFN- γ plus LPS; 225 pg/ml (nicht infizierte Zellen), 462 pg/ml (infizierte Zellen)) hohe Titer TNF- α .

Des Weiteren wurde durch die Behandlung EMCV-infizierter IFN-sensitiver L929-Fibroblasten mit den Überständen ein starker Virusschutz in den Zellen induziert. Die Wirkstärke entsprach der von ca. 24 U/ml eines IFN- γ Standards. Diese Hemmung des zytopathischen Effektes wird mit einer Interferonbildung assoziiert, welche unterhalb der Detektionsgrenze liegen musste.

- \cdot NO-Scavenging

Ergänzend zu bereits vorhandenen Arbeiten zum antioxidativen Potential, wurde EPs[®] 7630 als Fänger von \cdot NO-Radikalen in einem zellfreien Assay mit SNP als \cdot NO-Donor getestet. Der Extrakt zeigte ein Scavengingpotential mit einem IC₅₀-Wert von ca. 160 μ g/ml (Quercetin IC₅₀ ca. 110 μ g/ml), das auf den Gehalt von Polyphenolen sowie oligomeren Proanthocyanidinen zurückzuführen ist. Zum einen erwiesen sich polyphenolfreie Extrakte als inaktiv, zum anderen zeigte der Vergleich mit Proanthocyanidinen, dass das Hydroxylierungsmuster am Ring B der Flavan-3-ol Grundbausteinen ein wesentliches Strukturmerkmal darstellte: Prodelphinidine besaßen ein höheres \cdot NO-Radikalfängerpotential als Procyanidine.

7. Summary

In the present thesis phytochemical, anti-infective as well as immunomodulatory properties of the special extract EPs[®] 7630 were examined. For comparison purposes, self-made fractions, pure substances and defined proanthocyanidin extracts from the working group were tested in parallel. In this way it was possible to derive structure-activity relationships.

7.1. Phytochemical results

Using preparative separation techniques such as column chromatography or preparative HPLC a total of 11 ingredients were isolated. Structures were established by spectroscopic methods (MS, NMR) (Table 12).

Table 12: Isolated compounds of EPs[®] 7630

Coumarins
umckalin
6,8-dihydroxy-5,7-dimethoxycoumarin
5-hydroxy-6,7-dimethoxycoumarin-8-sulfate
Flavan-3-ols
Catechin/Epicatechin
Gallocatechin/Epigallocatechin
Proanthocyanidindimers
Gallocatechin-4 α ,8-epigallocatechin
Epicatechin-4 β ,8-epigallocatechin
Gallocatechin-4 α ,6-gallocatechin
Epigallocatechin-4 β ,8-epicatechin*

Proanthocyanidins were in the focus of the work. In addition to the first detailed structural analysis of dimers of EPs[®] 7630, oligomeric compounds, mostly regarded as prodelfhinidins, with up to six subunits could be detected mass spectrometrically. As a reaction product after acid hydrolysis the penta hydroxylated delphinidin was identified, in accordance with the data from the mass spectra. The spectroscopic and chemical studies of proanthocyanidins have been enhanced by the analysis of tannin content in the extract by the method in the Pharmacopoeia Europea (polyphenol content of ca. 22%). In addition to the known range of coumarins the discovery of

further coumarins was another phytochemical aspect. In this context the unique presence of sulfated representatives could be demonstrated again. Information on new compounds was obtained from a mixture of 5-hydroxy-6,7-dimethoxycoumarin-8-sulfate and a monohydroxy-monomethoxy-cumarinsulfate.

7.2. Results of biological activity studies

- Anti-adhesive properties

EPs[®] 7630 respectively the contained proanthocyanidins reduce the adhesiveness of group A streptococci by up to 47% (at an incubation concentration of 30 µg/ml). Here, the trihydroxylation of the B ring of the flavan-3-ol-subunits is of crucial importance for the activity, while the degree of polymerization plays a subordinate role.

- Inhibition of neuraminidase

EPs[®] 7630 has a remarkably high inhibitory activity against neuraminidase (IC₅₀ ca. 1 µg/ml). The commercially available drugs zanamivir (IC₅₀ ca. 18 µg/ml) and oseltamivir carboxylate (IC₅₀ ca. 54 µg/ml) are considerably less active in the used *in vitro* model. The enzyme is significantly inhibited by proanthocyanidins, with a minimum chain length of three subunits.

- Activation of macrophages for infection defense

EPs[®] 7630 showed strong immune-stimulating properties on macrophages. Incubation of *Leishmania* infected macrophages with 30 µg/ml EPs[®] 7630 reduced the parasite load to 52%. The biocidal activity correlated well with the induced formation of NO radicals and thus was not based on a direct toxic effect against *Leishmania*, but on the activation of cytotoxic immune mechanisms.

Furthermore macrophages, incubated with EPs[®] 7630, were stimulated to secrete cytokines. While only TNF-α was detected by ELISA in the supernatants, but not IL-12 and IFN-γ. The uninfected (332 pg/ml) and infected (432 pg/ml) macrophages treated with EPs[®] 7630 produced high titers of TNF-α, compared to the positive control (IFN-γ plus LPS; 225 pg/ml uninfected (cells), 462 pg/ml (infected cells)).

In addition, by the treatment of EMCV-infected IFN-sensitive L929 fibroblasts with the supernatants, a strong virus protection in the cells was induced. The potency was equivalent to about 24 U/ml of IFN- γ standards. This inhibition of the cytopathic effect is associated with interferon production, which was below the detection limit.

- \cdot NO -scavenging

Complementing existing work on the antioxidant potential of EPs[®] 7630, the extract has been tested as a scavenger of \cdot NO radicals in a cell-free assay using SNP as \cdot NO donor. The extract showed a scavenging potential with an IC₅₀ value of 160 μ g/ml (quercetin IC₅₀ 110 μ g/ml), which is attributable to the content of polyphenols and oligomeric proanthocyanidins. For one thing, polyphenol free extracts proved to be inactive. On the other hand, the comparison with proanthocyanidins represented that the hydroxylation at the B ring of the flavan-3-ol subunit is an essential structural feature: prodelphinidins had a higher \cdot NO scavenger potential than procyanidins.

- AGBABIKA TB, GUO R UND ERNST E. **2008**. *Pelargonium sidoides* for acute bronchitis: a systematic review and meta-analysis. *Phytomedicine* 15: 378-385.
- BACHERT C, SCHAPOWAL A, FUNK P UND KEISER M. **2009**. Treatment of acute rhinosinusitis with the preparation from *Pelargonium sidoides* EPs[®] 7630: a randomised, double-blind, placebo-controlled trial. *Rhinology* 47: 51-58.
- BASU MK UND RAY M. **2005**. Macrophage and Leishmania: an unacceptable coexistence. *Crit Rev Microbiol* 31: 145-154.
- BATE-SMITH EC UND METCALFE CR. **1957**. The nature and systematic distribution of tannins in dicotyledonous plants. *J Linn Soc Bot* 55: 669-705.
- BATE-SMITH EC UND LERNER NH. **1954**. Leucoanthocyanins. 2. Systematic distribution of leucoanthocyanins in leaves. *Biochem J* 58: 126-132.
- BEIL W UND KILIAN P. **2007**. EPs[®] 7630, an extract from *Pelargonium sidoides* roots inhibits adherence of *Helicobacter pylori* to gastric epithelial cells. *Phytomedicine* 14 Suppl 6: 5-8.
- BEREZNOY VV, RILEY DS, WASSMER G UND HEGER M. **2003**. Efficacy of extract of *Pelargonium sidoides* in children with acute non-group A beta-hemolytic streptococcus tonsillopharyngitis: a randomized, double-blind, placebo-controlled trial. *Altern Ther Health M* 9: 68-79.
- BLADT S UND WAGNER H. **2007**. From the Zulu medicine to the European phytomedicine Umckaloabo. *Phytomedicine* 14 Suppl 6: 2-4.
- BLADT S. **1974**. Zur Chemie der Inhaltsstoffe der *Pelargonium reniforme* Curt.-Wurzel (Umckaloabo). *Dissertation*. Ludwig-Maximilians-Universität, München.
- BLOCHIN B, HAIDVOGL H UND HEGER M. **1999**. Umckaloabo im Vergleich zu Acetylcystein bei Kindern mit acuter Bronchitis: prospective, randomisierte, kontrollierte, offene Studie zur Wirksamkeit und Verträglichkeit. *Der Kassenarzt* 49: 46-50.
- BORS W, HELLER W, MICHEL C UND SARAN M. **1990**. Flavonoids as antioxidants: Determination of radical-scavenging efficiencies. *Methods Enzymol* 186: 343-355.
- BRENDLER T UND VAN WYK BE. **2008**. A historical, scientific and commercial perspective on the medicinal use of *Pelargonium sidoides* (Geraniaceae). *J Ethnopharmacol* 119: 420-433.
- BROADHURST RB UND JONES WT. **1978**. Analyses of condensed tannins using acidified vanillin. *J Sci Food Agr* 29: 788-794.
- BROWN D. **2009**. *Pelargonium sidoides* Extract (EPs[®] 7630): Alternative Treatment of Acute Upper Respiratory Tract Infections. *Nat Med J* 1: 1-6.

- CHANG WC UND HSU FL. **1989**. Inhibition of platelet aggregation and arachidonate metabolism in platelets by procyanidins. *Prostag Leukotr Ess* 38: 181-188.
- CHOI JS, CHUNG HY, KANG SS, JUNG MJ, KIM JW, NO JK UND JUNG HA. **2002**. The structure-activity relationship of the flavonoids as scavengers of peroxynitrite. *Phytother Res* 16: 232-235.
- CHUCHALIN AG, BERMAN B UND LEHMACHER W. **2005**. Treatment of acute bronchitis in adults with a *Pelargonium sidoides* preparation (EPs[®] 7630): a randomized, double-blind, placebo-controlled trial. *Explore* 1: 437-445.
- COMALADA M, BALLESTER I, BAILÓN E, SIERRA S, XAUS J, GÁLVEZ J, DE MEDINA FS UND ZARZUELO A. **2006**. Inhibition of pro-inflammatory markers in primary bone marrow-derived mouse macrophages by naturally occurring flavonoids: analysis of the structure-activity relationship. *Biochem Pharmacol* 72: 1010-1021.
- CONRAD A UND SCHULZ V. **2007d**. Umckaloabo bei akuter Bronchitis. *Dt Apotheker Ztg* 147: 87-91.
- CONRAD A, HANSMANN C, ENGELS I, DASCHNER FD UND FRANK U. **2007a**. Extract of *Pelargonium sidoides* (EPs[®] 7630) improves phagocytosis, oxidative burst, and intracellular killing of human peripheral blood phagocytes *in vitro*. *Phytomedicine* 14 Suppl 6: 46-51.
- CONRAD A, JUNG I, TIOUA D, LALLEMAND C, CARRAPATOSO F, ENGELS I, DASCHNER FD UND FRANK U. **2007b**. Extract of *Pelargonium sidoides* (EPs[®] 7630) inhibits the interactions of group A-streptococci and host epithelia *in vitro*. *Phytomedicine* 14 Suppl 6: 52-59.
- CONRAD A, KOLODZIEJ H UND SCHULZ V. **2007c**. *Pelargonium sidoides* Extrakt (EPs[®] 7630): Zulassung bestätigt Wirksamkeit und Verträglichkeit. *Wien Med Wochenschr* 157: 331-336.
- COS P, DEBRUYNE T, HERMANS N, APERS S, VANDEN BERGHE D UND VLIETINCK AJ. **2003**. Proanthocyanidins in health care: Current and new trends. *Curr Med Chem* 10: 1345-1359.
- COURTNEY HS, HASTY DL UND DALE JB. **2002**. Molecular mechanisms of adhesion, colonization and invasion of group A-streptococci. *Ann Med* 34: 77-87.
- DAFF S. **2010**. NO synthase: Structures and mechanisms. *Nitric Oxide* 23: 1-11.
- DE LA IGLESIA R, MILAGRO FI, CAMPIÓN J, BOQUÉ N UND MARTÍNEZ JA. **2010**. Healthy properties of proanthocyanidins. *Biofactors* 36: 159-68.
- DEBRUYNE T, PIETERS LA, DOMMISSE RA, KOLODZIEJ H, WRAY V, DOMKE T UND VLIETINCK A. **1996**. Unambiguous assignments for free dimeric proanthocyanidin phenols from 2D NMR. *Phytochemistry* 43: 265-272.

- ELIEL EL, BAILEA WF, KOPP LD, WILLER RC, GRANT DM, BERTRAND R, CHRISTENSEN KA, DALLING DK, DUCH MW, WENKERT E, SCHELL FM UND COCHRAN DW. **1975**. Carbon-13 magnetic resonance. Upfield shifts caused by nitrogen, oxygen and fluorine atoms located at the gamma position and antiperiplanar to the nucleus observed. *J Am Chem Soc* 97: 322-330.
- ERDELMEIER. **2010**. Persönliche Mitteilung.
- ERDELMEIER C, HAUER H UND KOCH E. **2003**. *World Patent* WO2003028746.
- EUROPÄISCHES ARZNEIBUCH **2008**. Kap. 2.8.14. Bestimmung des Gerbstoffgehalts pflanzlicher Drogen. *Deutscher Apotheker Verlag*. Stuttgart. 6.0: 278.
- EZRA N, OCHOA MT UND NOAH CRAFT N. **2010**. Human immunodeficiency virus and leishmaniasis. *J Global Infect Dis* 2: 248-257.
- FLETCHER AC, PORTER LJ UND HASLAM E. **1977**. Conformational and configurational studies of natural procyanidins. *J Chem Soc Perkin Trans I*: 1628-1637.
- FOO LY UND PORTER LJ. **1978**. Prodelphinidin polymers: Definition of structural units. *J Chem Soc Perkin Trans I*: 1186-1190.
- FOO LY, LU Y, MOLAN AL, WOODFIELD DR UND MCNABB WC. **2000**. The phenols and prodelphinidins of white clover flowers. *Phytochemistry* 54: 539-548.
- GÖDECKE T, KALOGA M UND KOLODZIEJ H. **2005**. A phenol glucoside: uncommon coumarins and flavonoids from *Pelargonium sidoides* DC. *Z Naturforsch* 60b: 677-682.
- GÖDECKE T. **2005**. Phytochemische und pharmakologische Untersuchungen an *Pelargonium sidoides* DC. *Dissertation*. Freie Universität. Berlin.
- GREBE KM, YEWDELL JW UND BENNINK JR. **2008**. Heterosubtypic Immunity To Influenza A Virus: Where Do We Stand? *Microbes Infect* 10: 1024-1029.
- GUAY DR. **2009**. Cranberry and urinary tract infections. *Drugs* 69: 775-807.
- GUT H, XU G, TAYLOR GL UND WALSH MA. **2011**. Structural basis for *Streptococcus pneumoniae* NanA inhibition by influenza antivirals zanamivir and oseltamivir carboxylate. *J Mol Biol* 409: 496-503.
- GUT H, KING SJ UND WALSH MA. **2008**. Structural and functional studies of *Streptococcus pneumoniae* neuraminidase B: An intramolecular *trans*-sialidase. *FEBS Letters* 582: 3348-3352.
- HABIB S UND ALI A. **2011**. Biochemistry of nitric oxide. *Indian J Clin Biochem* 1: 3-17.
- HAIIDVOGL M UND HEGER M. **2007**. Treatment effect and safety of EPs[®] 7630-solution in acute bronchitis in childhood: Report of a multicentre observational study. *Phytomedicine* 14 Suppl 1: 60-64.

- HAKIM TS, SUGIMORI K, CAMPORESI EM UND ANDERSON G. **1996**. Half-life of nitric oxide in aqueous solutions with and without haemoglobin. *Physiol Meas* 17: 267-277.
- HANDMAN E UND BULLEN DV. **2002**. Interaction of Leishmania with the host macrophage. *Trends Parasitol* 18: 332-334.
- HASHIMOTO F, NONAKA G UND NISHIOKA I. **1989**. Tannins and related compounds: XC. 8-C-Ascorbyl (-)-epigalloatechin 3-O-gallate and novel dimeric flavan-3-ols, Oolonghomobisflavans A and B, from Oolong tea. *Chem Pharm Bull* 37: 3255-3263.
- HASLAM E. **1996**. Natural polyphenols (vegetable tannins) as drugs: possible modes of action. *J Nat Prod* 59: 205-215.
- HASTY DL, OFEK I, COURTNEY HS UND DOYLE RJ. **1992**. Multiple adhesins of streptococci. *Infect Immun* 60: 2147-2152.
- HAYANO S UND TANAKA A. **1967**. Streptococcal sialidase. I. Isolation and properties of sialidase produced by group K Streptococcus. *J Bacteriol* 93: 1753-7.
- HAYES MP, WANG J UND NORCROSS MA. **1995**. Regulation of interleukin-12 expression in human monocytes: selective priming by interferon-gamma of lipopolysaccharide-inducible p35 and p40 genes. *Blood* 86: 646.
- HEHLGANS T UND PFEFFER K. **2005**. The intriguing biology of the tumour necrosis factor/ tumour necrosis factor receptor superfamily: players, rules and the games. *Immunology* 115: 1-20.
- HINOUE H, KUROGOCHI M, SHIMIZU H UND NISHIMURA S. **2005**. Characterization of *Vibrio cholerae* neuraminidase by a novel mechanism-based fluorescent labeling reagent. *Biochemistry* 35: 11669-11675.
- HÖLZL J, **1992**. Inhaltsstoffe von *Ginkgo biloba*. *Pharm Uns Zeit* 5: 215-223.
- IGNARRO LJ. **2009**. Nitric Oxide-Biology and Pathobiology. *Academic Press*. Waltham. ISBN-13: 978-0123738660
- IVANKOVICH AD, MILETICH DJ UND TINKER JH. **1978**. Sodium nitroprusside: metabolism and general considerations. *Int Anesthesiol Clin* 16: 1-29.
- KAMIN W, MAYDANNIK V, MALEK FA UND KIESER M. **2010b**. Efficacy and tolerability of EPs[®] 7630 in children and adolescents with acute bronchitis - a randomized, double-blind, placebo-controlled multicenter trial with a herbal drug preparation from *Pelargonium sidoides* roots. *J Clin Pharmacol Ther* 48: 184-191.
- KAMIN W, MAYDANNIK VG, MALEK FA UND KIESER M. **2010a**. Efficacy and tolerability of EPs[®] 7630 in patients (aged 6-18 years old) with acute bronchitis. A randomised, double-blind, placebo-controlled clinical dose-finding study. *Acta Paediatr* 99: 537-543.

- KAYSER O UND KOLODZIEJ H. **1997**. Antibacterial activity of extracts and constituents of *Pelargonium sidoides* and *Pelargonium reniforme*. *Planta Med* 63: 508-510.
- KAYSER O UND KOLODZIEJ H. **1995**. Highly Oxygenated Coumarins from *Pelargonium sidoides*. *Phytochemistry* 39: 1181-1185.
- KAYSER O, KOLODZIEJ H UND KIDERLEN AF. **2001**. Immunomodulatory principles of *Pelargonium sidoides*. *Phytother Res* 15: 122-6.
- KAYSER O. **1997**. Phenolische Inhaltsstoffe von *Pelargonium Sidoides* DC. Und Untersuchungen zur Wirksamkeit der Umcka-Droge (*Pelargonium sidoides* DC. und *Pelargonium reniforme* CURT.) *Dissertation*. Freie Universität. Berlin.
- KIDERLEN AF UND KAYE PM. **1990**. A modified colorimetric assay of macrophage activation for intracellular cytotoxicity against *Leishmania* parasites. *J Immun Meth* 127: 11-18
- KOCH E UND BIBER A. **2007a**. Treatment of rats with the *Pelargonium sidoides* extract EPs[®] 7630 has no effect on blood coagulation parameters or on the pharmacokinetics of warfarin. *Phytomedicine* 14 Suppl 1: 40-45.
- KOCH E UND WOHN C. **2007b**. *Pelargonium sidoides* root extract EPs[®] 7630 stimulates release of antimicrobial peptides from neutrophil granulocytes in human whole blood. *Planta Med* 73: 846.
- KOLODZIEJ H UND KAYSER O. **1998**. *Pelargonium sidoides* DC. Neueste Erkenntnisse zum Verständnis des Phytotherapeutikums Umckaloabo. *Z Phytother* 19: 141-151.
- KOLODZIEJ H UND SCHULZ V. **2003**. Umckaloabo. Vor der traditionellen Anwendung zum modernen Phytotherapeutikum. *Dt Apotheker Ztg* 143: 55-64.
- KOLODZIEJ H, BURMEISTER A, TRUN W, RADTKE OA, KIDERLEN AF, ITO H, HATANO T, YOSHIDA T UND YEAP FOO L. **2005**. Tannins and related compounds induce nitric oxide synthase and cytokines gene expressions in *Leishmania major*-infected macrophage-like RAW 264.7 cells. *Bioorg Med Chem* 13: 6470-6476.
- KOLODZIEJ H, FERREIRA D UND ROUX DG. **1984b**. Synthesis of Condensed Tannis. Part 12. Direct Access to [4,6] and [4,8] - all-2,3-cis-Procyanidin Derivatives from (-)-Epicatechin: Assessment of Bonding Positions in Oligomeric Analogues from *Crataegus oxyacantha* L. *J Chem Soc Perkin Trans* 1: 343-350.
- KOLODZIEJ H, KAYSER O UND TAN N. **2002**. Novel coumarin sulphates from *Pelargonium sidoides*: isolation, structure and synthetic approach. Natural Products in the New Millennium: Prospects and Industrial Application. *Springer Verlag*. Heidelberg. 59-65.
- KOLODZIEJ H, KAYSER O, RADTKE OA, KIDERLEN AF UND KOCH E. **2003**. Pharmacological profile of extracts of *Pelargonium sidoides* and their constituents. *Phytomedicine* 10 Suppl 4: 18-24.

- KOŁODZIEJ H, KAYSER O, WOERDENBAG HJ, VAN UDEN W UND PRAS N. **1997**. Structure-cytotoxicity relationships of a series of natural and semi-synthetic simple coumarins as assessed in two human tumour cell lines. *Z Naturforsch C* 52: 240-244.
- KOŁODZIEJ H. **1984a**. Occurrence of Proanthocyanidins in *Nelia meyeri*. *Phytochemistry* 23: 1745-1752.
- KOŁODZIEJ H. **1988**. Procyanidins from medicinal birch: bonding patterns and sequence of units in triflavanoids of mixed stereochemistry. *Phytochemistry* 28: 3487-3492.
- KOŁODZIEJ H. **1990**. Oligomeric flavan-3-ols from medicinal willow bark. *Phytochemistry* 29: 955-960.
- KOŁODZIEJ H. **2000**. Traditionally used *Pelargonium* species: chemistry and biological activity of umckaloabo extracts and their constituents. *Curr Topic Phytochem* 3: 77-93.
- KOŁODZIEJ H. **2007**. Fascinating metabolic pools of *Pelargonium sidoides* and *Pelargonium reniforme*: traditional and phytomedicinal sources of the herbal medicine Umckaloabo. *Phytomedicine* 14 Suppl 6: 9-17.
- KOŁODZIEJ H. **2008**. Aqueous ethanolic extract of the roots of *Pelargonium sidoides*-New scientific evidence for an old anti-infective phytopharmaceutical. *Planta Med* 74: 661-666.
- KOŁODZIEJ H. **2011**. Antimicrobial, antiviral and immunomodulatory activity studies of *Pelargonium sidoides* (EPs[®] 7630) in health promotion. *Pharmaceuticals* 4: 9-17.
- KOŁODZIEJ H. UND KIDERLEN A.F. **2007**. In vitro evaluation of antibacterial and immunomodulatory activities of *Pelargonium reniforme*, *Pelargonium sidoides* and the related herbal drug preparation EPs[®] 7630. *Phytomedicine* 14: 18-26.
- KONDO K, KURIHARA M, MIYATA N, SUZUKI UND TOYODA M. **1999**. Scavenging mechanisms of (-)-epigallocatechin gallate and (-)-epicatechin gallate on peroxy radicals and formation of superoxide during the inhibitory action. *Free Rad Bio Med* 27: 855-863.
- KRAM D, THÄLE C, KOŁODZIEJ H, KIDERLEN AF. **2008**. Intracellular parasite kill: flow cytometry and NO detection for rapid discrimination between anti-leishmanial activity and macrophage activation. *J Immunol Methods* 333: 79-88.
- KUBBA R UND AL-GINDAN Y. **1989**. Leishmaniasis *Dermatol Clin* 2:331-51.
- LATTÉ KP, KAYSER O, TAN N, KALOGA M UND KOŁODZIEJ H. **2000**. Unusual coumarin pattern of *Pelargonium* species forming the origin of the traditional herbal medicine Umckaloabo. *Z Naturforsch* 55c: 528-533.

- LEWU FB, ADEBOLA PO UND AFOLAYAN AJ. **2007**. Commercial harvesting of *Pelargonium sidoides* in the Eastern Cape, South Africa: Striking a balance between resource conservation and rural livelihoods. *J Arid Environ* 70: 380-388.
- LIEW FY, MILLOTT S, PARKINSON C, PALMER RMJ UND MONCADA S. **1990**. Macrophage killing *Leishmania* parasite *in vivo* is mediated by nitric oxide from L-arginine. *J Immun* 144: 4794-4797.
- LIN YL UND LIN JK. **1997**. (-)-Epigallocatechin-3-gallate blocks the induction of nitric oxide synthase by down-regulating lipopolysaccharide-induced activity of transcription factor nuclear factor-kappa B. *Mol Pharmacol* 52: 465-72.
- LIZOGUB VG, RILEY DS UND HEGER M. **2007**. Efficacy of a *Pelargonium sidoides* preparation in patients with the common cold: a randomized, double blind, placebo-controlled clinical trial. *Explore* 3: 573-584.
- LOEW D, HAUER H UND KOCH E. **2009**. Cumarine in pflanzlichen Arzneimitteln. *Pharm Ztg* 7: 25-30.
- MAJERUS PW UND TOLLEFSEN DM. **2001**. Anticoagulant, thrombolytic and antiplatelet drugs. *The Pharmacological Basis of Therapeutics* 10: 1519-1538.
- MALIK A, KULIEV ZA, AKHMEDOV YA, VDOVIN A.D UND ABDULIAE ND. **1997**. Proanthocyanidins of *Ziziphuy jujuba*. *Chem Nat Comp* 33: 165-173.
- MATTHYS H UND HEGER M. **2007**. Treatment of acute bronchitis with a liquid herbal drug preparation from *Pelargonium sidoides* (EPs[®] 7630): a randomised, double-blind, placebo-controlled, multicentre study. *Curr Med Res Opin.* 23: 323-331.
- MATTHYS H UND FUNK P. **2008**. EPs[®] 7630 improves acute bronchitic symptoms and shortens time to remission. Results of a randomized, double-blind, placebo-controlled, multicentre trial. *Planta Med* 74: 686-692.
- MATTHYS H, EISEBITT R, SEITH B UND HEGER M. **2003**. Efficacy and safety of an extract of *Pelargonium sidoides* (EPs[®] 7630) in adults with acute bronchitis. A randomised, double-blind, placebo-controlled trial. *Phytomedicine* 10 Suppl 4: 7-17.
- MATTHYS H, KAMIN W, FUNK P UND HEGER M. **2007**. *Pelargonium sidoides* preparation (EPs[®] 7630) in the treatment of acute bronchitis in adults and children. *Phytomedicine* 14 Suppl 6: 69-73.
- MIKKELSEN RB UND WARDMAN P. **2003**. Biological chemistry of reaktive oxygen and nitrogen and ionizing radiation-induced signal transduction mechanisms. *Oncogene* 22: 5734-5754.
- MOSHAGE H, KOK B, HIUZENGA JR UND JANSEN PLM. **1995**. Nitrite and nitrate determination in plasma: a critical evaluation. *Clin Chem* 41: 892-895.

- MU MM, CHAKRAVORTTY D, SUGIYAMA T, KOIDE N, TAKAHASHI K, MORI I, YOSHIDA T UND YOKOCHI T. **2001**. The inhibitory action of quercetin on lipopolysaccharide-induced nitric oxide production in RAW 264.7 macrophage cells. *J Endotoxin Res* 7: 431-438.
- NEUGEBAUER P, MICKENHAGEN A, SIEFER O UND WALGER M. **2005**. A new approach to pharmacological effects on ciliary beat frequency in cell cultures-exemplary measurements under *Pelargonium sidoides* extract (EPs[®] 7630). *Phytomedicine* 12: 46-51.
- NÖLDNER M UND SCHÖTZ K. **2007**. Inhibition of lipopolysaccharid-induced sickness behavior by a dry extract from the roots of *Pelargonium sidoides* (EPs[®] 7630) in mice. *Phytomedicine* 14 Suppl 6: 27-31.
- OLIVIER M, GREGORY DJ UND FORGET G. **2005**. Subversion Mechanisms by Which *Leishmania* Parasites Can Escape the Host Immune Response: a Signaling Point of View. *Clin Microbiol Rew* 18: 293-305.
- PAPPAS E UND SCHAICH KM. **2009**. Phytochemicals of cranberries and cranberry products: characterization, potential health effects, and processing stability. *Crit Rev Food Sci Nutr* 49: 741-81.
- PAZOS M, IGLESIAS J, MAESTRE R UND MEDINA I. **2010**. Structure-activity relationships of polyphenols to Prevent lipid oxidation in pelagic fish muscle. *J Agr Food Chem* 10.
- PETEREIT F, KOLODZIEJ H UND NAHRSTEDT A. **1991**. Flavan-3-ols and proanthocyanidins from *Cistus incanus*. *Phytochemistry* 30: 981-985.
- PLUZNICK DH UND SACHS L. **1965**. The cloning of normal "mast" cells in tissue culture. *J Cell Physiol* 66: 319-324.
- PRASHER DC, ECKENRODE VK, WARD WW, PRENDERGAST FG UND CORMIER MJ. **1992**. Primary structure of the *Aequorea victoria* green-fluorescent protein. *Gene* 111: 229-233.
- PRIOR RL, LAZARUS SA, CAO G, MUCCITELLI H UND HAMMERSTONE JF. **2001**. Identification of procyanidins and anthocyanins in blueberries and cranberries (*Vaccinium spp.*) using high-performance liquid chromatography/mass spectrometry. *J Agr Food Chem* 49: 1270-1276.
- QUIDEAU S, DEFFIEUX D, DOUAT-CASASSUS C UND POUYSÉGU L. **2011**. Plant polyphenols: chemical properties, biological activities, and synthesis. *Angew Chem Int Ed Engl*. 50: 586-621.
- QURESHI AA, TAN X, REIS JC, BADR MZ, PAPASIAN CJ, MORRISON DC UND QURESHI N. **2011**. Inhibition of nitric oxide in LPS-stimulated macrophages of young and senescent mice by delta-tocotrienol and quercetin. *Lipids Health Dis* 10: 239.
- REED JD, KRUEGER CG UND VESTLING MM. **2005**. MALDI-TOF mass spectrometry of oligomeric food polyphenols. *Phytochemistry* 66: 2248-2263.

- REED JD. **1995**. Nutritional toxicology of tannins and related polyphenols in forage legumes. *J Anim Sci* 73: 1516-1528.
- RICE-EVANS CA, MILLER NJ UND PAGANGA G. **1996**. Structure-antioxidant activity relationships of flavonoids and phenolic acids. *Free Radical Biol Med* 20: 933-956.
- ROACH DR, BEAN AG, DEMANGEL C, FRANCE MP, BRISCOE H UND BRITTON WJ. **2002**. TNF regulates chemokine induction essential for cell recruitment, granuloma formation, and clearance of mycobacterial infection. *J Immunol* 168: 4620-4627.
- ROACH TIA, KIDERLEN AF UND BLACKWELL JM. **1991**. Role of inorganic nitrogen oxides and tumor necrosis factor alpha in killing *Leishmania donovani* in gamma interferon-lipopolysaccharide-activated macrophages from *Lsh^s* and *Lsh^f* congenic mouse strains. *Infect Immun* 59: 3935-3944.
- ROBERTS JD, WEIGERT FJ, KROSCWITZ J UND REICH HJ. **1970**. Nuclear magnetic resonance spectroscopy. Carbon-13 chemical shifts in acyclic and alicyclic alcohols. *J Am Chem Soc* 92: 1338-1347.
- ROLLE M UND MAYR A. **2007**. Medizinische Mikrobiologie, Infektions- und Seuchenlehre. *Georg Thieme Verlag*. Stuttgart.
- ROUX, D.G., FERREIRA, D, UND MALAN, E. **1975**. Structure, stereochemistry, and reactivity of natural condensed tannins as basis for their extended industrial application. *Appl Polym Symp* 28: 335-353.
- SARAIVA EM, PINTO-DA-SILVA LH, WANDERLEY JLM, BONOMO AC, BARCINSKI MA UND MOREIRA MEC. **2005**. Flow cytometric assessment of *Leishmania* spp. metacyclic differentiation: Validation by morphological features and specific markers. *Exp Parasitol* 110: 39-47.
- SCHNITZLER P, SCHNEIDER S, STINTZING FC, CARLE R UND REICHLING J. **2008**. Efficacy of an aqueous *Pelargonium sidoides* extract against herpesvirus. *Phytomedicine* 15: 1108-1116.
- SCHOETZ K, ERDELMEIER C, GERMER S UND HAUER H. **2008**. A detailed view on the constituents of EPs[®] 7630. *Planta Med* 74: 667-674.
- SCHÖTZ K UND NÖLDNER M. **2007**. Mass spectroscopic characterisation of oligomeric proanthocyanidins derived from an extract of *Pelargonium sidoides* roots (EPs[®] 7630) and pharmacological screening in CNS models. *Phytomedicine* 14 Suppl 6: 32-39.
- SCHWERDTFEGER S UND MELZIG F. **2008**. Wirkung von Pflanzenextrakten auf die Neuraminidase-Aktivität. *Z Phytother* 29: 65-70.
- SECHEHAYE A. **1930**. Le Traitement de la tuberculose pulmonaire et chirurgicale par l'umckaloabo, médication interne ("Stevens cure"), historique, recherches expérimentales, observations cliniques, résultats. Paris

- SETHMAN CR, DOYLE RJ UND COWAN MM. **2002**. Flow cytometric evaluation of adhesion of *Streptococcus pyogenes* to epithelial cells. *J Microbiol Meth* 51: 35-42.
- SRINIVASAN V, SPENCE DW, PANDI-PERUMAL SR, BROWN GM UND CARDINALI DP. **2011**. Melatonin in mitochondrial dysfunction and related disorders. *Int J Alzheimers Dis* 11:326320.
- SUN D, WONG H UND FOO LY. **1987**. Proanthocyanidin dimers and polymers from *Quercus dentata*. *Phytochemistry* 26: 1825-1829.
- SUN J, ZHANG X, BRODERICK M UND FEIN H. **2003**. Measurement of nitric oxide in biological systems by using griess reaction assay. *Sensors* 3: 276-284.
- TANNENBAUM SR. **1979**. Nitrate and nitrite: origin in humans. *Science* 205: 1334-1337.
- TARASCOU I, SOUQUET JM, MAZAURIC JP, CARRILLO S, COQ S, CANON F, FULCRAND H UND CHEYNIER V. **2010**. The hidden face of food phenolic composition. *Arch Biochem Biophys* 501: 16-22.
- TAYLOR PW, MAALIM S UND COLEMAN S. **2005**. The strange story of Umckaloabo. *Pharm J* 275: 790-792.
- TAYLOR PW. **2003**. Antimycobacterial activity of indigenous South African plants. *S Afr Med J* 93: 904-906.
- TERAO J. **2009**. Dietary flavonoids as antioxidants. *Forum Nutr* 61: 87-94.
- THÄLE C, KIDERLEN A UND KOLODZIEJ H. **2008**. Anti-infective mode of action of EPs[®] 7630 at the molecular level. *Planta Med* 74: 675-681.
- THÄLE C, KIDERLEN AF UND KOLODZIEJ H. **2011**. Anti-infective activities of *Pelargonium sidoides* (EPS[®] 7630): effects of induced NO production on *Leishmania major* in infected macrophages and antiviral effects as assessed in a fibroblast-virus protection assay. *Planta Med* 77: 718-25.
- THORLUND K, AWAD T, BOIVIN G UND THABANE L. **2011**. Systematic review of influenza resistance to the neuraminidase inhibitors. *BMC Infect Dis* 11:134.
- TITS M, ANGENOT L, POUKENS P, WARIN R UND DIERCXSENS Y. **1992**. Prodelphinidins from *Ribes nigrum*. *Phytochemistry* 31: 971-973.
- TONG HH, BLUE LE, JAMES MA UND DEMARIA TF. **2000**. Evaluation of the virulence of a *Streptococcus pneumoniae* neuraminidase-deficient mutant in nasopharyngeal colonization and development of otitis media in the chinchilla model. *Infect Immun* 68: 921-924.
- TRINCHIERI G. **2003**. Interleukin-12 and the regulation of innate resistance and adaptive immunity. *Nat Rev Immunol* 3: 133.

- TRUN W, KIDERLEN AF UND KOLODZIEJ H. **2006**. Nitric oxide synthase and cytokines gene expression analyses in *Leishmania*-infected RAW 264.7 cells treated with an extract of *Pelargonium sidoides* (EPs[®] 7630). *Phytomedicine* 13: 570-575.
- TSIKAS D. **2007**. Analysis of nitrite and nitrate in biological fluids by assays based on the griess reaction: appraisal of the griess reaction in the L-arginine/nitric oxide area of research. *J Chrom B* 851: 51-70.
- VAN ACKER SABE, DE GROOT MJ, VAN DEN BERG DJ, TROMP MNJL, DONNÉ-OP DEN KELDER G, VAN DER VIJGH WJF AND BAST A. **1996**. A quantum chemical explanation of the antioxidant activity of flavanoids. *Chem Res Toxicol* 9: 1305-1312.
- VAN DER WALT JJA. **1988**. Pelargoniums of southern Africa. National Botanic Gardens, Kirstenbosch, South Africa. 3: 129-131.
- VAN SITTERT NJ UND TUINMAN CP. **1994**. Coumarin derivatives (rodenticides). *Toxicology* 91: 71-76.
- VARGHESE JN, MCKIMM-BRESCHKIN JL, CALDWELL JB, KORTT AA UND COLMAN PM. **1992**. The structure of the complex between influenza virus neuraminidase and sialic acid, the viral receptor. *Proteins* 14:327-32.
- WADSWORTH TL UND KOOP DR. **2001**. Effects of Ginkgo biloba extract (EGb 761) and quercetin on lipopolysaccharide-induced release of nitric oxide. *Chem Biol Interact* 137: 43-58.
- WAGNER H, BLADT S UND ZGAINSKI EM. **1983**. Drogenanalyse: Dünnschichtchromatographische Analyse von Arzneidrogen. *Springer Verlag*. Heidelberg. 299-305.
- WARDMAN P. **2007**. Fluorescent and luminescent probes for measurement of oxidative and nitrosative species in cells and tissues: Progress, pitfalls and prospects. *Free Rad Bio Med* 43: 995-1022.
- WEINGES K, BÄHR W, EBERT W, GÖRITZ K UND MARX H-D. **1969**. Konstitution, Entstehung und Bedeutung der Flavonoid-Gerbstoffe. *Fortschritte der Chemie organischer Naturstoffe*. *Springer Verlag*. Wien. 27: 158-260.
- WETHERALL NT, TRIVEDI T, ZELLER J, HODGES-SAVOLA C, MCKIMM-BRESCHKIN JL, ZAMBON M UND HAYDEN FG. **2003**. Evaluation of neuraminidase enzyme assays using different substrates to measure susceptibility of influenza virus clinical isolates to neuraminidase inhibitors: report of the neuraminidase inhibitor susceptibility network. *J Clin Microbiol* 41: 742-50.
- WHITE AG, DAVIES-COLEMAN MT UND RIPLEX BS. **2008**. Measuring and optimising concentration in wild harvest and cultivated *Pelargonium sidoides* (Geraniaceae). *S Afr J Bot* 74: 260-627.

- WINK DA, DARBYSHIRE JF, NIMS RW, SAAVEDERA JE UND FORD PC. **1993**. Reactions of the bioregulatory agent nitric oxide in oxygenated aqueous media: determination of the kinetics for oxidation and nitrosation by intermediates generated in the NO/O₂ reaction. *Chem Res Toxicol* 6: 23-27.
- WITTSCHIER N, FALLER G UND HENSEL A. **2007**. An extract of *Pelargonium sidoides* (EPs[®] 7630) inhibits *in situ* adhesion of *Helicobacter pylori* to human stomach. *Phytomedicine* 14: 285-288.
- YANG F, DE VILLIERS WJ, McCLAIN CJ UND VARILEK GW. **1998**. Green tea polyphenols block endotoxin-induced tumor necrosis factor-production and lethality in a murine model. *J Nutr* 128: 2334-2340.
- ZHANG K UND ZUO Y. **2004**. GC-MS determination of flavonoids, phenolic and benzoic acids in human plasma after consumption of cranberry juice. *J Agr Food Chem* 52: 222-227.

9. Abkürzungsverzeichnis

BMM Φ	bone marrow derived macrophages
br d	breites Dublett
br s	breites Singulett
COSY	correlation spectroscopy
DC	Dünnschichtchromatographie
dc	dünnschichtchromatographisch
DMSO	Dimethylsulfoxid
EI-MS	electron impact mass spectroscopy
ELISA	enzyme linked immunosorbent assay
EMCV	Encephalomyocarditis Virus
eV	Elektronenvolt
FACS	fluorescence activated cell sorting
FKS	fötales Kälberserum
FSC	forward scatter
GAS	Gruppe A-Streptokokken
GC	gas chromatography
GFP	grün fluoreszierendes Protein
HEPES	Hydroxyethylpiperazin-N-ethansulfonsäure
HPLC	high pressure liquid chromatography
Hz	Hertz
IFN- γ	Interferon-Gamma
IL	Interleukin
iNOS	induzierbare Stickstoffmonoxid Synthase
<i>J</i>	Kopplungskonstante
L-NMMA	N ^G -Monomethyl-L-Arginin
LPS	Lipopolysaccharid
m/z	Masse/Ladungsverhältnis
min	Minute
MIP	methanol insoluble phase
MSP	methanol soluble phase
nm	Nanometer
NMR	nuclear magnetic resonance
PBS	Phosphate buffered saline
PI	Propidiumiodid
ppm	parts per milion
R _f	ratio to front
SSC	Side Scatter
T _H 1	T-Helferzellen vom Typ 1
TMS	Tetramethylsilan
TNF- α	Tumor Necrosis Factor-alpha
UV	ultraviolettes Licht
	chemische Verschiebung
λ	Wellenlänge

10. Selbstständigkeitserklärung

Hiermit erkläre ich, dass ich die vorliegende Arbeit selbständig und nur unter Verwendung der angegebenen Literatur und Hilfsmittel verfasst habe. Ich versichere, dass diese Arbeit noch in keinem früheren Promotionsverfahren angenommen oder als ungenügend beurteilt wurde. Mir ist die dem Verfahren zugrunde liegende Promotionsordnung bekannt.

Berlin, den 09.07. 2012

Aneta Janecki