

7. Biologische Aktivitäten

7.1. Untersuchungen zur antimykobakteriellen Wirkung

7.1.1. Historischer Hintergrund

Es liegen bislang nur wenig Untersuchungen zur Wirkung der medizinisch genutzten Pelargonium Arten, *Pelargonium reniforme* und *Pelargonium sidoides*, gegenüber Mykobakterien vor. Dies erstaunt besonders, da ihre traditionelle Anwendung bei Atemwegserkrankungen unter ethnischen Gruppen in Südafrika äußerst populär und insbesondere seit Ende des 19. Jahrhunderts durch den englischen Major Stevens bei Tuberkulose als erfolversprechend dokumentiert ist (Bladt, 1974).

Traditionell wurden in der Volksheilkunde Südafrikas Infuse und Dekokte aller Pflanzenteile beider *Pelargonium* Arten verwendet. So wird der Gebrauch u.A. bei Erkrankungen des Gastrointestinaltraktes, bei Leberbeschwerden, sowie äußerlich zur Wundbehandlung und bei Atemwegsbeschwerden beschrieben (Watt und Breyer-Brandwyk, 1962; Hutchings, 1996).

Im 18. Jahrhundert wurde der therapeutische Wert vieler traditionell genutzter Pflanzen Südafrikas von europäischen Siedlern entdeckt. So stellte Major Stevens um den Beginn des 20. Jahrhunderts seine „Steven`s consumption cure“ in London als neue „Geheim-Waffe“ gegen Tuberkulose vor (Helmstädter, 1996). Stevens glaubte, nach der Behandlung mit einem *Pelargonium* Dekokt durch einen Mediziner von seiner Tuberkulose geheilt worden zu sein. 1920 hörte der Schweizer Arzt Sechehayes von der „Steven`s Cure“, und behandelte ca. 800 Patienten in den folgenden 9 Jahren. Er erstattete Bericht an die Medical Society in Genf über erfolgreiche Anwendungen, allerdings ist in vielen Fällen die Diagnose einer Tuberkulose nicht gesichert.

Tuberkulose wird beim Menschen meist durch *Mykobakterium tuberculosis* hervorgerufen. Bis zur Entdeckung des Bakteriums 1882 durch Robert Koch und seinem Beweis für den kausalen Zusammenhang zwischen dem Bakterium und der Entstehung der Tuberkulose, herrschte die Annahme, es handle sich um eine nicht übertragbare konstitutionelle Erkrankung (Brandis und Pulverer, 1988b). Nach einer langen Periode von zurückgehenden Erkrankungszahlen, begann die Tuberkulose über die letzten zwei

Jahrzehnte weltweit wieder an Bedeutung zu gewinnen, mit inzwischen 8 Millionen neuen Fällen und 200000 Todesfällen pro Jahr (WHO, 2001).

Da die Zahl an multiresistenten Bakterienstämmen steigt, besteht heute die Notwendigkeit, neue Arzneistoffe zur Therapie zu finden (Seidel und Taylor, 2004).

Vor diesem Hintergrund erschien eine Überprüfung der antimykobakteriellen Aktivität von *Pelargonium* Extrakten angebracht*.

7.1.2. Herstellung der Extrakte

Die untersuchten Extrakte sind in Tabelle 54 auf Seite 139 aufgelistet und deren Herstellung im experimentellen Teil auf Seite 94 beschrieben.

Außerdem wurde zu Vergleichszwecken eine industriell gefertigte Charge der Wurzeln von *P. sidoides* in die Testung mit einbezogen. Hierbei handelt es sich um einen ethanologisch, wässrigen, firmenspezifischen Spezialextrakt (Eps® 7630).

7.1.3. Mikrodilutionsverfahren

Hierzu wurden verschiedene Extrakte aus dem Kraut sowie den Wurzeln von *Pelargonium reniforme* und *Pelargonium sidoides* sowie daraus gewonnene Fraktionen (Dichlormethan, Ethylacetat, 1-Butanol und Wasser) (Tabelle 54, Seite 139) mit Hilfe der Mikrodilutionsmethode auf ihren wachstumshemmenden Effekt gegenüber Mykobakterien getestet.

Tabelle 21: MHK-Werte (µg/ml) von Antituberkulotika gegenüber Mykobakterium Arten

Mykobakterien Arten	MHK (µg/ml)			
	Streptomycin	Isoniazid	Rifampicin	Ethambutol
<i>M. smegmatis</i>	0,25	2	32	2
<i>M. aurum</i>	0,25	0,03	2	2
<i>M. tuberculosis</i>	0,5	0,03	0,25	1

* Besonderer Dank gilt Dr. Taylor und Dr. Seidel, School of Pharmacy, London, die mir die Durchführung der Arbeiten in ihrem Labor ermöglichten

Entsprechend der allgemeinen Praxis wurden in Voruntersuchungen als Testkeime Mykobakterien Arten verwendet, die nicht pathogen und damit in der Laborpraxis leichter zu handhaben sind, sowie schneller wachsen als der humane Tuberkulose-Erreger *M. tuberculosis* (Newton *et al.*, 2002). Die Empfindlichkeit der Testbakterien gegenüber einigen klinisch relevanten Wirkstoffen sind denen von *M. tuberculosis* weitgehend vergleichbar (Tabelle 21); (Chung *et al.*, 1995; Mitscher und Baker, 1998).

Die Mikrodilutionsmethode ermöglichte eine semi-quantitative Aussage zur Wirkung der Extrakte über die jeweilige minimale Hemmkonzentration (MHK). Der MHK-Wert ist definiert als die niedrigste Konzentration einer antimikrobiell wirkenden Substanz, die die Keimvermehrung im Kulturansatz verhindert (De Gruyter, 1994). Das Verfahren bietet den Vorteil, dass die Proben nicht als Lösungen eingesetzt werden müssen, solange eine homogene und stabile Mischung des Ansatzes gewährleistet ist. Es können also auch Suspensionen oder Emulsionen in den Test eingesetzt werden. (Vanden Berghe und Vlietinck, 1991). Außerdem besteht die Möglichkeit, eine größere Anzahl von Proben auf sogenannten Mikrotiterplatten zu testen.

Grundprinzip der Methode ist das Einbringen der Extrakte und Fraktionen in definierter Konzentration und deren serielle 1:1 Dilution über die Vertiefungen einer Mikrotiterplatte. Zusätzlich wird eine antituberkulotisch wirkende Substanz als Referenz (hier Ethambutol) parallel gleichartig behandelt. Diese Vorgehensweise ermöglicht die Berücksichtigung experimenteller Gegebenheiten über den Vergleich des jeweils gefundenen MHK-Wertes für Ethambutol mit dem Literaturwert (Chung *et al.*, 1995).

Als negative Kontrollen dienen Proben der verwendeten Lösemittel (Tabelle 54, Seite 137) und das reine Nährmedium mit maximalem Bakterienwachstum.

Bei der Herstellung der Verdünnungsreihen wurde so verfahren, dass in die erste Vertiefung zu 100 µl Nährmedium 100 µl der definierten Ausgangslösung gegeben wurde (4096 µg/ml für Extrakte von Kraut und Wurzel von *P. reniforme* und *P. sidoides*; 2048 µg/ml für Dichlormethan, Ethylacetat, 1-Butanol und Wasser Fraktionen der Extrakte; 64 µg/ml für Ethambutol), und anschließend über die Mikrotiterplatte seriell 1:1 mit Nährmedium verdünnt wurde. In jede Vertiefung wurde nachfolgend jeweils weitere 100 µl des eingestellten Inokulums gegeben und für 72 (*M. smegmatis*) oder 120 Stunden (*M. aurum*) inkubiert. Das Inokulum muss, um reproduzierbare und vergleichbare Ergebnisse erzielen zu können, auf eine bestimmte Bakterien-Konzentration eingestellt werden. Dies wurde durch optischen Vergleich mit einer McFarland-Standardlösung erreicht (Chung *et al.*, 1995). Die Bakterien werden in einem Glasgefäß mit physiologischer Kochsalzlösung

und kleinen Glasperlen suspendiert (durch die Glasperlen trennen sich die Bakterienkolonien leichter voneinander und werden feiner suspendiert). Zu 2 ml physiologischer Kochsalzlösung wird dann so viel dieser Suspension gegeben, dass die Konzentration des Inokulums mit der der Standardlösung übereinstimmt. Am Schluss wird noch ein Stabilisator (10%ige wässrige Tween 80 Lösung) zugesetzt, der die Bakterien in Suspension hält. Um ein Überwachsen der Platte durch andere, schneller wachsende Keime zu verhindern, erfolgen alle Arbeiten unter sterilen Bedingungen (Chung *et al.*, 1995).

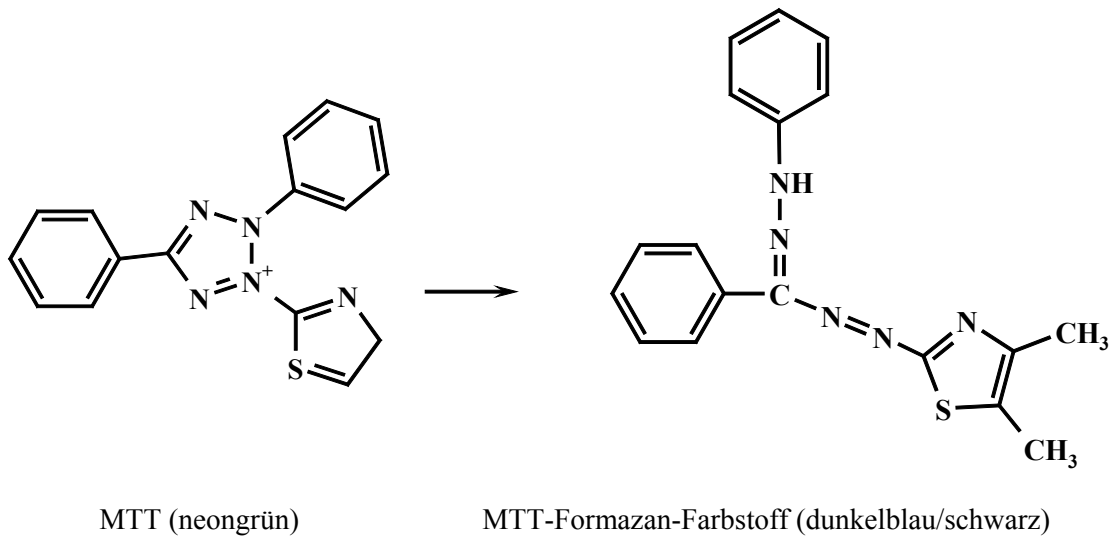


Abbildung 35: Umsetzung des neongrünen MTTs durch lebende Bakterien zum dunkelblauen MTT-Formazan-Farbstoff

Die Wachstumshemmung wird mit Hilfe des MTT-Assays ermittelt (Carmichael *et al.*, 1987; Alley *et al.*, 1988; Plumb *et al.*, 1989). Prinzip des Assays ist die Umsetzung des Farbstoffes MTT [3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-diphenyltetrazoliumbromid; siehe Abbildung 35] von neongrün zu dunkelblau/schwarz durch lebende Bakterien. Zur Bestimmung der minimalen Hemmkonzentration (MHK) der Extrakte ermittelt man die Probenverdünnung, die sich nach MTT-Zugabe und Inkubation gerade noch nicht dunkelblau bis schwarz verfärbt hat. Diese Konzentration ist der MHK-Wert für diesen Extrakt.

7.1.4. Ergebnisse

Tabelle 23 zeigt die gefundenen MHK-Werte jeder getesteten Fraktion. Um zusätzlich eine Abstufung der Aktivitäten der Fraktionen zu dokumentieren, sind die Aktivitäten der

Tabelle 24: Einfluss von *Pelargonium* Extrakten und Fraktionen auf das Wachstum von *Mykobakterium smegmatis* und *Mykobakterium aurum*

Extrakt/ Fraktion	<i>Mykobakterium smegmatis</i>					<i>Mykobakterium aurum</i>				
	Konzentration in µg/ml					Konzentration in µg/ml				
	4096	2048	1024	512	256	4096	2048	1024	512	256

Eps® 7630	++	+	+	+	-	++	++	-	-	-
DCM-Fraktion		-	-	-	-		++	+	-	
Ethylacetat-Fraktion		+	+	+	-		++	++	+	+
1-Butanol-Fraktion		-	-	-	-		-	-	-	-
Wasser-Fraktion		-	-	-	-		-	-	-	-
<i>P. reniforme</i> Kraut	++	+	+	+	-	++	++	+	-	-
DCM-Fraktion		-	-	-	-		+	+	+	-
Ethylacetat-Fraktion		++	+	+	-		++	++	+	-
1-Butanol-Fraktion		-	-	-	-		-	-	-	-
Wasser-Fraktion		+	-	-	-		+	-	-	-
<i>P. reniforme</i> Wurzel	++	++	+	-	-	++	++	-	-	-
DCM-Fraktion		-	-	-	-		+	-	-	-
Ethylacetat-Fraktion		++	+	+	+		++	++	+	+
1-Butanol-Fraktion		+	+	+	+		++	+	-	-
Wasser-Fraktion		++	+	+	-		++	+	-	-
<i>P. sidoides</i> Kraut	++	+	+	+	-	++	++	-	-	-
DCM-Fraktion		+	+	-	-		+	+	+	-
Ethylacetat-Fraktion		++	+	+	+		++	++	-	-
1-Butanol-Fraktion		+	-	-	-		+	+	-	-
Wasser-Fraktion		+	+	+	-		+	+	-	-
<i>P. sidoides</i> Wurzel	++	+	+	-	-	++	+	+	+	-
DCM-Fraktion		-	-	-	-		+	+	-	-
Ethylacetat-Fraktion		+	+	+	+		++	-	-	-
1-Butanol-Fraktion		-	-	-	-		+	-	-	-
Wasser-Fraktion		+	-	-	-		+	+	-	-

++ kein Bakterienwachstum

Substanz/ Extrakt aktiv

+ optisch wahrnehmbares Bakterienwachstum

Substanz/ Extrakt mäßig aktiv

- normales Bakterienwachstum

(entspricht Lösemittelkontrolle)

7.1.5. Diskussion der Ergebnisse

Die gefundenen MHK-Werte (Tabelle 23; Seite 69) lassen nur eine geringe Wirkung der getesteten Fraktionen und Extrakte auf das Wachstum von Mykobakterien erkennen. Im hier durchgeführten Test findet sich die stärkste antimykobakterielle Wirkung für alle Extrakte stets in den Ethylacetat-Fractionen, sowie eine geringere in den Wasser-Fractionen. Die Aktivitäten der Gesamtextrakte aus Kraut und Wurzeln beider Pelargonien Arten unterscheiden sich nicht deutlich voneinander.

Zum Vergleich wurden in einer Arbeit von Newton *et al.* von 2002 43 Pflanzenextrakte, die traditionell gegen Tuberkulose eingesetzt worden sind, auf ihre Wirkung gegenüber *M. aurum* und *M. smegmatis* getestet. Nur bei drei der Extrakte wurde im Test gegen *M. aurum* ein MHK-Wert von 62,5 µg/ml gefunden, die übrigen Pflanzenextrakte erzielten ebenso wie die Pelargonien-Extrakte keine MHK-Werte < 500 µg/ml und wurden wegen zu geringer Wirkung keiner weiteren Bearbeitung unterzogen.

Allerdings kann mit der Mikrodilutionsmethode nur die direkte Wirkung der Pflanzenextrakte auf Mykobakterien gezeigt werden. Da es sich bei Mykobakterien um intrazelluläre Erreger handelt, muss zusätzlich beachtet werden, dass *Pelargonium*-Extrakte möglicherweise auf indirektem Weg, z.B. über eine Aktivierung des Immunsystems, einen wachstumshemmenden Effekt auf Mykobakterien ausüben können.

Gerbstoffreiche Pflanzen wie *P. sidoides* können bei vielen *in vitro* Testverfahren durch Interaktionen mit Proteinen falschpositive Ergebnisse liefern. Da hier jedoch intakte Zellen verwendet wurden, ist nicht mit solchen Interaktionen zu rechnen (Wall *et al.*, 1996).

7.2. Modulation des Komplement-Systems

Bei Arzneipflanzen mit einem überlieferten Wirkspektrum wie bei *P. reniforme* und *P. sidoides*, das von Wundheilung über Leberbeschwerden bis zur Anwendung bei Infektionen des Respirationstraktes reicht, haben Diallo *et al.* (2001) an einigen Beispielen eine Aktivierung des Komplement-Systems als Wirkprinzip gefunden. Dies sollte auch an *P. sidoides* überprüft werden.

7.2.1. Einleitung

Das Komplement-System spielt eine wichtige physiologische Rolle bei der unspezifischen Immunabwehr des Körpers. Es besteht aus mehr als 20 aktivierbaren Glykoproteinen, die im Serum vorliegen (Brandis und Pulverer, 1988a). Die einzelnen Komponenten reagieren nach Aktivierung in einer festgelegten Reihenfolge miteinander. Die Aktivierung kann sowohl auf dem „klassischen Weg“ durch Antigen-Antikörper-Komplexe erfolgen, als auch auf dem sogenannten „alternativen Weg“ durch Oberflächenstrukturen von Bakterien, Viren, Pilzen oder Protozoen. Beide Wege münden in einer gemeinsamen Endstrecke, den Faktoren C5-C9. Die biologische Leistung des Komplement-Systems besteht in der Erregerabwehr sowie in der Verstärkung und Aufrechterhaltung von Entzündungsreaktionen.

Die Erregerabwehr wird zum einen durch Opsonisierung also Förderung der Phagozytoseaktivität von Makrophagen und neutrophilen Granulozyten erreicht, zum anderen durch Vermittlung der Zytolyse von Bakterien oder Viren. Dazu binden die Faktoren C5-C9 auf der Zelloberfläche und bilden transmembranäre Poren aus, durch die es dann dem osmotischen Gradienten folgend zum Einstrom von Flüssigkeit in die Zelle kommt, die schließlich platzt (Mutschler *et al.*, 2001; Morgan, 1995).

Das Komplement-System spielt eine Rolle bei der Organabstoßung nach Transplantation, Glomerulonephritis und Krebs, sowie bei der Abwehr von mikrobiellen Krankheitserregern. Eine Modulation des Komplement-Systems kann daher auf verschiedene Weisen medizinisch von Bedeutung sein. Es muss grundsätzlich unterschieden werden, ob die Substanzen einen aktivierenden oder einen desaktivierenden Effekt auf das Komplement-System ausüben (Alban *et al.*, 2002; Marsh *et al.*, 1999; Figueroa und Densen, 1991).

Um die Aktivität des Komplement-Systems in Testsysteme messbar zu machen, wird zumeist dessen Zytolyseaktivität über die spektrometrische Messung der Hämoglobinfreisetzung bei Wellenlängen von 405 oder 414 nm ermittelt (Pieters *et al.*, 1999; Brandis und Pulverer, 1988a).

7.2.2. Antikomplement-Assay[†]

Mit diesem Test bestimmt man den Einfluss von Testsubstanzen auf die komplementbedingte Hämolyse humanen Serums von Schafererythrozyten. Die Testsubstanzen werden in unterschiedlichen Verdünnungsstufen eingesetzt, so dass man einen IC₅₀-Wert für die Substanz aus der resultierenden Messkurve ablesen kann. Der IC₅₀ einer Substanz entspricht der Konzentration, bei der 50% der Erythrozyten hämolysiert worden sind. Aktive Substanzen hemmen das Komplement-System noch in geringen Konzentrationen (kleine IC₅₀-Werte). Die Testsubstanzen wurden gelöst (ca. 10 mg/ml), mit Pufferlösung auf eine gewünschte Anfangskonzentration verdünnt und anschließend auf Mikrotiterplatten seriell weiterverdünnt (Klerx *et al.*, 1983). Zu jeder Vertiefung wurde dann jeweils dieselben Menge menschliches Serum als Komplement Quelle gegeben und für 30 Minuten bei 37 °C präinkubiert. Anschließend wurden ca. 50 µl sensitiver Schafererythrozyten zugegeben und erneut für 60 (Antwerpen) bzw. 30 Minuten (Korea) bei 37 °C inkubiert. Diese Mischung wurde dann zentrifugiert und vom Überstand die optische Dichte bei einer Wellenlänge von 414 (Antwerpen) bzw. 405 nm (Korea) gemessen (I). Als Kontrollen wurden für eine 100%ige Hämolyse die Erythrozyten in Wasser (III), für keine Hämolyse die Erythrozyten in Puffer (IV) verwendet; außerdem die Erythrozyten mit der Probe als Toxizitäts- und Farbkontrolle (II) sowie ein Ansatz mit Erythrozyten in Puffer und Komplementserum in einer Verdünnung, die eine 50%ige Hämolyse auslöst. Als positive Kontrolle der Komplement-Hemmung wurden Dextransulfat [IC₅₀ von 0,14 µg/ml (Huang *et al.*, 1997)] bzw. Tilirosid [isoliert aus *Magnolia fargesii*, (Jung, 1998; Pupo *et al.*, 1998), IC₅₀ von 54 µM = 32,08 µg/ml] mit in den Versuch eingesetzt.

[†] Besonderer Dank gilt Dr. Byung, Korea Research Institute of Biosciences and Biotechnology, Daejeon, Korea, sowie Nina Hermans vom Laboratory of Pharmacognosy and Phytochemistry der Universität von Antwerpen, Belgien, für die Durchführung der Tests sowie für die Diskussion der Ergebnisse

7.2.3. Ergebnisse

Es wurden die fünf Extrakte aus dem oberirdischen Teil von *P. sidoides* (Gesamtextrakt, DCM-, Ethylacetat-, 1-Butanol- und Wasser-Fraktion) sowie drei isolierte Substanzen (6,8-Dimethoxy-5,7-dihydroxycumarin V6, Epigallocatechin-3-gallat V17, Gallussäure V9) getestet (Antwerpen), außerdem drei weitere Substanzen (4-Allyl-2,5-dimethoxy-1-β-D-glucopyranosid V8, Dihydrokämpferol-3-β-glucopyranosid V12 und Isoorientin-2''-gallat V14) (Korea). Die prozentuale Zelllyse berechnet sich nach folgender Formel (Klerx *et al.*, 1983).

$$Lyse(\%) = \frac{Abs.I - Abs.II}{Abs.III - Abs.IV} * 100$$

Abs. I = Absorption der Testlösung

Abs. III = Absorption bei 100%iger Hämolyse

Abs. II = Absorption der Farb- und Toxizitätskontrolle

Abs. IV = Absorption bei keiner Hämolyse

Tabelle 25: IC₅₀-Werte der Proben bei der Hemmung der komplementinduzierten Hämolyse

Proben	IC ₅₀ (µg/ml)
Isoorientin-2''-gallat V14 Korea	32,57
Tilirosid	32,08
4-Allyl-2,5-dimethoxy-1-β-D-glucopyranosid V8	> 200
Dihydrokämpferol-3-β-glucopyranosid V12	> 200
<i>P. sidoides</i> Kraut-Extrakt Antwerpen	9,39
DCM-Fraktion	4,09
Etylacetat-Fraktion	19,16
1-Butanol-Fraktion	19,27
Wasser-Fraktion	8,49
6,8-Dimethoxy-5,7-dihydroxycumarin V6	76,27
Gallussäure V9	> 113
Epigallocatechin-3-gallat V17	32,68
Dextransulfat	0,14

7.2.4. Diskussion der Ergebnisse

Allgemein gelten Extrakte mit einem IC₅₀-Wert von <20 µg/ml und Einzelsubstanzen von <10 µg/ml als aktiv. Dieses Kriterium erfüllen der Gesamtextrakt der oberirdischen Teile von *P. sidoides* (IC₅₀: 9,4 µg/ml), die Dichlormethan-Fraktion (IC₅₀: 4,1 µg/ml) und die Wasser-Fraktion (IC₅₀: 8,5 µg/ml). Keine der getesteten Einzelsubstanzen zeigt eine hohe Aktivität (siehe oben, Tabelle 25), so dass die geringen IC₅₀-Werte des Extraktes und der Fraktionen entweder auf einem synergistischen Effekt der Einzelkomponenten beruhen, oder aber die Substanzen, die mit dem Komplement-System interagieren, bisher nicht isoliert bzw. getestet worden sind.

Isoorientin-2''-gallat, Dimethoxy-6,8-dihydroxycumarin und (-)-Epigallocatechin-3-gallat wiesen nur eine moderate Aktivität, vergleichbar mit der von Tilirosid (IC₅₀: 32,1 µg/ml) auf. 4-Allyl-2,5-dimethoxy-1-β-D-glucopyranosid, Dihydrokämpferol-3-β-glucopyranosid und Gallussäure zeigten keine Aktivität in der höchsten Testkonzentration.

Mit diesem Testsystem kann nicht zwischen echten Komplement-Aktivatoren und -Inhibitoren unterschieden werden. Vertreter beider Gruppen bewirken bei einer 30 minütigen Präinkubationszeit der Testsubstanz mit dem komplementhaltigen Serum eine verminderte Hämolyse. Da die Halbwertszeit der aktivierten Komplementfaktoren nur gering ist, steht nach 30 Minuten Inkubation mit einem Komplement-Aktivator ebenfalls weniger Komplement zur Hämolyse der sensitiven Erythrozyten zur Verfügung. Solche aktivierenden Substanzen täuschen also eine Komplement-Inhibition vor (Kabat und Mayer, 1961; Morgan, 1995). Es wird von Alban *et al.* (2002) eine Modifikation des Testes vorgeschlagen, der eine Unterscheidung zwischen Komplement-Aktivatoren und -Inhibitoren ermöglicht. Aufgrund der vorliegenden Ergebnisse kann also keine Aussage getroffen werden, ob die Extrakte, Fraktionen und Substanzen aus *P. sidoides* einen inhibitorischen oder aktivierenden Effekt auf das Komplement-System ausüben, weisen jedoch auf einen Einfluss auf das Komplement-System hin. Sowohl Alban *et al.* (2002) als auch Diallo *et al.* (2001) haben potente Aktivatoren des Komplement-Systems aus den Zuckerfraktionen von *Echinacea purpurea* bzw. *Entada africana* isolieren können. Beide Pflanzen werden ebenfalls traditionell bei Infektionen oder auch zur Wundheilung eingesetzt, was eine Parallele zur hier bearbeiteten Pflanze *Pelargonium sidoides* darstellt.

7.3. Hemmung der Thrombozytenaggregation (Bornstest)

7.3.1. Einleitung

Das Blutgerinnungssystem ist für den Organismus lebensnotwendig, da sonst schon kleine Verletzungen zu schweren Blutungen führen können (Mutschler, 2001b). Eine erhöhte Gerinnungsneigung ist jedoch an Erkrankungen wie Herzinfarkt, Schlaganfall, Venenthrombosen und Lungenembolien beteiligt, die an der Spitze der Gesamtmorbidität und –mortalität der Industrienationen stehen (Claus, 1985).

Die Blutgerinnung kann in zwei Prozesse unterteilt werden. Die primäre Hämostase sorgt für einen ersten, jedoch noch instabilen Verschluss des verletzten Gefäßes. Sie beginnt mit der zunächst reversiblen Anlagerung von Thrombozyten an die verletzte Gefäßwand. Thrombin sorgt dann für eine irreversible Umwandlung der Thrombozyten, wodurch Mediatorstoffe, wie Serotonin, Plättchenfaktor 4 und ADP freigesetzt werden, die ihrerseits die Blutungsstillung fördern. Diese erste Phase dauert 2-3 Minuten (Mutschler, 2001b). Die sekundäre Hämostase sorgt im Folgenden für die nötige Festigkeit des Wundverschlusses. Sie kann auf zwei Wegen durch die Endothelverletzung aktiviert werden. Beide Wege münden über Aktivierungskaskaden verschiedener Gerinnungsfaktoren in eine gemeinsame Endstrecke, die mit der Umwandlung von Prothrombin in Thrombin eingeleitet wird. Thrombin führt dann zur Umwandlung von Fibrinogen in Fibrin, welches dem Wundverschluss mechanische Stabilität bis zur Narbenbildung verleiht (Mutschler, 2001b).

Das komplexe Gerinnungssystem bietet viele Angriffspunkte für die Beeinflussung der Gerinnungsneigung. So kommen zur Behandlung von Erkrankungen, die mit einer erhöhten Gerinnungsneigung verbunden sind, eine Reihe von Substanzen mit unterschiedlichen Wirkmechanismen zum Einsatz. Der Born-Test ist ein einfacher *in-vitro* Test, mit dem die Thrombozytenaggregation, die während der primären Hämostase stattfindet, erfasst werden kann und so auch der Einfluss von Substanzen auf diesen Teil der Blutgerinnung gemessen werden kann.

7.3.2. Bestimmung der Thrombozytenaggregationshemmung

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurde der Einfluss einer Reihe von einfachen Cumarinen (s.u.) auf die Blutgerinnung mit Hilfe des Born-Testes untersucht.

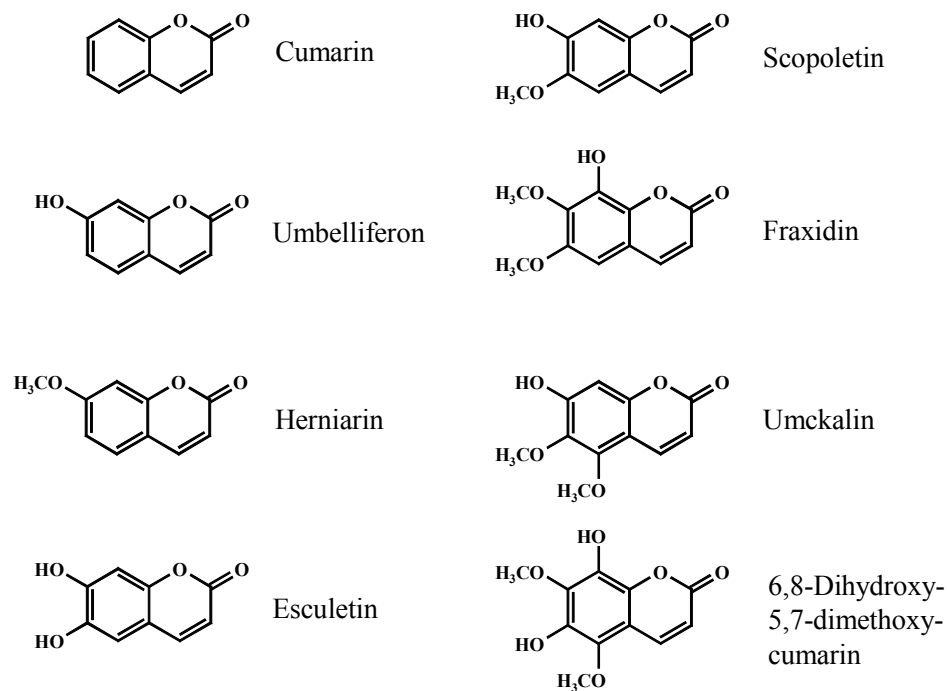


Abbildung 36: Testsubstanzen im Born-Test

Beim Born-Test arbeitet man mit thrombozytenreichem Plasma (PRP), das nach Zusetzen von 1 Teil 3,13%iger Natriumcitratlösung zu 9 Teilen Blut durch Zentrifugation aus dem Blut von gesunden Spendern gewonnen wurde. Zur Untersuchung der Testsubstanzen wurden diese mit dem PRP bei 37°C inkubiert. Anschließend wurde die Blutgerinnung durch Zugabe der standardisierten Kollagenlösung ausgelöst und über die Lichtabsorption des Testansatzes verfolgt. Die Lichtabsorption nimmt proportional zum Gerinnungsgrad des Plasmas ab, die prozentuale Gerinnungshemmung einer Substanz wird nach mindestens 240 Sekunden Gerinnungszeit abgelesen (Born, 1962; Seuter, 1976). Durch den Einsatz verschiedener Substanzkonzentrationen, kann daraus ein IC_{50} -Wert bestimmt werden. Substanzen mit IC_{50} -Werten von mehr als 300 μ M gelten als wirkungslos auf die Thrombozytenaggregation. Als Kontrolle wurde das Lösemittel der Testsubstanzen verwendet, um dessen Einfluss auf die Gerinnungshemmung ausschließen zu können

(100% Gerinnung). Zur positiven Kontrolle (0% Gerinnung) wurde eine 27,2 mM Acetylsalicylsäure-Lösung (ASS) eingesetzt [$IC_{50}(ASS) = 175 \mu M$] (Claus, 1985).

7.3.3. Ergebnisse

Die Substanzen Herniarin und Esculetin zeigten bei einer Konzentration von 210 μM eine 45%ige Hemmung der Thrombozytenaggregation im Born-Test. In der nächst kleineren Verdünnung (105 μM) war allerdings keine Aktivität mehr zu erkennen. 6,8-Dihydroxy-5,7-dimethoxycumarin (V6) wies in einer Konzentration von 210 μM eine Hemmung von 25% auf. Auch hier zeigte sich keine weitere Aktivität in der nächsten Verdünnung (105 μM). Alle anderen getesteten Substanzen (Cumarin, Umbelliferon, Scopoletin (V2), Fraxidin und Umckalin (V1)) hatten keinen Einfluss auf die Thrombozytenaggregation im Born-Test. Es konnte für keine der getesteten Substanzen ein IC_{50} -Wert ermittelt werden, da die Aktivitäten zu gering waren.

7.3.4. Diskussion

Die getesteten Cumarine zeigten keinen direkten Effekt auf die Thrombozytenaggregation. 3-Substituierte 4-Hydroxycumarine wie Warfarin und Phenprocoumon, die auch als Vitamin-K-Antagonisten bezeichnet werden, können aufgrund ihrer strukturellen Ähnlichkeit zum Vitamin-K an die Vitamin-K-Reduktase binden, welche für die Regenerierung des Vitamin-Ks aus Vitamin-K-epoxid in der Leber nötig ist. Durch die Hemmung der Reduktase steht Vitamin-K letztlich nicht zur Verfügung, was die Bildung einiger Gerinnungsfaktoren verhindert (Silverman, 1980) und so die Gerinnungsneigung vermindert wird, wenn nach 1-3 Tagen die Konzentration der Vitamin-K abhängigen Gerinnungsfaktoren unter einen kritischen Wert absinkt (Mutschler, 2001b). Die getesteten Cumarine tragen allerdings keine Substituenten an den Positionen 3 und 4, so dass die nötige Strukturverwandtschaft zum Vitamin-K nicht gegeben und deshalb kein indirekter gerinnungshemmender Effekt dieser Substanzen zu erwarten ist.