

**Phytochemische und pharmazeutisch-biologische Untersuchungen
an der aztekischen Süßpflanze *Lippia dulcis* Trev.**

Dissertation

**zur Erlangung des akademischen Grades des
Doktors der Naturwissenschaften (Dr. rer. nat.)
im Fach Pharmazie**

**eingereicht im
Fachbereich Biologie, Chemie, Pharmazie
der Freien Universität Berlin**

**vorgelegt von
Apothekerin Ream Nayal
aus Syrien**

Berlin 2009

1. **Gutachter: Prof. Dr. Matthias F. Melzig**
2. **Gutachter: Priv.-Doz. Dr. Kristina Jenett-Siems**

Disputation am: 13.05.2009

INHALTSVERZEICHNIS

1. Einleitung	1
1.1 <i>Lippia dulcis</i> Treviranus	1
1.1.1 Systematik	1
1.1.2 Die Anwendungen von <i>Lippia dulcis</i> bei den Azteken.....	2
1.1.3 Volkstümliche Anwendungsgebiete von <i>L. dulcis</i>	3
1.1.4 Botanische Beschreibung	3
1.1.5 Verbreitung	4
1.1.6 Die bisher isolierten Verbindungen aus <i>L. dulcis</i>	5
1.1.7 Die bisherigen pharmakologischen und biochemischen Studien über <i>L. dulcis</i>	6
1.2 (+)-Hernandulcin.....	7
1.3 Süßungsmittel.....	9
1.3.1 Entstehung des Süßgeschmacks	10
1.3.2 Überblick zu pflanzlichen Süßungsmitteln	10
1.4 Arzneimittel-induzierte Hepatotoxizität.....	14
1.5 Zellzyklus und Mechanismen des Zelltodes	15
1.5.1 Zellzyklus-Progression.....	15
1.5.2 Zellzyklus-Kontrolle	16
1.5.3 Mechanismen des Zelltodes	16
1.6 Gentoxikologie, DNA-Schädigung und Reparatur	21
1.7 Zielsetzung	25
2. Material und Methoden	27
2.1 Geräte	27
2.2 Material	28
2.2.1 Chemikalien, Reagenzien und Zellmedien	28
2.2.2 Verbrauchsmaterialien	30
2.2.3 Kits und Hilfsmittel.....	30
2.2.4 Enzyme.....	31
2.2.5 Antikörper und Standards	31
2.2.6 Puffer und Lösungen	31
2.2.6.1 Lösungen für botanische Untersuchungen	31
2.2.6.2 Puffer und Lösungen für die DNA Gelelektrophorese	31
2.2.6.3 Puffer und Lösungen für Proteinanalysen.....	32
2.2.6.4 Puffer und Lösungen für immunologische Reaktionen	33
2.2.6.5 AO/EB Lösung.....	34
2.2.6.6 Krebs-Henseleit-solution (KHS).....	34
2.2.7 Pflanzenmaterial.....	34
2.3 Methoden.....	35
2.3.1 Morphologische Untersuchungen	35
2.3.2 Phytochemische Methoden	35
2.3.2.1 Isolierung und Quantifizierung des ätherischen Öls	35
2.3.2.2 Herstellung der Pflanzenextrakte	36
2.3.2.3 Analyse des Öls und der Drogenextrakte mittels Dünnschichtchromatographie	37
2.3.2.4 Isolierung des Hernandulcins mittels Säulenchromatographie (SC).....	38
2.3.2.5 Gaschromatographische Analyse des ätherischen Öls.....	39
2.3.2.6 Untersuchungen mittels Hochdruckflüssigkeitschromatographie (HPLC).....	40
2.3.3 Bestimmung des Süßungsgrads von Hernandulcin.....	40
2.3.4 Zellbiologische Methoden.....	41

2.3.4.1 Zelllinien des humanen hepatozellulären Karzinoms HepG2.....	41
2.3.4.2 Kultivierung der HepG2-Zelllinie.....	41
2.3.4.3 Subkultivierung der HepG2-Zelllinien	41
2.3.4.4 Bestimmung der Zellzahl	42
2.3.4.5 Kryokonservierung und Revitalisierung der Zellen.....	42
2.3.5 Bestimmung der Zytotoxizität mittels MTT-Test.....	43
2.3.6 Hämatoxylin-Färbung von Zellkulturen	44
2.3.7 Molekularbiologische Methoden	45
2.3.7.1 Isolierung apoptotischer DNA	45
2.3.7.2 Nachweis der DNA-Fragmentation mittels Agarosegelelektrophorese.....	46
2.3.8 Untersuchung der Kernmorphologie mittels AO/EB Färbung.....	46
2.3.9 Nachweis von Membranintegrität mittels LDH-Test.....	48
2.3.10 Proteinchemische und immunologische Methoden	49
2.3.10.1 Herstellung der Zellkernextrakt	49
2.3.10.2 Bestimmung der Proteinkonzentration mittels BCA-Assay	50
2.3.10.3 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)	50
2.3.10.4 Untersuchung der Mutagenität durch Bestimmung der Ku70/86 Proteine.....	52
2.3.10.5 Ermittlungen der Proteinbandenintensität mit Hilfe des Programms <i>EasyWin 32</i>	56
2.3.11 Pharmakologische Methoden.....	57
2.3.11.1 Bestimmung der Hemmung der humanen neutrophilen Elastase	57
2.3.11.2 Spasmolysetest an Bronchialsegmenten der Schweine.....	58
2.3.11.3 Untersuchung der antispasmodischen Aktivität des Öls an der Rattentrachea ..	59
2.3.11.4 Untersuchung des Effekts des ätherischen Öls auf die mukoziliären Clearance	60
2.3.12 Mathematische Berechnungen und statistische Methoden	62
3. Ergebnisse	63
3.1 Ergebnisse der botanischen Studie.....	63
3.1.1 Die makroskopischen und histologischen Merkmale von <i>L. dulcis</i>	63
3.2 Ergebnisse der phytochemischen Studie.....	69
3.2.1 Optimierung der Destillationsdauer zur Gewinnung des ätherischen Öls	69
3.2.2 Der Wassergehalt von <i>L. dulcis</i>	70
3.2.3 Bestimmung des Gehalts des ätherischen Öls in der Pflanze	70
3.2.4 Ergebnisse der DC-Analyse verschiedener Extrakte aus <i>L. dulcis</i>	72
3.2.5 DC Untersuchung des ätherischen Öls und des ethanolischen Extrakts.....	73
3.2.6 Isolierung des Hernandulcins mittels Säulenchromatographie (SC)	73
3.2.7 Bestimmung des Gehalts an Campher und Hernandulcin mittels Gaschromatographie	74
3.2.8 Bestimmung des Gehalts an Campher und Hernandulcin mittels HPLC	77
3.3 Bestimmung des Süßungsgrads von Hernandulcin.....	79
3.4 Bestimmung der Zytotoxizität mittels MTT-Assay	79
3.5 Morphologische Untersuchung der behandelten HepG2-Zellen mittels Hämatoxylin Färbung	81
3.6 <i>In vitro</i> Nachweis der Apoptose mittels DNA-Fragmentation (<i>Ladder</i> -Assay)	83
3.7 Quantifizierung der apoptotischen Wirkung mittels AO/EB Färbung.....	84
3.8 Bestimmung des Einflusses der Testsubstanzen auf die Zellmembranintegrität (LDH-Test).....	86
3.8.1 Untersuchung der Zytotoxizität mittels MTT-Assay	88
3.9 Quantifizierung der gesamten Proteinmenge im Zellkernextrakt mittels BCA-Test.....	90
3.10 Analyse der Zellkernextrakte mittels SDS-PAGE	91

3.11 Untersuchung der Mutagenität durch Bestimmung der Ku70/86 Proteine	92
3.11.1 Ergebnisse der ELISA-Studie	92
3.11.2 Ergebnisse der Western-Blot-Studie	93
3.12 Ergebnisse der pharmakologischen Studie.....	95
3.12.1 Einfluss der Testsubstanzen auf der Aktivität der humanen neutrophilen Elastase..	95
3.12.2 Die spasmolytische Wirkung des ätherischen Öls	96
3.12.3 Die antispasmodische Aktivität des ätherischen Öls an der Rattentrachea.....	98
3.12.3.1 Der Effekt des ätherischen Öls auf die mukoziliäre Clearance.....	98
4. Diskussion	100
4.1 Morphologische Merkmale der Pflanze	101
4.2 Faktoren, die Zusammensetzung und Ausbeute des ätherischen Öls beeinflussen	101
4.2.1 Hinweise zur industriellen Gewinnung des ätherischen Öls aus <i>L. dulcis</i>	103
4.3 Quantitative Untersuchungen zu den Hauptbestandteilen des ätherischen Öls mittels GC und HPLC.....	103
4.4 Bewertung von Hernandulcin als potenziellen Süßstoff.....	104
4.5 Beurteilung der Hepatotoxizität von <i>Lippia dulcis</i>	106
4.5.1 Zytotoxizität und morphologische Änderungen der HepG2-Zelllinien	108
4.5.2 Identifizierung der Toxizitätsmechanismen der Testsubstanzen auf HepG2-Zellen	109
4.5.2.1 LDH-Test	110
4.5.2.2 Mitochondrienaktivität	110
4.6 Beurteilung der Mutagenität der <i>L. dulcis</i> -Zubereitungen bzw. -Wirkstoffe.....	111
4.6.1 Bestimmung der Mutagenität mittels ELISA und Western Blot	113
4.7 Die pharmakologischen Eigenschaften der Pflanze	114
4.7.1 Der ethanolische Extrakt von <i>L. dulcis</i> wirkt antientzündlich	115
4.7.1.1 Verbindungen, die die Elastaseaktivität beeinflussen könnten:	115
4.7.2 Die spasmolytische Wirkung der ätherischen Öle	116
5. Ausblick.....	120
6. Zusammenfassung.....	122
7. Summary	124
8. Abkürzungsverzeichnis.....	126
9. Abbildungsverzeichnis.....	128
10. Tabellenverzeichnis.....	130
11. Literaturverzeichnis.....	131
12. Veröffentlichungen der Dissertation	148
13. Anhang	149
A. Die analytischen Daten vom synthetisierten Hernandulcin	149
B. Auswertung und Präsentation der Daten in Abschnitt 2.3.11.2	152
C. DNA- und Proteinstandards	152
Danksagung.....	154
Eidesstattliche Erklärung	156

1. EINLEITUNG

1.1 *Lippia dulcis* Treviranus

1.1.1 Systematik

Familie: Verbenaceae

Unterfamilie: Verbenoideae

Tribus: Lantaneae

Gattung: *Lippia*

Art: *Lippia dulcis* Trev.

Lippia dulcis Trev. gehört zur großen Familie der Verbenaceae, deren Vertreter vorwiegend in den Tropen und Subtropen vorkommen. Nach Hegnauer (1973) gehören zu der Familie der Verbenaceae ca. 2500-3000 Arten, die etwa 75-100 Gattungen bilden. Aufgrund der Merkmale der Blütenstände, des Ovars und der Früchte werden die Mitglieder der Verbenaceae Familie geordnet. Im Syllabus werden 8 Unterfamilien unterschieden, eine davon ist die Verbenoideae. Hierzu werden unter anderem die Gattung *Citharexylum*, *Duranta* und die sehr großen Gattungen *Lantana*, *Lippia* und *Verbena* gezählt (Hegnauer, 1973).

Die Gattung *Lippia* umfasst ca. 200 Arten von Kräutern und Sträuchern, die in Süd- und Mittelamerika, aber auch weniger im tropischen Afrika und Asien beheimatet sind (Terblanché and Kornelius, 1996). Im Mittelmeerraum gelten sie als Kulturpflanzen, zum Teil sind sie verwildert. Die Sträucher oder Halbsträucher, seltener die Kräuter, besitzen eine behaarte Epidermis. Die Blätter sind gegenständig. Die Blüten sind klein, in zentripetalen Ähren, einzeln in den Achseln der Bracteen sitzend. Ihr Kelch ist klein. *Lippia* hat vier Staubblätter, der Fruchtknoten ist zweifächerig und enthält zwei Samen. Die Frucht ist klein mit zwei einsamigen Steinkernen.

Lippia dulcis Trev. ist eine aromatische, kriechende, mehrjährige Süßpflanze, die im tropischen Amerika beheimatet ist. *Lippia dulcis* gehört zu einer Gruppe von *Lippia*-Arten, die von einigen Botanikern einer separaten Gattung *Phyla* (umfasst ungefähr 11 Arten) zugeordnet wird (Hänsel *et al.*, 1993).

Synonyme sind: *phyla scaberrima* (PERS.) Moldenke, *Zapania scaberrima* Juss.ex PERS.

Sonstige Bezeichnungen wären *Lippia mexicana*, Mexikanisches Lippienkraut [deutsch]; Mexican Lippia, sweet herb [englisch]; Corronchocho, hierba dulce, hierba buena, regaliz de Cuba, yerba dulce [spanisch] (Hänsel *et al.*, 1993).

Weitere Namen in der volkstümlichen Medizin sind *Tzonpelic xihuitl* und *hierba buena* (Mexiko), *hierba dulce* und *yerba dulce* (Mexiko, Puerto Rico), *honey herb* (USA).

1.1.2 Die Anwendungen von *Lippia dulcis* bei den Azteken

Historische Beweise der Verwendung von *Lippia dulcis* bei den Azteken wurden von dem aztekischen Arzt Martin de la Cruz, dem spanischen Arzt Francisco Hernández und dem spanischen Mönch Bernardino de Sahagun zusammengestellt.

Lippia dulcis war bereits bei den Azteken unter dem Namen *Tzonpelic xihuitl* bekannt. Dabei bedeutet „xihuitl“ Kraut und „Tzonpelic“ süß in ihrer Sprache (Siméon, 1981). Die älteste verfügbare Referenz über aztekischen Heilkräuter, *Libellus de Medicinalibus Indorum Herbis*, wurde von einem aztekischen Arzt geschrieben und auf Lateinisch im Jahr 1552 publiziert. In diesem Buch wurde eine hustenmildernde Wirkung für *Lippia dulcis* erwähnt (De la Cruz, 1964).

Der spanische Arzt Francisco Hernández erforschte im Auftrag des spanischen Königs Philip II die Heilpflanzen von Neuspanien. Zwischen 1570 und 1576 konnte er wertvolle Informationen über die Namen und Verwendungen sowie die botanischen Eigenschaften von mehr als 3000 Pflanzen sammeln. Sein Werk wurde ursprünglich auf Lateinisch geschrieben und wurde mehrmals seit 1587 auf Spanisch und Lateinisch publiziert (Guerra, 1950; Hernández, 1959a; Langman, 1964). In der letzten Ausgabe (Hernández, 1959b) wurde *Lippia dulcis* unter dem Nahuatl Namen *Tzonpelic xihuitl* (Süßkraut) eingetragen. Hernández beschrieb in seinem Buch die Pflanze wie folgt: „Ihre Blätter sind so süß wie Honig. Das Blättergetränk in Wasser lindert Fieber, heilt Husten und Heiserkeit und stimuliert den Appetit“. In der lateinischen Ausgabe (Hernández, 1651) ist die Pflanze abgebildet, Abb. 1.1.



Abb. 1.1: Erste Darstellung von *Lippia dulcis* (Hernández, 1651).

1.1.3 Volkstümliche Anwendungsgebiete von *L. dulcis*

Das mexikanische Arzneibuch (1884) erwähnte *L. dulcis* unter den Namen *Yerba dulce* und beschrieb ihre Infusion als hustenmilderndes Mittel und als Emmenagogum (Maisch, 1885). Der wässrige Absud dieser Pflanze wurde in Mexiko zur Behandlung von Husten, Erkältung, Bronchitis, Asthma, Kolik und als Emmenagogum verwendet (Maisch, 1885; Compadre *et al.*, 1986). Es gibt keine Hinweise, dass *L. dulcis* in Mexiko zum Süßen von Lebensmitteln, Getränken oder Medikamenten benutzt wurde. Bis heute wird *L. dulcis* auf den Märkten in Mexiko für ihre angeblich abtreibende Wirkung verkauft.

In den USA wurde *L. dulcis* für viele Jahre als konzentrierte Tinktur der Blätter und Blüten verwendet und unter dem Namen "Lippia Mexicana" vermarktet. Bei der Parke-Davis-Company wurde die Pflanze als hustenlindernd und Expektorans bezeichnet und zur Behandlung akuter und chronischer Bronchitis empfohlen (Davis, 1890). Mehrere Berichte über die medizinische Verwendung der *L. dulcis*-Tinktur wurden Ende des 19. Jahrhunderts publiziert (Blasdale, 1881; Saxton, 1881; Gottheil, 1884). In einer Studie an dem *Charity Hospital* (New York) wurde die Tinktur von *L. dulcis* als Expektorans an 10 Patienten getestet, bei fünf Patienten kam es zur deutlichen Besserung und es gab keine Hinweise auf toxische Wirkungen (Gottheil, 1884). Die guten Berichte über *L. dulcis* trieben ihren Verkauf voran, so kostete ein Pfund der Pflanze 75 Goldcent im New Yorker Markt im Jahr 1898 (Bustillos, 1898).

Die Tinktur wurde auch in England verwendet (Wren, 1950). In Deutschland wurde *L. dulcis* angebaut und mit ihr sehr reger Handel betrieben (Breitwieser, 1943; Peyer, 1931).

In Zentralamerika sowie in Kuba und Puerto Rico wurde *L. dulcis* zur Behandlung von Husten, Erkältung und Kolik benutzt (Roig Y Mesa, 1945; Morton, 1981). In Brasilien und Mittelamerika wurde *L. dulcis* zur Behandlung von Menstruationsstörungen verwendet. In Guatemala wurde *L. dulcis* als Diuretikum benutzt, ihr Absud wurde zur Behandlung von Magendarmstörungen (Durchfall, Magenschmerzen) verwendet (Mejia, 1927; Mellen, 1974). Auch in der traditionellen Medizin wurde diese Pflanze als Infusion oder Absud der oberirdischen Teile zur Behandlung verschiedener Entzündungen benutzt (Argueta, 1994).

1.1.4 Botanische Beschreibung

Lippia dulcis ist eine mehrjährige, bis 40 cm hoch, aufrechte und intensiv riechende Pflanze. Die Pflanze ist an der Basis mehr oder minder strauchförmig, wobei die unteren Knoten der Sprosse häufig Wurzeln bilden. Die Blätter sitzen an 0,5-1,5 cm langen Stielen, die Blattspreite ist rhombisch bis oval. Die Blätter sind 1 bis 6 cm lang mit einem gezähnt-

gekerbten Rand, die Oberseite ist borstig, rau, die Unterseite undeutlich drüsig. 1 bis 5 cm lange Blütenstände sitzen einzeln in den Blattachseln, die Tragblätter sind keilförmig, winzig, der Kelch ist winzig, zottig, die Krone ist weiß und 1-1,5 mm lang (Hänsel *et al.*, 1993).



Abb. 1.2: *Lippia dulcis* (Gewächshauskultur am Institut für Pharmazie der FU-Berlin).

1.1.5 Verbreitung

L. dulcis kommt vom südlichen Mexiko bis Kolumbien sowie in Kuba, Hispaniola, Puerto Rico und anderen Karibischen Inseln vor und wächst dort an Fluss- und Teichrändern, Schuttplätzen, Weiden und Feldern bis in eine Höhe von 1800 m (Gibson, 1970; Morton, 1981; Compadre *et al.*, 1986). Nach Hänsel *et al.* (1993) ist von einem gezielten Anbau bisher nichts bekannt. Die Bedarfsdeckung erfolgt in Mexiko vermutlich durch Wildsammlung oder Kultur in den Gärten der Eingeborenen.



Abb. 1.3: Landkarte von Mittel- und Südamerika. Grün sind die Länder, aus welchen die in der vorliegenden Arbeit untersuchten *L. dulcis* Pflanzen stammen.

1.1.6 Die bisher isolierten Verbindungen aus *L. dulcis*

Flavonoide, Phenylethanoid-Glykoside und Iridoidglykoside sind die Hauptstoffklassen von den nicht-flüchtigen Sekundärmetaboliten, die in *L. dulcis* vorkommen. Aus den oberirdischen Teilen der Pflanze konnten die Flavonoide Cirsimaritin, Salvigenin, Eupatorin, 5-Hydroxy-6,7,3',4'-Tetramethoxyflavon, 5,3'-Dihydroxy-6,7,4',5'-Tetramethoxyflavon, Sakuranetin, Pectolinarigenin und Eupatilin isoliert werden. Die Phenylethanoid-Glykoside Decaffeoylverbascosid, Acteosid (Verbascosid), Isoacteosid und Martynosid wurden ebenfalls in der Pflanze gefunden (Abe *et al.*, 2002).

Auch über das Vorkommen des Triterpenoids Betulinsäure und der Iridoidglykoside Lamiide und 8-Epiloganin wurde berichtet (Ono *et al.*, 2005 & 2006). Frische Blätter sollen bis 0,8% ätherisches Öl enthalten, das eine Dichte von 0,9485 g/ml besitzt (Hänsel *et al.*, 1993). Im Öl konnten 44 Komponenten (Mono- und Sesquiterpene) durch GC-MS identifiziert werden (Souto-Bachiller *et al.*, 1997).

Die ätherischen Öle der verschiedenen Lippiaarten weisen Unterschiede in der Zusammensetzung auf. Das ätherische Öl aus den mexikanischen Pflanzen enthält hauptsächlich Monoterpene (ca. 86%), vor allem Campher (ca. 53%) und nur 14% Sesquiterpene mit einem nur geringen Anteil Hernandulcin (ca. 40 ppm). Das Öl aus den Puerto Rico-Pflanzen zeichnet sich durch einen hohen Anteil (79%) an Sesquiterpene aus, hauptsächlich (+)-Hernandulcin (36%) [ein süßes Sesquiterpen vom Bisabolan-Typ] und sein Epimer (-)-Epihernandulcin (22%) [ein nicht-süßes Sesquiterpen vom Bisabolan-Typ] (Abb. 1.4A). Dieses Öl enthält nur einen unbedeutenden Anteil an Campher (0,01%) (Souto-Bachiller *et al.*, 1997).

Die Pflanze aus Panama enthält ca. 0,154% (w/w) (+)-Hernandulcin und kein Campher (Kaneda *et al.*, 1992).

Offenbar existieren von *L. dulcis* zwei Chemotypen, ein Hernandulcin-Typ (süß und enthält viel Hernandulcin) und ein Campher-Typ (enthält viel Campher).

Das (+)-4 β -Hydroxyhernandulcin (Abb. 1.4B) konnte aus den in Panama gesammelten Blättern und Blüten als zweites süßes Sesquiterpen in sehr geringer Menge (0,0008% w/w) isoliert werden (Kaneda *et al.*, 1992).

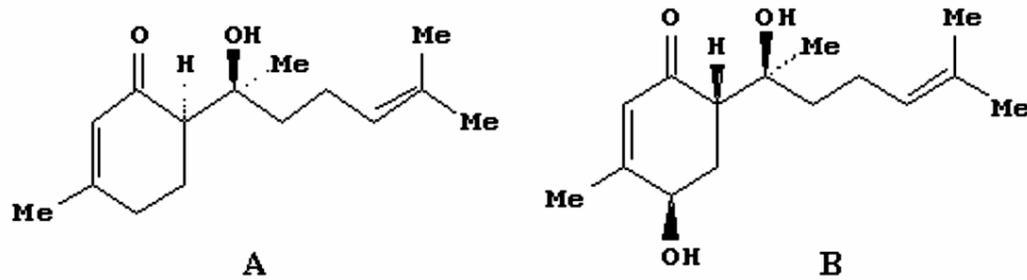


Abb. 1.4: Strukturformel von Epihernandulcin (A) und 4 β -Hydroxyhernandulcin (B).

Acht neue Sesquiterpene vom Bisabolan-Typ, nämlich Lippidulcin A, Epilippidulcin A, die Peroxylippidulcine A, B und C, sowie das Peroxyepilippidulcin B und die Epilippidulcine B und C wurden aus den oberirdischen Teilen der Pflanze isoliert (Ono *et al.*, 2005 & 2006).

1.1.7 Die bisherigen pharmakologischen und biochemischen Studien über *L. dulcis*

1. Die antioxidative Aktivität: Die phenolischen Verbindungen des methanolischen Extrakts der oberirdischen Teile von *L. dulcis* zeigten eine antioxidative Aktivität im Vergleich zum α -Tocopherol (Ono *et al.*, 2005).
2. Die antiinflammatorische Aktivität: Der ethanolische Extrakt in einer Konzentration von 400 mg/kg zeigte eine signifikant hemmende Wirkung auf das Carrageenan-induzierte Pfotenödem (Pérez *et al.*, 2005). Diese Wirkung ist ähnlich dem Effekt, der bei 8 mg/kg Indomethacin auftritt.
3. Die antiproliferative Aktivität: Der methanolische Extrakt der oberirdischen Teile der Pflanze inhibierte das Wachstum der Murinmelanomzellen (B16F10). Acetosid könnte für diese Wirkung verantwortlich sein (Abe *et al.*, 2002).
4. Die antibakterielle Aktivität:
 - I. *L. dulcis* zeigte *in vitro* eine antibakterielle Wirkung gegen Enterobakterien wie *Salmonella typhi* und *Shigella flexneri*, die Durchfälle bei Menschen verursachen (Cáceres *et al.*, 1993).
 - II. *L. dulcis* zeigte *in vitro* eine antibakterielle Aktivität gegen grampositive Bakterien wie *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus pneumoniae*, die Atemwegsinfektionen bei Menschen verursachen (Cáceres *et al.*, 1991).
 - III. Der Absud von *L. dulcis* zeigte keine *in vitro* Wirkung gegen *Vibrio cholerae* (Guevara *et al.*, 1994).

- IV. Die antimikrobielle Aktivität von *L. dulcis* gegen eine Reihe grampositiver Bakterien war ein Ausgangspunkt für die Patentierung von Zahnputzmitteln und Mundwässern, die das ätherische Öl bzw. Extrakte der Pflanze enthalten wie z.B.:
- das Mundwasser bestehend aus dem ätherischen Öl bzw. den Pflanzenextrakten allein oder als Kombination mit anderen Substanzen (z.B. aus 0,01-0,5% Öl und 0,1-2,0% L-Menthol) inhibierte die Entwicklung vom Mundgeruch (Gomi, 1992a).
 - Zahnpasten mit 0,1% *L. dulcis* Öl zeigten sich als stabiles Präparat und effektiv zur Bekämpfung von Mundgerüchen (Gomi, 1992b).
5. Pflanzen mit behaarten Wurzeln wie auch *L. dulcis* haben die Fähigkeit Kontaminanten wie PCBs und/oder Dioxine aus dem Boden zu absorbieren, deswegen können sie zur Behandlung von kontaminierten Böden eingesetzt werden (Kamiya *et al.*, 2001).

1.2 (+)-Hernandulcin

(+)-Hernandulcin (Abb. 1.5) ist ein farbloses, öliges, süß schmeckendes Sesquiterpen vom Bisabolan-Typ. Es wurde aus der Aztekischen Pflanze *Lippia dulcis* isoliert und zu Ehren des spanischen Arztes Francisco Hernández benannt. Seine Summenformel ist $C_{15}H_{24}O_2$, seine chemische Struktur ist 6-(1,5-Dimethyl-1-hydroxyhex-4-enyl)-3-methylcyclohex-2-enon (Compadre *et al.*, 1985).

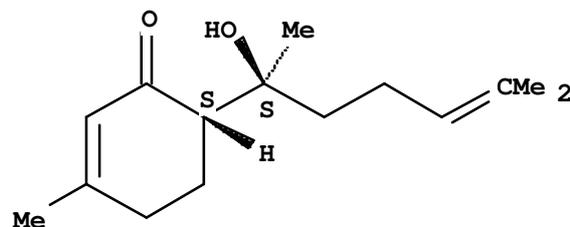


Abb. 1.5: Chemische Struktur von (6S,1'S) Hernandulcin.

Bei der Synthese aus den Enantiomeren des Limonen [(R)-(+)-/(L)-(-)-Limonen] entstehen vier verschiedene Diastereomere, nur das (+)-Hernandulcin [die (6S,1'S) Form] zeigte einen süßen Geschmack (Mori and Kato, 1986). Das 1'-O-Acetyl-Derivat und das Produkt der Hydridreduktion des Hernandulcins sind beide nicht süß.

Racemisches (\pm)-Hernandulcin kann aus dem 3-Methyl-2-cyclohexen-1-on und 6-Methyl-5-hepten-2-on mittels Aldolkondensation synthetisiert werden, dabei entstehen (\pm)-Hernandulcin und sein Diastereomer (\pm)-Epihernandulcin in einem Verhältnis von 95:5 (Compadre *et al.*, 1987).

Zur Synthese von racemischem Hernandulcin wurden mehrere Strategien publiziert:

- Aus einem Cyclohexadien-Derivat mit Hilfe von Boron- und Silicon-Enolat (Bubnov and Gurskii, 1986).
- Aus einem (2Z,6E)-Farnesal Oxim mittels intramolekularer Nitriloxid-Cycloaddition (Zheng and Kakisawa 1989 & 1990).
- Aus *E*-Dienylcarbammat mit Hilfe von Titanchlorid als Katalysator [Diels-Alder-Reaktion] (De Cusati and Olofson, 1990).

Eine Gewinnung des natürlichen (+)-Hernandulcins mittels pflanzlicher Zellkulturen (Wurzelhaare- bzw. Sprosskulturen von *L. dulcis*) ist auch möglich, der Ertrag beträgt ca. 0,025% und 2,9% w/w (Sauerwein, 1991a & 1991b). (+)-Hernandulcin kann auch aus (-)-Isopulegol in sechs Schritten mit einer Ausbeute von 15% (Kim *et al.*, 2003) oder aus (-)-Neoisopulegol in sieben Schritten mit einer Ausbeute von 25% (Gatti, 2008) hergestellt werden.

Wegen seiner einfachen Struktur und seiner großen Süßkraft bietet Hernandulcin ein exzellentes Modell zur Untersuchung des Zusammenhangs zwischen der chemischen Struktur und des Geschmackempfindens "süß" (Wictzak, 1994).

Mehrere Hernandulcin-Analoga wurden synthetisch hergestellt, um die für den süßen Geschmack verantwortlichen Gruppen identifizieren zu können. Diese Studien ergaben, dass Hernandulcin zu seinen putativen Rezeptoren über drei Bindungsstellen bindet, diese sind die C-1' Hydroxylgruppe (AH-Gruppe), die C-1 Carbonylgruppe (B-Gruppe) und die Doppelbindung C4'=C5' (X-Region). Chemische Änderungen in diesen Binderegionen führten zu nichtsüßen Derivaten (Compadre *et al.*, 1988).

Obwohl Hernandulcin als energieärmer und nicht kariogener Süßstoff patentiert wurde (Kinghorn *et al.*, 1989) und trotz seiner intensiven Süßkraft [1000-mal süßer als Zucker] (Compadre *et al.*, 1985), hat Hernandulcin folgende Nachteile:

- Es ist nur zum Teil löslich in Wasser.
- Es ist hitzeempfindlich, bei Temperaturen ab 140°C wird es in zwei Ketone: 3-Methyl-2-cyclohexen-1-on und 6-Methyl-5-hepten-2-on zersetzt (Compadre *et al.*, 1987).
- Hernandulcin zeigt einen *off*- und Nachgeschmack sowie einen leicht bitteren Geschmack (Compadre *et al.*, 1985).

Seine Toxizität wurde *in vivo* untersucht: (\pm)-Hernandulcin führte bei p.o. Applikation an männlichen Swiss-Webster-Mäusen in Dosierungen bis zu 2 g/kg zu keinen Todesfällen (Compadre *et al.*, 1985).

Es wurde festgestellt, dass die C-4 β -OH Gruppe des (+)-4 β -Hydroxyhernandulcins eine mögliche Stelle zur Anlagerung von Zucker- oder anderen polaren Gruppen ist, hierdurch könnten wasserlöslichere Hernandulcin-Derivate produziert werden.

1.3 Süßungsmittel

Ca. 150 Millionen Menschen in den USA benutzen zuckerfreie kalorienarme Produkte. Der Verbrauch zuckerfreier Produkte hat sich in den letzten 20 Jahren verdreifacht. Die meisten sogenannten „hochintensiven Süßungsmittel“ im Markt sind synthetische Substanzen wie z.B. Aspartam, Acesulfam-K, Saccharin und Sucralose. Deswegen suchen die Wissenschaftler ständig nach neuen Verbindungen natürlicher Herkunft. Bis Mitte 2002 wurden mehr als 100 neue pflanzliche Süßverbindungen aus mehr als 25 verschiedenen Pflanzenfamilien isoliert. Die meisten dieser Pflanzenprodukte wurden als reine Verbindungen, als Mischungen oder als verfeinerte Extrakte als Geschmacksstoffe oder Süßstoffe vermarktet, keine davon wurde als „hochintensives Süßungsmittel“ in den Vereinigten Staaten bewilligt, obwohl viele davon wie Glycyrrhizin, Neohesperidin-Dihydrochalkon, Steviosid und Thaumatin in anderen Ländern kommerziell für Süßungszwecke verwendet werden (Kim and Kinghorn, 2002a & b; Kinghorn and Soejarto, 2002).

Das ideale Süßmittel

Es ist schon längst akzeptiert, dass das ideale Süßmittel gar nicht existiert. Selbst Zucker „der Goldstandard“ ist nicht perfekt, er ist für bestimmte pharmazeutische Anwendungen und Kaugummis nicht geeignet.

Hier sind einige Kriterien eines idealen Süßmittels zusammengefasst (O'Brien Nabors, 2001):

- Beliefert eine große Auswahl an Lebensmitteln und Getränken um die Kalorienaufnahme und somit das Körpergewicht besser kontrollieren zu können.
- Hilft dabei mit dem Diabetes mellitus umgehen zu können.
- Reduziert die Entstehung von Zahnkaries.
- Unterstützt bestimmte pharmazeutische und kosmetische Anwendungen.
- Unterstützt eine kosteneffektive Verwaltung der begrenzten Rohstoffquellen.

1.3.1 Entstehung des Süßgeschmacks

Süßschmeckende Verbindungen binden selektiv an Rezeptoren auf der Membran der Geschmackszelle. Bei den Menschen sind die neu charakterisierten Rezeptoren T1R2-T1R3 für den Süßgeschmack verantwortlich. Diese Rezeptoren können sowohl natürliche als auch synthetische Süßstoffe erkennen, während die Rezeptoren T1R1-T1R3 auf den Umami-Geschmack (das Geschmack der Glutaminsäure) spezialisiert sind (Li *et al.*, 2002; Kant, 2005).

Die Rezeptorzellen für die Geschmacksqualitäten sind bei Säugetieren in Geschmacksknospen angeordnet, die sich auf der Zunge in den Geschmackspapillen, aber auch in den Schleimhäuten der Mundhöhle befinden. Ergebnisse der physiologischen Studien zeigen, dass die Geschmacksqualitäten bitter, süß und umami durch G-Protein-gekoppelte Rezeptoren (GPCR) vermittelt werden, die Signaltransduktion ist mittlerweile gut charakterisiert. Die GPC-Rezeptoren interagieren mit dem Süßstoff, was eine Signalkaskade auslöst und zur der Freisetzung von Neurotransmittern führt. Die Ausschüttung von Neurotransmittern durch Geschmackssinneszellen ist notwendig für eine Weiterleitung der Informationen ins Gehirn, wo sie verarbeitet werden (Adler *et al.*, 2000).

1.3.2 Überblick zu pflanzlichen Süßungsmitteln

Durch die Krebsverdächtigkeit einiger synthetischer Süßstoffe gewannen pflanzliche Süßstoffe immer mehr an Bedeutung. Die Suche nach alternativen pflanzlichen Süßmitteln ergab verschiedene Arten von hochintensiven Süßverbindungen, die zu verschiedenen Stoffklassen gehören, u.a. Phenole (Flavonoide, Dihydroisocoumarin), Terpenoide und proteinartige Substanzen (Thaumatococcus). Diese Verbindungen besitzen einen wesentlich höheren Süßungsgrad, der das 50- bis 3000-fache der normalen Saccharose beträgt.

Tabelle 1.1 fasst die wichtigsten pflanzlichen Süßverbindungen und ihre Eigenschaften zusammen (Kinghorn and Compadre, 2001):

I. Triterpenglykoside					
Süßstoff	Pflanze, Familie und Prozentsatz des Süßstoffs	Süßungsgrad vs. Rohrzucker	Verwendung	Vorteile	Nachteile
Glycyrrhizinsäure Oleanan-Typ	Rhizome der <i>Glycyrrhiza glabra</i> L., Fabaceae, 5-15%	50 fach	In der Pharmazie als Geschmackskorrigens. In Japan als Geschmacks- und Süßstoffe	0,5-1% inhibiert die Bildung von Zahnbelag durch <i>Streptococcus mutans</i> . In USA: das Ammoniumsalz hat GRAS*-Status als Aroma	Lakritzenschmack, corticoidähnliche Wirkung
Mogrosid V Cucurbitan-Typ	Früchte der <i>Siraitia grosvenorii</i> (Swingle), Cucurbitaceae, >1% w/w	250-425 fach	Pflanzenextrakt als Süßsaft in den USA. Früchte in Lebensmitteln, Getränken & Pharmaprodukten (in Japan)	Gut schmeckend, gut wasserlöslich, hitzestabil, nicht mutagen, keine Mortalität bei Dosis von bis zu 2 g/kg bei Mäusen	
Periandrin V Oleanan-Typ	Rhizome der <i>Periandra dulcis</i> L., Fabaceae	200 fach		Harmlos	Befindet sich in kleinen Mengen in der Pflanze
Abrusoside A-D Cycloartan-Typ	Blätter der <i>Abrus precatorius</i> L., Fabaceae, <1% w/w	Das Ammoniumsalz von Abrusoside A-D: 30, 100, 50, 75 fach		Das Ammoniumsalz ist wasserlöslich, hitzestabil, harmlos, lang haltender Süßgeschmack, kein bitterer Nachgeschmack	Verzögerter Süßgeschmack
II. Diterpenglykoside					
Steviosid ent-Kauran-Typ	Blätter der <i>Stevia rebaudiana</i> Bertoni, Asteraceae, 5-10%	150-300 fach	In Japan und Südamerika als Süßungsmittel	Stabil in kohlenensäurereichen Getränken, nicht mutagen	Wenig löslich in Wasser, besitzt einen leicht bitteren Geschmack, gibt einen unerwünschten Nachgeschmack, instabil bei pH > 10 & 100°C, sein Aglykon (Steviol) ist mutagen im Ames-Test

Rebaudiosid A ent-Kauran-Typ Analog von Steviosid	Blätter der <i>Stevia rebaudiana</i> Bertoni, Asteraceae, 2-4%	250-450 fach	Zusatz bei Diätprodukten wie Lebensmittel & Getränke	Stabil in kohlenstoffreichen Getränken, löslicher in Wasser (mehr als Steviosid), besitzt einen angenehmeren Geschmack als Steviosid (Zucker-ähnlicher)	
Gaudichaudiosid A Labdan-Typ	<i>Baccharis gaudichaudiana</i> DC, Asteraceae	55 fach		Nicht toxisch, nicht mutagen und besitzt einen angenehmen Geschmack	
Baiyunosid Labdan-Typ	Wurzeln der <i>Phlomis</i> <i>betonicoides</i> Diels, Lamiaceae	500 fach	Die Pflanze Wird in der chinesischen Volksmedizin verwendet		Besitzt einen nachhaltigen Nachgeschmack (hält für mehr als eine Stunde)
Rubusosid ent-Kauran-Typ	Blätter der <i>Rubus suavissimus</i> S. Lee, Rosaceae, >5% w/w	114 fach	Blätter als Gesundheits- verstärker (in Japan), der Blättertee als Volks- medikament gegen Bluthochdruck & Diabetes (in China)	Geringe Toxizität (Maus, p.o. LD ₅₀ = 2,4 g/kg), extrahierbar mit heißem Methanol	Leicht bitter
III. Saponine					
Osaldin Steroid-Saponin	Rhizome von <i>Polypodium</i> <i>vulgare</i> L., Polypodiaceae	500 fach	Hat keine praktische Bedeutung		Liegt in der Droge in geringe Konzentration vor
Pterocaryosid A & B Secodammaran- Saponin	Blätter und Stängel von <i>Pterocarya paliurus</i> Batal., Juglandaceae	50 und 100 fach	Zum Süßen von Lebensmitteln in China (Blätter)	Nicht mutagen, nicht toxisch für Mäusen	
IV. Phenolverbindungen					
Phyllodulcin Dihydroisocoumarin	Blätter der <i>Hydrangea</i> <i>macrophylla</i> , Saxifragaceae, 2,36% w/w	400-600 fach	Fermentierte Blätter zur Vorbereitung eines Süßen Tees (Jap. Pharmakopöe, Vol. XIII)	Nicht mutagen, nicht toxisch (Maus, p.o. bis zu 2 g/kg)	Begrenzte Wasserlöslichkeit, begrenzte Stabilität, Verzögerung des Süß-geschmacks, lakritzenähnlicher Nachgeschmack
Selligueain A Proanthocyanidine	Reife Rhizome der <i>Selliguea feei</i> Bory, Polypodiaceae, 0,69% w/w	35 fach		Nicht mutagen, nicht toxisch (Maus, p.o. bis zu 2 g/kg), zeigt keine spürbare <i>off-</i> oder <i>after-taste</i>	Bei hohen Konzentrationen (0,5% w/v) zeigt es einen angenehmen Süßgeschmack mit kleinen Spuren von bitterem Geschmack

V. Proteine					
Thaumatococcoside I & II basische Peptide mit einem MG von ca. 20000-22000 Dalton	Früchte bzw. Samenarilli von <i>Thaumatococcus daniellii</i> Bennett, Marantaceae	1600 fach	In Westafrika zum Süßen von Brot, Früchten und Tee. In Japan, Australien und Europa wird es als Talin <i>protein sweetener</i> bezeichnet	In USA: hat den GRAS*-Status als Geschmacksstoff, kann mit Hilfe rekombinanter Pilze- und Bakterienstämme produziert werden	Instabilität, lakritzenähnlicher Nachgeschmack. Die Süßwirkung ist an das intakte Peptid gebunden (Verlust des Süßgeschmacks durch Proteolyse, Hitze und Säuren)
Monellin MG 11086 Dalton	Früchte von <i>Dioscoreophyllum cumminsii</i> , Menispermaceae, 0,3-0,5% w/w	1500 fach	Kommerziell nicht als Süßungsmittel benutzt		Hohe Produktionskosten von Monellin, die Pflanze ist schwer zu propagieren, Monellin ist relativ hitze- und säureempfindlich. Verzögerung des Süßgeschmacks mit anhaltendem Nachgeschmack
Mabinlin I & II MG 11600 & 10400 Dalton	Samen der <i>Capparis masakai</i> Lévl, Capparidaceae, 13% (überwiegend Mabinlin I)	Weniger süß als Thaumatococcoside & Monellin (ca. 400 fach)	Gegen Halsschmerzen & als Antifertilitätsmittel in der chinesischen Volksmedizin	Mabinlin II ist stabil (bei 80°C & pH 6 für 48 Std.)	Mabinlin I verliert seinen Geschmack in 30 Min. bei 80°C & pH 6
Pentadin MG 12000 Dalton	Früchte der afrikanischen Pflanze <i>Pentadiplandra brazzeana</i> Baillon, Pentadiplandraceae	500 fach		Der Geschmackseindruck ist ähnlich dem von Monellin und etwas weniger dem von Thaumatococcoside	Verzögerter Süßgeschmack
Brazzein MG 6473 Dalton	Früchte der afrikanischen Pflanze <i>Pentadiplandra brazzeana</i> Baillon, Pentadiplandraceae	2000 fach	Hat eine vielversprechende Zukunft wegen seiner Stabilität & angenehmen Geschmack	Hitze- & pH-stabil, hat einen mehr Zuckerähnlichen Geschmack als andere Protein-Süßstoffe	

Tab. 1.1: Pflanzliche Süßungsmittel

*GRAS: *generally recognized as safe*.

Das steigende globale Interesse an Süßungsmitteln natürlicher Ursprung führte zur Entdeckung vieler neuen pflanzlichen Süßungsmittel (Tab. 1.1). Gleichzeitig wuchs die Sorge um ihre Biosicherheit und Toxizität. Bevor ein neues Süßungsmittel von den Menschen verwendet werden darf, müssen eine Reihe von *in vitro* und *in vivo* Untersuchungen zur Bestimmung seiner Toxizität und Mutagenität gemacht werden. Die *in vitro* Testsysteme stellen normalerweise den ersten Schritt zur Untersuchung der Biosicherheit einer Testsubstanz dar (Saad *et al.*, 2006).

Zur *in vitro* Untersuchung der Zytotoxizität und Mutagenität von *L. dulcis* haben wir in dieser Arbeit die humane Hepatomzelllinie HepG2 verwendet, welche in der Literatur als sehr effektives und zuverlässiges *in vitro* Testsystem gilt (Ni *et al.*, 2001).

1.4 Arzneimittel-induzierte Hepatotoxizität

Die Leber ist ein wichtiges Organ mit vielen biologischen und physiologischen Funktionen, ihre parenchymalen Zellen sind hoch differenzierte epitheliale Zellen, die viele Funktionen ausüben (LeCluyse *et al.*, 2005).

Die Leber ist das Hauptorgan für den Metabolismus darunter der Metabolismus vieler Arzneimittel (Xenobiotika). Dabei entstehen elektrophile Metabolite und freie Radikale als Nebenprodukte. Diese können toxisch wirken, da sie an Proteine, Lipide und DNA kovalent binden und oxidativen Stress verursachen. Einige Substanzen können eine Hepatotoxizität durch Schädigung bestimmter Organellen (Mitochondrien, endoplasmatisches Reticulum, Zellkern) hervorrufen.

Auf molekularer Ebene kann es zu Störungen von Signal-Transduktionsprozessen und Transkriptionsfaktoren und als Folge zu veränderten Gen-Expressionsprofilen kommen. Weiterhin kann es zur Glutathion- bzw. ATP-Depletion kommen, was zur Induktion der Apoptose oder zur Nekrose führen kann.

Verschiedene Faktoren können den Schweregrad der Hepatotoxizität beeinflussen, u.a. die Konzentration und Expositionsdauer der toxischen Substanz, umweltbedingte und genetische Faktoren, welche den Arzneimittel-Metabolismus und -Transport beeinflussen, sowie Reparatur- und Regenerationsprozesse.

Arzneimittel-induzierte Leberfunktionsstörungen sind immens wichtig, da sie erhebliche Sicherheitsanforderungen an die Medikamentenentwicklung in der pharmazeutischen Industrie stellen. In den Vereinigten Staaten ist die Hälfte aller akuten Leberversagensfälle auf Medikamente zurückzuführen. Viele Nahrungsmittelzusätze und Heilkräuter haben auch toxische Wirkungen auf der Leber. Dieser Fakt ist besonders erwähnenswert, da pflanzliche

Produkte in der Öffentlichkeit vielfach als „sanfte Medizin“ (nebenwirkungsfrei) missverstanden werden.

Auf Grund der neuen Kenntnisse über die Hepatotoxizität stieg der Bedarf an einem humanrelevanten System zur Evaluierung der hepatotoxischen Wirkungen neu entwickelter Medikamente an. Isolierte humane Hepatozyten sind zum „Goldstandard“ zur *in vitro* Untersuchung der Zytotoxizität und Genotoxizität von Xenobiotika geworden. HepG2-Zellen werden üblicherweise als Surrogat der humanen Hepatozyten genutzt (Andreoli *et al.*, 2003; Bakand *et al.*, 2005; Hayashi, 2005; Dambach *et al.*, 2005).

Die Zytotoxizität einer Substanz zeigt die negativen Wirkungen, die durch die Interaktion mit lebenswichtigen Strukturen und Prozessen der Zelle entstehen (Ekwall, 1983). Die humane Toxizität einer Substanz kann durch eine Reihe von *in vitro* Untersuchungen ermittelt werden. Die *in vitro* gemessenen IC₅₀-Werte entsprechen den *in vivo* LD₅₀-Daten (Ekwall *et al.*, 1998; Clemedson *et al.*, 2000).

1.5 Zellzyklus und Mechanismen des Zelltodes

1.5.1 Zellzyklus-Progression

Die mammalian Zellteilung erfolgt in verschiedenen Phasen, welche als G₁-, S-, G₂- und M-Phasen bezeichnet werden. S- und M-Phase sind durch Ruhephasen getrennt, die als G₁- und G₂-Phase bezeichnet werden (G steht für *gap*). Die Synthese der DNA findet in der S-Phase statt, während die Verteilung der Chromosomen auf die beiden Tochterzellen in der Mitose (M-Phase) erfolgt. Für den Übergang von einer Zellzyklus-Phase in die nächste sind Cycline und Cyclin-abhängige Kinasen (*Cdks*) von zentraler Bedeutung. *Cdks* komplexieren mit Cyclinen und steuern deren Aktivität. Die Aktivität von *Cdks* wiederum wird durch *Cdk*-Inhibitoren reguliert.

Der Zellzyklus proliferierender Zellen folgt der molekular definierten Abfolge dieser vier Phasen. Sich nicht teilende Zellen befinden sich in der G₀-Phase, in der sie wenige Tage bis mehrere Jahre verbleiben, z.B. Fibroblasten setzen ihre Proliferation nach einer Verletzung fort, die Stimulation erfolgt durch Blutplättchenwachstumsfaktoren. Nerven- und Skelettmuskelzellen sind permanent in Ruhephase G₀ (endgültig differenziert). Das Verbleiben von Zellen in der G₀-Phase wird nicht durch die Abwesenheit eines Mitose-Signals, sondern durch die aktive Repression der Mitose-Gene bewirkt. Ein Defekt in dieser Repression ist ein weiterer Entstehungsmechanismus von Krebs (Efferth, 2006).

1.5.2 Zellzyklus-Kontrolle

Zellteilung gehört zu den wichtigsten biologischen Prozessen überhaupt. Ein korrekter und fehlerfreier Ablauf des Zellzyklus ist dementsprechend sehr wichtig. Eine Zelle muss fähig sein, auf schädigende Faktoren während eines Zellzyklus angemessen reagieren zu können. Hierzu dienen sogenannte Kontrollpunkte (*checkpoints*). Die Kontrollpunkte erlauben es den Zellzyklus anzuhalten um die genomische Integrität zu überprüfen und die Fehler zu beheben. Anschließend wird der Zellzyklus fortgesetzt. Bei schweren Schädigungen (irreparable DNA-Schäden durch Stress, mutagene Substanzen, Bestrahlung) kann die Zelle die Apoptose einleiten oder den Zellzyklus auf Dauer arretieren (Seneszenz).

Folgende Kontrollpunkte sind schon bekannt:

1. Die DNA *damage* G₁/S und G₂/M Kontrollpunkte dienen zur Reparatur von DNA-Schäden. DNA-Schädigung durch oxidativen Stress oder ionisierende Strahlen führen zur Arretierung des Zellzyklus in der G₂-Phase.
2. DNA *replication checkpoints* (S/M) dienen zur Reparatur von Fehlern während der DNA-Replikation, hier wird die Mitose blockiert (Efferth, 2006).

1.5.3 Mechanismen des Zelltodes

Physikalische, biochemische oder biologische Schäden können eine Reihe von *stress response* Genen in den betroffenen Zellen aktivieren. Zellen, die an kleinen Schäden leiden, werden meistens wieder geheilt, während die schwer betroffenen Zellen eines Zelltodes bzw. einer Apoptose unterliegen. Wenn der Schaden eine große Zahl von Zellen betrifft, findet eine Nekrose statt.

Weil Apoptose und Nekrose gleichzeitig im selben Gewebe oder in den selben Zellkulturen auftreten können, entscheidet oft die Intensität des Schadens, ob eine Apoptose oder eine Nekrose eintritt (Mullen, 2004).

I. Nekrotischer Zelltod

Die Nekrose ist eine passive Schnellreaktion der Zelle auf exogene Substanzen bzw. Faktoren und verursacht Zellschwellungen, ATP-Depletion, Calcium-Freisetzung, unkontrollierte Aktivierung der Calcium-abhängigen Enzyme (Proteasen, Lipasen, DNAasen), was zum Verlust der Plasmamembranintegrität führt (Cotran *et al.*, 1999). Das Wasser fängt an in die Zelle hinein zu strömen und ein Zellödem zu verursachen (Abb. 1.6). Durch das Zerreißen der Innen- und Außenmembran werden die Plasmabestandteile und schädlichen lysosomalen

Inhalte in das extrazelluläre Kompartiment freigesetzt, als Folge entsteht eine lokale Entzündung.

Es handelt sich bei der Nekrose um einen irreversiblen Zellschaden. Zusätzlich zum Membranverlust entstehen bei der Nekrose auch DNA-Einzelstrangbrüche, die Morphologie des Zellkerns bleibt aber unversehrt. Trennt man die DNA nekrotischer Zellen auf einem Agarosegel auf, sieht man nach der EB-Färbung ein Gemisch unterschiedlich langer DNA-Fragmente. Im Laboralltag wird dieses typische Resultat der Nekrose als „DNA-Schmier“ bezeichnet.

Unter *in vitro* Bedingungen werden die nekrotischen Zellen meistens nicht geschwollen sondern geschrumpft (Ishaque and Al-Rubeai, 2004).

II. Apoptose

Im Jahr 1972 haben Kerr *et al.* zum ersten Mal das Wort Apoptose verwendet um eine Reihe vorbestimmter Ereignisse zu beschreiben, die zur Zellzerstörung führt. Der Begriff Apoptose wurde von Wyllie *et al.* (1980) benutzt um molekulare und morphologische Prozesse zu beschreiben, in denen einzelne Zellen aktiv einen programmierten genetisch-regulierten Zelltod durchführen.

Apoptose ist ein natürlicher physiologischer Prozess und Teil des Zellstoffwechsels, an dem viele Gene beteiligt sind und Energie in Form von ATP erforderlich ist. Durch Apoptose wird gewährleistet, dass die betreffende Zelle ohne Schädigung des Nachbargewebes zugrunde geht. Die Zelle zerfällt in kleine Vesikel und Makrophagen phagozytieren die Zellreste, ohne dass es zu einer Entzündungsreaktion kommt.

Apoptose ist sehr wichtig zur Bestimmung der Größe, der Form und der Funktion eines Gewebes während der Embryogenese, Metamorphose- und Differenzierungsphasen. Zur Gewährleistung der richtigen „Verschaltung“ von Hirnstrukturen sterben z.B. durch Apoptose bis zur Hälfte aller ursprünglich entstandenen Nervenzellen noch vor der Geburt wieder ab. Apoptose spielt auch eine besonders wichtige Rolle bei der Regulierung und Funktionalität des Immunsystems, unnötige oder potentiell schädliche Immunzellen werden dadurch abgebaut (Mullen, 2004).

Apoptose ist auch in der Krebsforschung von großer Bedeutung, fehlende bzw. nicht genaue Regulierung der apoptotischen Prozesse ist meistens mit Krebs, Autoimmunität, Immundefizienz und viralen Infektionen assoziiert.

Chemotherapie und Radiotherapie können eine kontrollierte Apoptose bei den neoplastischen Zellen auslösen. Doch auch die Krebszellen nutzen den Apoptosemechanismus, um die

Abwehrzellen, die sogenannten tumorinfiltrierenden Lymphozyten (TILs), auszuschalten. Forscher entdeckten an der Oberfläche verschiedener Tumorzelllinien ein Apoptose-auslösendes Protein (den CD95-Liganden).

Apoptose kann durch verschiedene exo- oder endogene Stimulanzien induziert werden, u.a. Anbindung an Zelloberflächen-Rezeptoren (Aktivierung des Fas-Systems), Serum-Deprivation, Wachstumsfaktor-Entzug, Hitzeschock, Sauerstoffmangel, UV-Strahlen, DNA-Schäden, virale Infektionen, Glucocorticoide (Dexamethason), zytotoxische oder chemotherapeutische Substanzen.

Morphologische und biochemische Eigenschaften der Apoptose

Während der Apoptose entstehen morphologische Änderungen durch eine Reihe von stereotypischen Ereignissen (Wyllie *et al.*, 1980). Eine der frühesten Änderungen ist die Reduzierung des Zellvolumens, die Zelle verliert ihr internes Wasser und beginnt getrennt von den intakten Nachbarzellen zu schrumpfen, als Folge nähern sich die intrazellulären Organellen. Die Zellmembranen beginnen Bläschen an der intakten Oberfläche der Zelle zu bilden. Dann bricht die Zellmembran in kleinere Vesikel ab, die die verschiedenen noch intakten Organellen umschließen (Abb. 1.6). Trotz des Verlusts der Membranintegrität in den Spätphasen, stellt die Erhaltung der Membranfunktion in der Frühphase ein charakteristisches Merkmal des apoptotischen Zelltodes dar. Eine der wichtigsten Änderungen ist der Verlust der Membranphospholipid-Asymmetrie und die Verlagerung (Translokation) der internen Phosphatidylserine (PS) an die intakte Zelloberfläche (Savill *et al.*, 1993). Das erlaubt eine frühe Erkennung und Vernichtung der Apoptose-Zellen durch Makrophagen (Koopman *et al.*, 1994).

Weil es keine Phagozytose der apoptotischen Zellen unter Kulturbedingungen gibt, fügen die freigesetzten Zellbestandteile den benachbarten Zellen einen großen Schaden zu (Ishaque and Al-Rubeai, 2004).

Zu einem Zeitpunkt während der Membranblasenbildung (*membrane blebbing*) und der Phospholipid-Translokation entsteht eine deutliche Chromatinkondensation. Das ist zu einem sehr charakteristischen Merkmal der Apoptose geworden (Arends *et al.*, 1990).

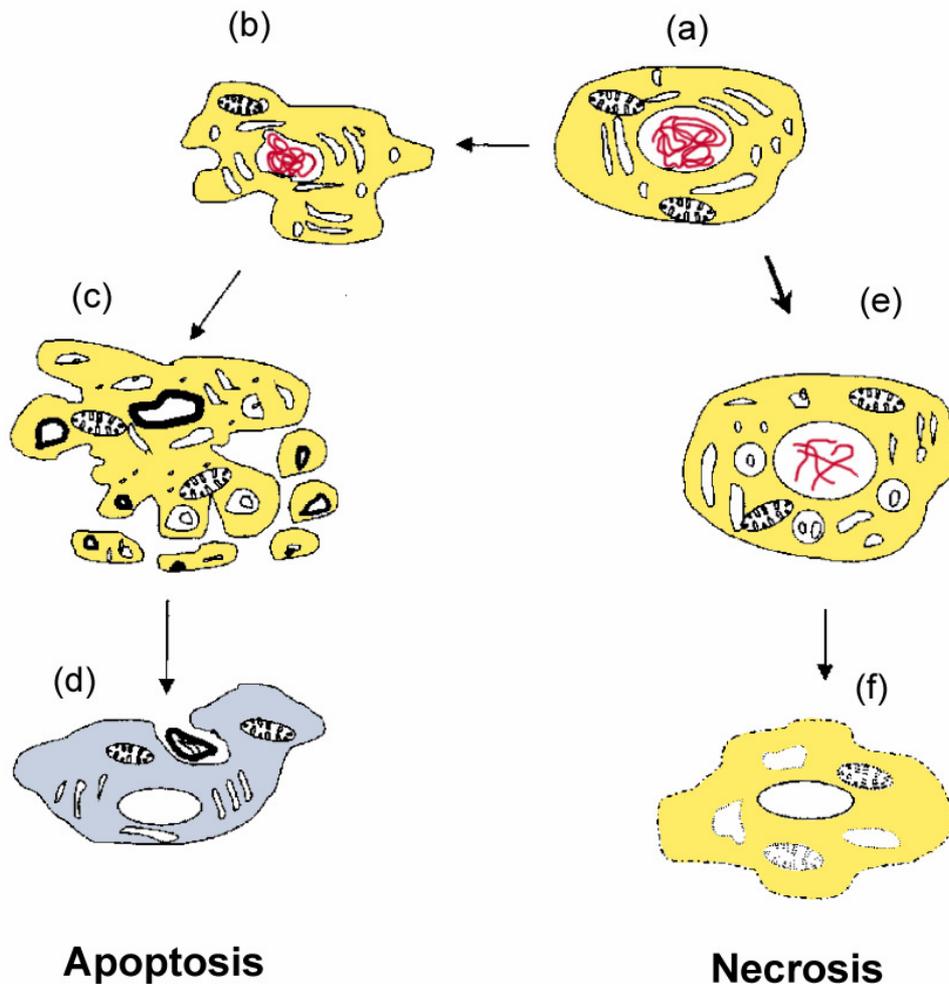


Abb. 1.6: Die morphologischen Unterschiede zwischen Apoptose und Nekrose. (a) intakte Zelle, (b) bei Apoptose wird die Zelle zuerst kleiner und geschrumpft, (c) das Chromatin sieht dann kondensiert aus und die Zelle bildet apoptotische Körper, (d) anschließend werden die apoptotischen Körper von Makrophagen phagozytiert, (e) geschwollene nekrotische Zelle, Chromatin breitet sich aus, (f) Membranlyse und Freisetzung der inneren Organellen in der Zellumgebung, was eine Entzündung *in vivo* auslöst (modifiziert aus Studzinski, 1999).

Induktion und Signalwege der Apoptose

Je nach Zelltyp und Auslöser kann die Apoptose auf verschiedenen Signalwegen eingeleitet werden, die sowohl rezeptorfrei, als auch rezeptorgebunden sein können. Das gemeinsame Ziel der unterschiedlichen Apoptose auslösenden Wege ist die Initiierung einer Caspasen-Kaskade, die ihrerseits den Zelltod einleitet.

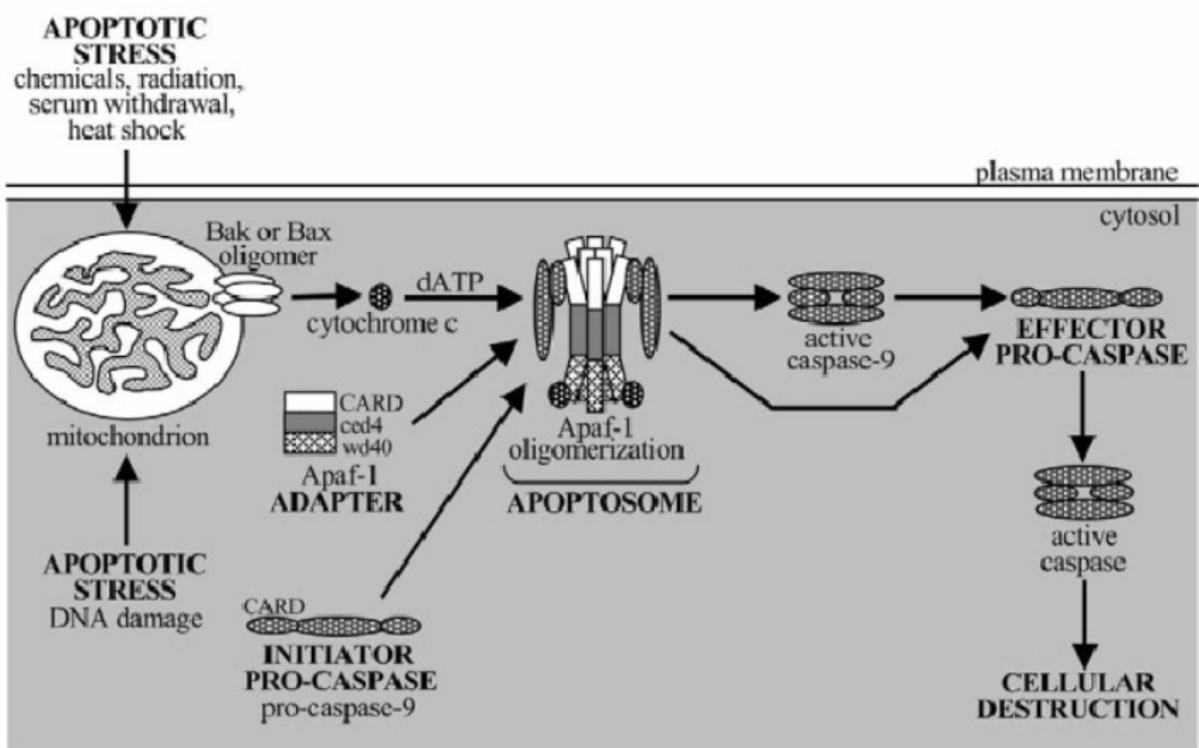
Caspasen sind Cystein-haltige **Aspartat-spezifische Proteasen**. In den gesunden Zellen liegen die meisten als inaktive Präkursoren (Zymogene, Procaspasen) vor, welche durch proteolytische Spaltung an definierten Aspartatresten aktiviert werden.

Initiator-Caspasen (Caspase-8, -9, -10) werden in Komplexen wie DISC oder dem Apoptosom rekrutiert. Diese Caspasen spalten und aktivieren nachgeschaltete **Executioner-Caspasen** (Caspase-3, -6, -7). Sobald sie aktiviert werden, spalten die Executioner-Caspasen

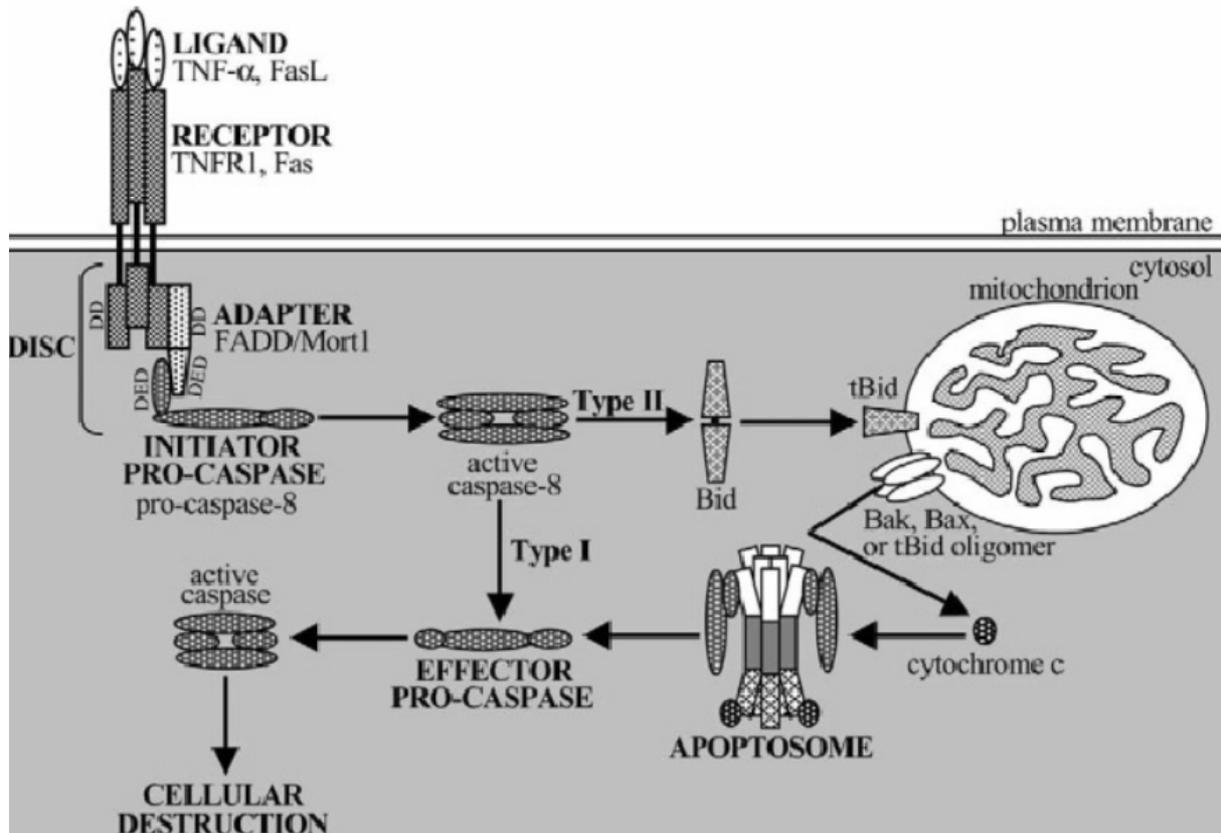
ihre respektiven Zielsubstrate, folglich werden die Zellen abgebaut. Abhängig von dem Insult können die Caspase-Kaskaden entweder durch intrinsische mitochondrialen Wege, durch den extrinsischen Todesrezeptoren-Pathway oder durch eine Kombination beider Wege ausgelöst werden.

Unter allen Umständen werden die Initialcaspasen durch Bildung von Apoptosomen aktiviert, welche dann die Stimulation der Effektorcaspasen (Caspase-3), den mitochondrialen Schaden und den Zellabbau verursachen. Intrinsische und extrinsische Wege sind zusammengebunden, die aktive Caspase-3 spaltet eine Reihe von Molekülen, was zu morphologischen und biochemischen Änderungen in der Zelle führt.

Der extrinsische Pathway kann entweder zum direkten Zelltod führen oder über den intrinsischen Weg verstärkt werden („mitochondrialer Loop“).



(a)



(b)

Abb. 1.7: Caspase-Kaskaden. (a) intrinsische mitochondriale Signalwege, (b) extrinsische Todesrezeptoren Pathways (aus Sauerwald and Betenbaugh, 2004).

1.6 Gentoxikologie, DNA-Schädigung und Reparatur

Bei der Gentoxikologie handelt es sich um die Untersuchung der toxischen Wirkung der Testsubstanzen auf das DNA-Material der Zellen. Schädigungen der DNA werden normalerweise als Mutationen, chromosomale Aberrationen, DNA-Brüche und DNA-Addukte gemessen.

Gentoxische Substanzen wirken krebsauslösend und führen zu Erbkrankheiten. Daher werden Chemikalien (Pharmaka, Industriechemikalien) entsprechend internationalen Richtlinien (OECD) routinemäßig auf DNA-schädigende Eigenschaften hin untersucht (Ehrlich *et al.*, 2004). In den letzten Jahrzehnten wurden verschiedene *in vivo* und *in vitro* Testsysteme entwickelt um die Wirkung der Chemikalien bzw. der Strahlungen auf die Zell-DNA und auf Chromosomen zu untersuchen. Die meist benutzten *in vitro* Systeme sind bakterielle Systeme oder *gene damage* Systeme in kultivierten Ratenzellen. Als *in vivo* Systeme werden normalerweise Ratten- bzw. Mäuse-Knochenmarkzellen verwendet (Zeiger, 2001).

Von allen bekannten DNA-Läsionen stellen die DNA-Doppelstrangbrüche (DSBs) die fatalsten Fehler dar, weil sie die DNA-Kontinuität stören, welche für die Replikation und die

Transkription eine absolute Voraussetzung ist. Fehlende oder ungenaue Reparatur der DSBs kann zum Zelltod, zu Mutationen und zu chromosomalen Aberrationen oder zur Krebsentstehung führen (Pfeiffer, 1998).

Doppelstrangbrüche können durch verschiedene Faktoren verursacht werden:

- Exogene Faktoren wie z.B. ionisierende Strahlung (*IR*) und bestimmte mutagene Chemikalien oder Chemotherapeutika.
- Endogene Faktoren wie oxidative Stoffwechselprodukte z.B. freie Radikale (Radikale Sauerstoffspezies (ROS) *reaktive oxygen species*).
- Spontan während der DNA-Replikation oder normal während der V(D)J Rekombination zur Herstellung der Antikörper-Diversität.
- Durch programmierte Wirkung der Endonukleasen (Pastwa and Blasiak, 2003).

Doppelstrangbrüche können sowohl genotoxische Effekte (DNA-Brüche und Nukleotidaustausche) als auch Apoptose induzieren. DSBs werden über zwei Hauptwege repariert: die fehlerfreie homologe Rekombination (HR) und die fehleranfällige nicht-homologe Endenvereinigung (*non-homologous end-joining*, NHEJ). In einfachen Eukaryoten wie Hefen überwiegt HR, während bei Säugetieren NHEJ der vorherrschende Reparaturweg ist. Auch der Zellzyklus ist bedeutsam: NHEJ findet hauptsächlich in der G₀/G₁-Phase statt, HR dagegen in der späten S- und G₂-Phase (Efferth, 2006).

Die Hauptkomponenten des NHEJ-Systems sind: Das Ku-Protein, ein Heterodimer bestehend aus den Untereinheiten Ku70 und Ku86, und die katalytische Untereinheit der DNA-Proteinkinase (DNA-PKcs). Ku ist der Nachname eines japanischen Polymyositis-Patienten, bei dem das Ku-Protein zum ersten Mal identifiziert wurde.

Das Ku-Heterodimer und die DNA-PKcs bilden gemeinsam die aktive Kinase, welche auch als DNA-abhängige Proteinkinase (DNA-PK) bezeichnet wird. Das Heterodimer Proteinkomplex DNA-PK gehört zur Familie der Phosphatidylinositol-3 Kinase verwandten Proteine (*PI3K*).

Zusätzliche Komponenten des NHEJ-Systems sind die Artemis, XRCC4 und DNA-Ligase IV [das XRCC4/DNA-Ligase IV Heterodimer] (Lieber *et al.*, 2004). Der Nukleasekomplex RAD50/MRE11/NBS1 (eine Familie der Sir-Proteine) kann auch an dem DNA-Reparaturprozess teilnehmen (Pastwa and Blasiak, 2003).

Alle DNA-Reparaturprozesse beginnen mit der Erkennung der DNA-Läsion. Dafür sind Sensor-Proteine verantwortlich, welche die Art der DNA Schädigung erkennen und mit einem

korrespondierenden Reparaturweg koppeln. Diese sind beim NHEJ-System das Ku70/Ku86-Heterodimer (Efferth, 2006).

Beim NHEJ-System werden die beiden Enden eines DSB ligiert, ohne dass eine Sequenzhomologie zwischen den beiden DNA-Enden benötigt wird.

Die Reparatur erfolgt in folgenden Schritten:

1. **DNA-Bindung:** Das Heterodimer Ku70-Ku86 bindet an die Enden des gebrochenen DNA-Doppelstrangs (Smith and Jackson, 1999). Durch die Bindung mit dem Ku-Komplex werden die DNA-Bruchenden aligniert, für die Ligation vorbereitet und vor einem Verdau durch Exonukleasen geschützt (Cary *et al.*, 1997; Pang *et al.*, 1997; Yaneva *et al.*, 1997; Feldmann *et al.*, 2000).
2. **Komplexbildung:** Das Ku-Heterodimer assoziiert mit der katalytischen Untereinheit der DNA-Proteinkinase (DNA-PK), die DNA-PKcs und aktiviert somit ihre Kinasefunktion (Dvir *et al.*, 1992; Gottlieb and Jackson, 1993). Der gesamte Proteinkomplex wird jetzt als DNA-PK-Holoenzym bezeichnet. DNA-PKcs weist Serin/Threonin-Kinaseaktivität auf und phosphoryliert XRCC4, welches nun mit der DNA-Ligase-IV komplexiert.
3. **Prozessierung der DNA-Enden:** Ein Nuklease Komplex aus den Proteinen MRE11, RAD50 und NBS1 prozessiert die DNA am 3'-Ende durch Entfernung überhängender DNA (Paull and Gellert, 1998; Khanna and Jackson, 2001). Die *flap*-Endonuklease-1 (Fen1) übernimmt diese Aufgabe am 5'-Ende (Fiorentini *et al.*, 1997). Auch das Protein Artemis, welches mit DNA-PK komplexiert, prozessiert die DNA-Überhänge. Artemis besitzt eine 5'-Nukleasefunktion, die erst nach der Phosphorylierung mit DNA-PKcs aktiviert wird (Ma *et al.*, 2002; Lieber *et al.*, 2003).
4. **Die Religation erfolgt durch DNA-Ligase-IV:** Die DNA-PK rekrutiert ein Komplex (Tetramer) bestehend aus der DNA-Ligase IV und dem XRCC4 zu dem DSB um die DNA-Enden zusammen zu ligieren (Junop *et al.*, 2000; Lee *et al.*, 2000; Sibanda *et al.*, 2001).

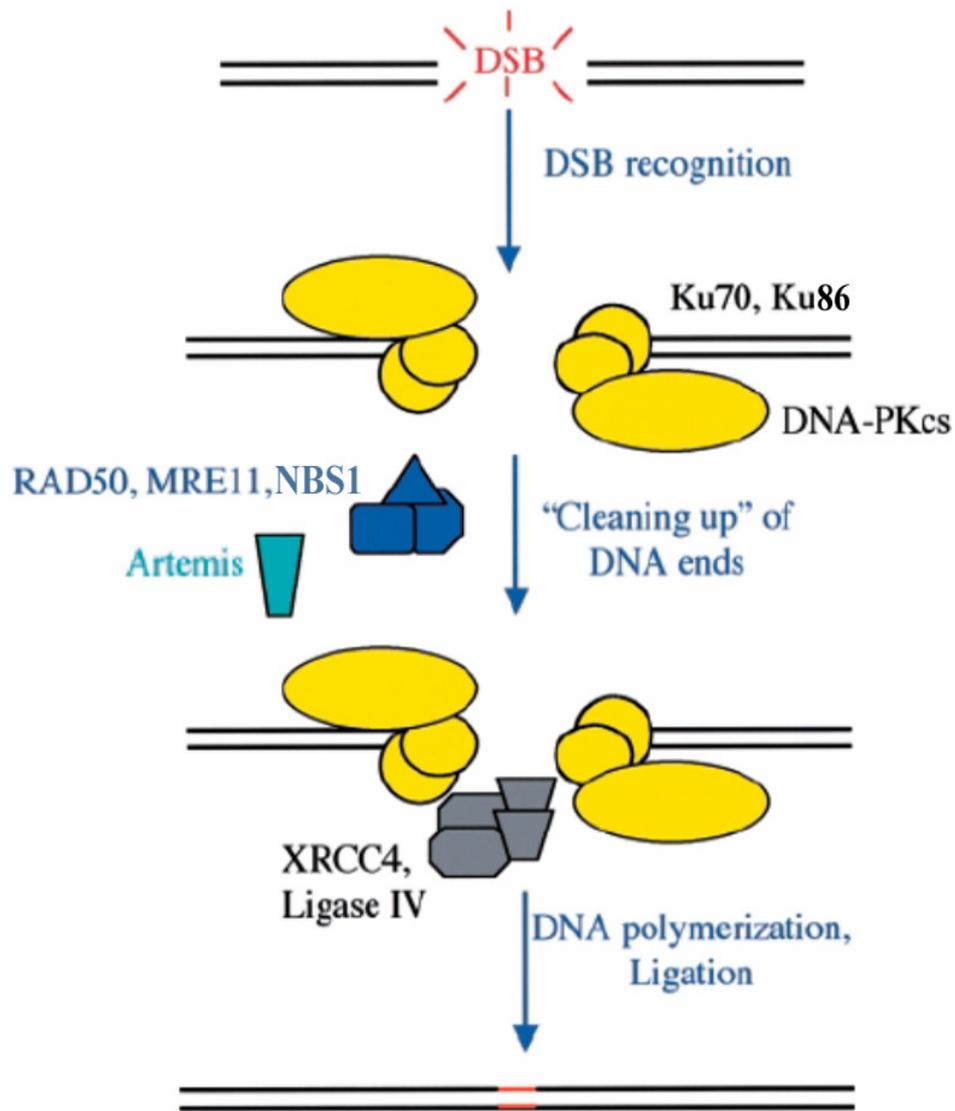


Abb. 1.8: Reparatur der DNA-Doppelstrangbrüche mittels des NHEJ-Systems (modifiziert aus Jackson, 2002).

1.7 Zielsetzung

Im Rahmen dieser Arbeit sollen die folgenden Schwerpunkte bearbeitet werden:

- Makroskopische und mikroskopische Untersuchung der Merkmale der Süßpflanze *Lippia dulcis* aus Mexiko und Vergleich mit denen von *L. dulcis* aus verschiedenen geographischen Regionen (Panama und Nicaragua).
- Versuch der Isolation und Identifikation neuer Stoffklassen (z.B. Cumarine, Saponine) aus *L. dulcis*, die bisher für die Pflanze nicht bekannt sind.
- Gewinnung des ätherischen Öls aus den verschiedenen Pflanzenteilen (Mexiko, Panama und Nicaragua) mittels Wasserdampfdestillation, Herstellung mehrerer Pflanzenextrakte mit Hilfe verschiedener Lösemittel und anschließende Bestimmung des Hernandulcin- und Camphergehaltes mittels GC und HPLC.
- Isolierung des Süßstoffs Hernandulcin und die Bestimmung seiner Süßkraft im Vergleich zu Saccharose.
- Ermittlung der Zytotoxizität und Bestimmung der IC₅₀-Werte für Hernandulcin, Campher, die ätherischen Öle und den ethanolischen Extrakt (da die Pflanze als Tinktur benutzt wird). Die Studie soll an humanen Karzinomzellen der Linie HepG2 durchgeführt werden.
- Untersuchung der morphologischen Änderungen der HepG2-Zellen und Bestimmung der Art der toxischen Effekte für die o.g Substanzen im Sinne von Apoptose oder Nekrose.
- Untersuchung der Mutagenität des Hernandulcins und der ätherischen Öle und die Beurteilung des Risikos ihrer Verwendung beim Menschen für Lebensmittel- bzw. Therapiezwecke.
- Untersuchung der pharmakologischen Merkmale der in Mittel- und Südamerika traditionell verwendeten *L. dulcis* Pflanzen. Um dieses Ziel zu erreichen, sind die folgenden Experimente geplant:
 1. Der Einfluss der ethnobotanisch genutzten Pflanze auf die Aktivität der humanen neutrophilen Elastase soll untersucht werden.
 2. Um die volksmedizinische und phytotherapeutische Anwendung der Pflanze als Hilfsmittel gegen Husten und Bronchitis auf eine wissenschaftliche Basis zu stellen, soll in dieser Arbeit die beanspruchte bronchospasmolytische Wirkung der Pflanze nachgeprüft werden.

- Beurteilung der Eignung von *L. dulcis* als Süßstoffpflanze bzw. als Arzneipflanze zur Behandlung von Erkältungskrankheiten.

2. MATERIAL UND METHODEN

2.1 Geräte

Analysenwaage BP 211D	Sartorius, Göttingen
Begasungsbrutschrank Cellstar	Nunc GmbH, Wiesbaden
CASY-Zellzählgerät, Model DT	Schärfe System GmbH, Reutlingen
Digitalkamera	Canon Power Shot G5, Japan
Digitalkamera für Fluoreszenzmikroskop DXM1200	Nikon, Japan
Electrophoresis Power Supply 220/240 V	Biotec-Fischer, Reiskirchen
Feinwaage CP 224S-OCE	Sartorius, Göttingen
Fluoreszenzmikroskop BX 41	Olympus, Japan
Gasbrenner flammy S	Schütt Labortechnik GmbH, Göttingen
Gaschromatographie Anlage: Hewlett packard 5890 series II mit Autosamplar	Hewlett packard, USA
Hewlett packard 7973	
Geltrockner 443 Slab dryer 230 V, 50 Hz	Bio-Rad Laboratories GmbH, München
HPLC-Anlage	Knauer, Berlin
Hybridisierungsöfen OV3	Biometra, Goettingen
Lichtmikroskop TMS-F	Nikon, Japan
Magnetrührer Ikamag RCT	Janke & Kunkel GmbH, Staufen
Membran-Vakuumpumpe für Rotationsverdampfer	Vacuubrand, Wertheim
Microfuge [®] Centrifuge	Beckman Coulter, Krefeld
Mikroplattenphotometer Tecan Spectra Fluor	Tecan, Österreich
Mini Protean [®] 3	Bio-Rad Laboratories GmbH, München
Mini Protean [®] II	Bio-Rad Laboratories GmbH, München
pH-Messgerät	Schott AG, Mainz
pH Meter HI 931400	Hanna instruments, USA
Präzitherm Präzisions-Heizplatte	Harry Gestigkeit GmbH, Düsseldorf
RC-5B Refrigerated Centrifuge	Sorvall, USA
Rotationsverdampfer Rotavapor R	Büchi AG, Schweiz
Rundschüttler, SLT Shaker	Elmech GmbH, Celle
Sicherheitswerkbank Herasafe	Heraeus Instruments, Berlin
Sub TM DNA Cell	Bio-Rad Laboratories GmbH, München
T _B 1 Thermoblock	Biometra, Goettingen
Temperierbad IKA TS2	IKA Labortechnik, Staufen
Tischzentrifuge Biofuge pico	Heraeus-Christ, Hanau
Tischzentrifuge Medifuge 200 S	Heraeus Instruments GmbH, Hanau
Trockenschrank WTB	Binder, Tutlingen
Ultraschallbad Sonorex RK 100	Bandelin Electronic, Berlin

Ultrazentrifuge Optima L 90 K	Beckman-Coulter, München
UV-2101 PC UV-VIS Scanning Spectrophotometer	Shimadzu, Japan
UV-Bildschirm TI 1	Biometra, Göttingen
UV-Kamera	Herolab, Wiesloch
UV-Lampe CabUVIS- Desaga Sarstedt Gruppe	Desaga GmbH, Wiesloch
UV-Lampe UV-Kabinett II	Camag, Schweiz
Vakuum-Sicherheits-Absaugsystem AZ 04	HLC-Biotech, Bovenden
Varioklav	H+P Labortechnik GmbH, Oberschleißheim
Video Documentation System ICU-1/SU-1	Herolab, Wiesloch
Voltage Power Pack PP 4000	Biometra, Göttingen
Vortex Genie II	Scientific Industries, USA
Wasserbäder 1002-1013	GFL, Burgwedel
Werkbank Clean Air CLF 360	Woerden, Niederlande

2.2 Material

2.2.1 Chemikalien, Reagenzien und Zellmedien

Aceton	KMF Laborchemie Handels GmbH, Lohmar
Acetonitril	LGC Promochem, Wesel
Acridinorange	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen
Acrylamid/Bisacrylamid	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
Agarose	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
Ameisensäure $\geq 98\%$ p.a.	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
Ammoniaklösung	Merck KGaA, Darmstadt
Anisaldehyd	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
APS	Bio-Rad Laboratories GmbH, München
β -Mercaptoethanol	Merck KGaA, Darmstadt
Bromphenolblau	Merck KGaA, Darmstadt
BSA	Promega, Mannheim
Butanol	KMF Laborchemie Handels GmbH, Lohmar
(+)-Campher	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
Casy Clean Lösung	Schärfe System GmbH, Reutlingen
Casy Ton Lösung	Schärfe System GmbH, Reutlingen
Chloralhydrat	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
Chloroform	Merck KGaA, Darmstadt
<i>Coomassie brilliant blue</i>	Serva Electrophoresis GmbH, Heidelberg
Cyclohexan	Neolab, Heidelberg
Dichlormethan	KMF Laborchemie Handels GmbH, Lohmar
Diethylether	Merck KGaA, Darmstadt
Dimethylsulfoxid p.a.	Merck KGaA, Darmstadt

Diphenylborsäure- β -aminoethylester	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
Essigsäure 100% p.a.	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
Ethanol, absolut	KMF Laborchemie Handels GmbH, Lohmar
Ethidiumbromid	Merck KGaA, Darmstadt
Ethylacetat	KMF Laborchemie Handels GmbH, Lohmar
Ethylendiamintetraacetat	Merck KGaA, Darmstadt
Fetales Kälberserum	Biochrom KG, Berlin
Formaline 37%, zur Synthese	Merck KGaA, Darmstadt
Glycerol	Merck KGaA, Darmstadt
Glyzin	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
GW311616A	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen
Hämatoxylinlösung III nach Gill	Merck KGaA, Darmstadt
Hexan	KMF Laborchemie Handels GmbH, Lohmar
Isopropanol	KMF Laborchemie Handels GmbH, Lohmar
Kaliumhydroxid	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
Kaliumjodid	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
MEM-EARLE (1x) (mit 2,2 g/l NaHCO ₃ und stabilem Glutamin)	Biochrom KG, Berlin
Methanol	KMF Laborchemie Handels GmbH, Lohmar
MTT	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen & Lancaster Synthesis, Karlsruhe
Natriumchlorid	Merck KGaA, Darmstadt
Natriumdodecylsulfat	Merck KGaA, Darmstadt
Natriumpyruvat (100 mM)	Biochrom KG, Berlin
Nicht-essentielle Aminosäuren (100x)	Biochrom KG, Berlin
N-Methoxysuccinyl-Ala-Ala-Pro-Val-p-Nitroanilid	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen
PBS- Dulbecco -Puffer (1x) ohne Ca ²⁺ , Mg ²⁺	Biochrom KG, Berlin
Petrolether	KMF Laborchemie Handels GmbH, Lohmar
Phloroglucin	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
Polyethylenglykol-4000	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
Ponceau S	Merck KGaA, Darmstadt
Salzsäure (HCl)	Merck KGaA, Darmstadt
Schwefelsäure 95-98%	Merck KGaA, Darmstadt
Staurosporin	Serva Electrophoresis GmbH, Heidelberg
Sulfosalicylsäure	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
N, N, N', N'-Tetramethylethylendiamin	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
Toluol	Merck KGaA, Darmstadt
Trichloressigsäure	Merck KGaA, Darmstadt
Tris-(Hydroxymethyl-)aminomethan	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
Triton X-100	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen

Trypsin/EDTA-Lösung [0,05% / 0,02% (m/v)] in PBS ohne Ca ²⁺ , Mg ²⁺	Biochrom KG, Berlin
Trypsin-Inhibitor (type I-S: from soybean)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen
Tween 20	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen
Vanillin	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
Wismut(III)-nitrat, basisch, zur Analyse	Merck KGaA, Darmstadt

Alle weiteren Chemikalien wurden von den Firmen Merck KGaA, Sigma-Aldrich Chemie GmbH und Carl Roth GmbH bezogen.

2.2.2 Verbrauchsmaterialien

6/ 96 Well Platten	Greiner Bio-One, Frickenhausen
Einmal-Injektionskanülen Gr. 1, Sterican	B. Braun Melsungen AG, Melsungen
Flüssigkeitsreservoir steril 55 ml	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
Filterpapier Whatman 3 MM	Whatman International Ltd., Maidstone, UK
Gewebekulturflaschen (25/ 75 cm ²), steril	Greiner Bio-One, Frickenhausen
Kryoröhrchen (2 ml)	Greiner Bio-One, Frickenhausen
Mikroskopische Deckgläschen (18x18 mm)	Gerhard Menzel GmbH, Braunschweig
Objektträger (76x26 mm)	Gerhard Menzel GmbH, Braunschweig
Nalgene Cryo 1°C Freezing Container	Nalge Nunc International, UK
Omnifix-Einmalspritzen 1 ml/ 2 ml/ 10 ml	B. Braun Melsungen AG, Melsungen
Sterilfilter Minisart, Porengröße 0,2 µm	Sartorius, Göttingen
Zentrifugenröhrchen 15&50 ml, steril	Corning Inc., USA
Zellschaber	Greiner Bio-One, Frickenhausen

Sterile Einwegartikel für die Zellkultur wie Pipetten, Tips, Reaktionsgefäße, etc. wurden von den Firmen Nunc (Wiesbaden), Merck, Greiner Bio-One und Carl Roth bezogen.

2.2.3 Kits und Hilfsmittel

BCA-(2,2'-Bicinchoninsäure-)	Pierce, USA
Proteinbestimmungsreagens	
Ku70/86 DNA Repair Kit	Active Motif, USA
<i>Cytotoxicity Detection</i> Kit (LDH)	Roche Applied Science, Mannheim
<i>Nuclear Extract</i> Kit	Active Motif, USA
Computerprogramm <i>EasyWin 32</i>	Herolab, Wiesloch
ECL- <i>Western blotting substrate</i>	Pierce, USA
Elektroporation Cuvettes PLUS TM	Bio-Rad Laboratories GmbH, München
Polaroidfilme für Videodokumentationssystem	Mitsubishi, USA
Nitrocellulosemembran (0,45 µM)	Bio-Rad Laboratories GmbH, München
Amersham Hyperfilm ECL	GE Healthcare Europe GmbH, München

2.2.4 Enzyme

Humane neutrophile Elastase (EC 3.4.21.37) Serva Electrophoresis GmbH, Heidelberg
aus menschlichen neutrophilen

Granulozyten isoliert, Enzymaktivität: 36
U/mg Protein

Proteinase K (20 mg/ml)

Carl Roth GmbH, Karlsruhe

Ribonuclease A aus bovine pancreas
(10 mg/ml)

Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen

2.2.5 Antikörper und Standards

1 kb DNA *ladder*

New England Biolabs, Ipswich

Low range molecular weight Standard für Proteingele

Bio-Rad Laboratories GmbH,
München

Primärer Antikörper: Ku70 und Ku86 Antikörper (0,1
mg/ml)

Active Motif, USA

Sekundärer Antikörper: HRP-konjugierten Anti-IgG-
Antikörper (0,4 mg/ml)

Active Motif, USA

Größenangaben und Abbildungen der DNA- und Protein-Standards sind im Anhang C beigefügt.

2.2.6 Puffer und Lösungen

Alle Puffer und Lösungen wurden in bidestilliertem Wasser angesetzt und wenn erforderlich sterilisiert.

2.2.6.1 Lösungen für botanische Untersuchungen

Chloralhydratlösung:

160 g Chloralhydrat wurden in 100 ml H₂O bidest. und 20 ml Glycerin gelöst.

Phloroglucin Lösung:

1-5 g Phloroglucin wurden in 100 ml 92% Ethanol gelöst.

Zur Überprüfung der Brauchbarkeit der Lösung (Phloroglucin/HCl) wurde die Reaktion mit einem Stück Papier ausprobiert. Hier ist die Färbung bereits mit dem bloßen Auge gut sichtbar.

2.2.6.2 Puffer und Lösungen für die DNA Gelelektrophorese

TE Puffer

10 mM Tris/Cl pH 7,4

1 mM EDTA

50 x TAE Puffer

2 M	Tris/Cl
50 mM	EDTA pH 8,0
1 M	Essigsäure

Als Gelpuffer für die Agarosegelelektrophorese wurde 1 x TAE und für den Laufpuffer $1/2$ x TAE eingesetzt.

6 x Loading Dye

0,25% (w/v)	Bromphenolblau
30% (v/v)	Glycerol

Lysepuffer (zur Vorbereitung des DNA Lysates)

10 mM	Tris/Cl pH 7,4
10 mM	EDTA
0,5% (v/v)	Triton X-100

2.2.6.3 Puffer und Lösungen für Proteinanalysen***Complete Lysis Puffer***

10 mM	DTT
1% (v/v)	<i>Protease Inhibitor Cocktail</i>
89% (v/v)	Lysis Puffer AM1

Diese Lösung wurde direkt vor Gebrauch hergestellt, da einige Proteaseinhibitoren 24 Stunden nach der Verdünnung einen Aktivitätsverlust zeigen.

Cracking Puffer

50 mM	Tris/Cl pH 6,8
2 mM	EDTA pH 8,0
143 mM	β -Mercaptoethanol
2% (v/v)	SDS
10% (v/v)	Glycerol
0,1% (w/v)	Bromphenolblau

5 x SDS Laufpuffer

125 mM	Tris/Cl
1,25 M	Glyzin
0,5% (v/v)	SDS

Coomassie Färbelösung

7,5% (v/v)	Eisessig
50% (v/v)	Methanol
0,25% (w/v)	<i>Coomassie brilliant blue</i>

Entfärbelösung für SDS-PAGE

100 ml	Eisessig
300 ml	Methanol
600 ml	Aqua dest.

2.2.6.4 Puffer und Lösungen für immunologische Reaktionen**10 x Blot Puffer Stammlösung**

140 g/l	Glyzin
30 g/l	Tris/Cl

1 x Blot Puffer

100 ml	10 x Blot Puffer
200 ml	Methanol
1 ml	10% SDS
ad 1000 ml	Aqua dest.

10 x Ponceau Färbelösung

2% (w/v)	Ponceau S
30% (w/v)	Trichloressigsäure
30% (w/v)	Sulfosalicylsäure
ad 100%	Aqua dest.

TBS (Tris buffered Saline)

10 mM Tris/Cl pH 7,5

150 mM NaCl

TBS/Tween/Triton Puffer

20 mM Tris/Cl pH 7,5

500 mM NaCl

0,05% (v/v) Tween 20

0,2% (v/v) Triton X-100

Blocking Puffer

3% (w/v) BSA

0,1% (v/v) Tween 20

in TBS Puffer

2.2.6.5 AO/EB Lösung

50 µg Acridinorange und 100 µg Ethidiumbromid in 1 ml PBS-Puffer. Diese Lösung wird lichtgeschützt und bei 4°C aufbewahrt.

2.2.6.6 Krebs-Henseleit-solution (KHS)

NaCl 118 mM, KCl 4,7 mM, CaCl₂ 2,5 mM, MgSO₄ 1,2 mM, KH₂PO₄ 1,2 mM, NaHCO₃ 25 mM und D-glucose 10 mM (pH 7,4).

2.2.7 Pflanzenmaterial

- *Lippia dulcis* Trev. aus Mexiko (auch als Aztekisches Süßkraut bezeichnet) wurde als kleine Pflanze im Jahr 2004 bei der Gärtnerei helenion Hof Vogelsang (Randowtal) gekauft und im Gewächshaus des Instituts für Pharmazie der FU-Berlin kultiviert.
- Die Samen von *Lippia dulcis* Trev. aus Panama (auch als *Phyla dulcis* Moldenke bezeichnet) wurden im März 2006 von Herrn Prof. Dr. Mahabir P. Gupta, Centro de Investigaciones Farmacognóstica de la Flora Panamena (CIFLORPAN) Facultad de Farmacia Universidad de Panamá zur Verfügung gestellt. Die Samen wurden im Gewächshaus ausgesät um die Pflanze zu gewinnen.

- ***Lippia dulcis*** aus Nicaragua auch als *Phyla dulcis* bezeichnet: Getrocknete Blüten und Samen wurden im März 2006 von Fundación Centro Nacional de la Medicina Popular, Costado sur escuela Anexa 1/2 Calle al Oeste, Estelí, Nicaragua erworben und im Gewächshaus ausgesät.

Getrocknete Samen- und Pflanzenexemplare aus allen drei Varietäten der Pflanze wurden im Drogenlager des Instituts für Pharmazie der FU-Berlin aufbewahrt. Zur Lagerung wurden die Pflanzenteile für einige Tage im Trockenschrank bei 30°C getrocknet und anschließend in Metall Dosen gefüllt.

2.3 Methoden

2.3.1 Morphologische Untersuchungen

Für die makroskopischen Untersuchungen wurden frische Pflanzenteile direkt untersucht, beschrieben und mit der Digitalkamera fotografiert. Für die mikroskopischen Untersuchungen wurden sowohl frische Pflanzen als auch gepulverte Trockendrogen verwendet. Querschnitte von den frischen Pflanzenteilen wurden von Hand mit einer Rasierklinge angefertigt. Zur Aufhellung der Präparate wurden sie mit einem Tropfen Chloralhydratlösung auf einem Objektträger versetzt, mit einem Deckgläschen bedeckt und kurz erhitzt. Das Präparat wurde dann mit Wasser gewaschen um die Chloralhydratlösung zu entfernen. Nachdem das Deckgläschen abgenommen und das überschüssige Wasser abgetropft war, wurden einige Tropfen Phloroglucin-Lösung zugegeben. Die Lösung läßt man 15 Sek. bis 5 Min. lang auf den Schnitt einwirken. Anschließend wird ein Tropfen Salzsäure unter dem Deckgläschen hindurch gezogen. Dabei färben sich die verholzten Zellwände rot an.

2.3.2 Phytochemische Methoden

2.3.2.1 Isolierung und Quantifizierung des ätherischen Öls

Das ätherische Öl wurde durch kontinuierliche Wasserdestillation aus frischen und trockenen Pflanzen und Pflanzenteilen (Blätter, Blüten und Stängel) gewonnen. 10-50 g Droge wurden zerkleinert und in einer Wasserdampfdestillationsapparatur gemäß Europäischem Arzneibuch für 4 Stunden destilliert. Als Vorlage diente Hexan. Die Destillation ergab ein klares gelbes Öl, welches sehr aromatisch und sehr süß schmeckt.

Die Quantifizierung des ätherischen Öls verschiedener Teile der Droge erfolgte volumetrisch entsprechend den Angaben des Europäischen Arzneibuchs zur Gehaltsbestimmung. Aus dem

abgelesenen Volumen des ätherischen Öls wurde der Gehalt an ätherischem Öl in ml/100g Pflanzenmaterial berechnet.

2.3.2.2 Herstellung der Pflanzenextrakte

2.3.2.2.1 Ethanolischer Extrakt

5 g gepulverte getrocknete ganze Drogen wurden mit 100 ml 70%igem (v/v) EtOH zugedeckt, für 3 Stunden bei Raumtemperatur gerührt und für 30 Minuten in einem Ultraschallbad gehalten. Anschließend wurde der Extrakt abfiltriert und das Filtrat wurde im Vakuum bei 40°C eingengt. Die Ausbeute war ca. 17,6%.

2.3.2.2.2 Pflanzenextrakte für das Screening

Für das Screening nach den Stoffklassen wurden die entsprechenden Extrakte wie folgt hergestellt:

A- Zur Prüfung auf **Alkaloide** wurde 1 g der pulverigen Droge mit 1 ml einer 10%igen Ammoniaklösung durchfeuchtet und anschließend mit 5 ml Methanol für 10 Minuten im Wasserbad extrahiert. Vom Filtrat wurden 20 µl auf die DC-Platte aufgetragen.

B- Zur Prüfung auf **Saponine** wurde 1 g der pulverigen Droge mit 5 ml Methanol für ca. 10 Min. auf dem Wasserbad extrahiert, der Methanolextrakt wurde auf ca. 1 ml eingengt, mit 0,5 ml Wasser versetzt und mit 3 ml n-Butanol ausgeschüttelt. Von der Butanolphase wurden jeweils 20 µl für die DC verwendet.

Saponine bilden in wässrigen Lösungen stabile Schäume. Zur Durchführung dieses Tests wurde 0,5 g der pulverigen Droge mit 10 ml heißem Wasser in einem Reagenzglas übergossen und nach dem Abkühlen 10 Sekunden geschüttelt. Wenn die Droge Saponine enthält, entsteht 1-10 cm hoher Schaum.

C- Zur Prüfung auf **Cumarine** wurde 1 g der pulverigen Droge mit 10 ml Dichlormethan 15 Min. unter Rückfluss extrahiert. Das zur Trockene eingengte Filtrat wurde in 1 ml Toluol gelöst und davon 20 µl für die DC verwendet.

D- Zur Prüfung auf **Anthraglykoside** wurde 1 g der pulverigen Droge mit 5 ml Methanol ca. 10 Min. auf dem Wasserbad extrahiert und anschließend filtriert. Vom filtrierten Drogenextrakt wurden 20 µl für die DC-Untersuchung aufgetragen.

E- Um die Stoffklasse für das Screening anzureichern wurden 50 g getrocknete und gepulverte oberirdischer Pflanzenteile mit PE für 8 Tage im Soxhletgerät extrahiert. Der Extrakt wurde am Rotationsverdampfer zur Trockne gebracht. Der getrocknete Drogenrückstand wurde dreimal mit jew. 600 ml MeOH/Wasser (8:2) übergossen und unter Rühren für 2 Stunden bei RT extrahiert. Das Lösemittel wurde dann im Vakuum abgezogen

und der Extrakt wurde nachfolgend im Wasser aufgenommen und gegen Lösemittel aufsteigender Hydrophilie ausgeschüttelt (Dichlormethan, Ethylacetat, n-Butanol). Die Lösemittel wurden jeweils unter reduziertem Druck im Vakuum (Rotavapor) bei 40°C abgezogen.

Ausbeuten der Extraktionen: 2,9% Petrolether-Extrakt, 1,2% Dichlormethan-Extrakt, 0,8% Ethylacetat-Extrakt, 2,8% n- Butanol-Extrakt.

2.3.2.3 Analyse des Öls und der Drogenextrakte mittels Dünnschichtchromatographie

Für die DC-Trennung wurden als Stationärphase DC-Alufolien Kieselgel F₂₅₄, 10x10 cm, Schichtdicke 200 µm, Laufstrecke 100 mm (Merck KGaA, Darmstadt) verwendet.

Als Mobilphase (MP) dienten die folgenden Lösemittel je nach Ziel der Trennung:

A: Hexan-Aceton (17:3) zur Analyse des ätherischen Öls und Trennung von Hernandulcin und Campher. Vor dem Auftrag auf die Platte wurde das Öl 20 fach mit Chloroform verdünnt.

B: Ethylacetat-Methanol-Wasser (100:13,5:10) zur Trennung polarer Stoffe wie Anthraglykoside, Alkaloide, Saponine.

C: Toluol-Ethylacetat (93:7) zur Trennung lipophiler Stoffe wie Cumarine und ätherischer Öle.

D: Ethylacetat-Ameisensäure-Eisessig-Wasser (100:11:11:26) zur Analyse von Cumarin-glykosiden.

E: Toluol-Ether (1:1, gesättigt mit 10% Essigsäure) für Cumarin-aglykone.

F: Chloroform-Eisessig-Methanol-Wasser (64:32:12:8) für Saponine.

Zum Detektieren der mittels DC getrennten Stoffe wurden die DC-Platten mit verschiedenen Detektionsmitteln besprüht und unter UV-Strahlung mit einer Wellenlänge von 254 bzw. 366 nm visualisiert. Alle Detektionsreagenzien sind hier zusammengefasst:

I. Anisaldehyd-Schwefelsäure-Reagenz (Wagner and Bladt, 1996)

0,5 ml Anisaldehyd wurde mit 10 ml Eisessig, 85 ml Methanol und 5 ml konz. Schwefelsäure in der angegebenen Reihenfolge gemischt. Die DC-Platte wird nach dem Besprühen 5-10 Minuten auf 110°C im Trockenschrank erhitzt und im Tageslicht ausgewertet.

II. Dragendorff's Reagenz (Munier und Macheboeuf)

Lösung A: 0,85 g basisches Wismutnitrat wurde in 10 ml Eisessig und 40 ml Wasser gelöst.

Lösung B: 8 g Kaliumjodid wurden in 20 ml Wasser gelöst.

Vorratslösung: Gleiche Volumina von A und B wurden gemischt und lichtgeschützt aufbewahrt.

Sprühlösung: Vor Gebrauch wurden 1 ml Vorratslösung mit 2 ml Eisessig und 10 ml Wasser gemischt. Die Platte wurde bei Tageslicht ausgewertet.

III. Kaliumhydroxid-Reagenz (Wagner and Blatt, 1996)

10 g Kaliumhydroxid wurden in 100 ml Ethanol gelöst. Die Platte wurde mit dieser Lösung besprüht und die Auswertung erfolgte im UV bei 366 nm und im Tageslicht.

IV. Naturstoff –Polyethylenglykol- Reagenz (Wagner and Blatt, 1996)

Auf die DC-Platte wurden nacheinander eine 1%ige methanolische Lösung von Diphenylborsäure- β -ethylaminoester und eine 5%ige ethanolische Lösung von PEG 4000 gesprüht. Anschließend wurde bei 366 nm ausgewertet.

V. Vanillin-Schwefelsäure-Reagenz (Wagner and Blatt, 1996)

Lösung 1: 1%ige ethanolische Vanillinlösung.

Lösung 2: 10%ige ethanolische Schwefelsäurelösung.

Die DC-Platte wurde mit Lösung 2 besprüht, im Anschluss daran mit Lösung 1 nachbesprüht, für 5-10 Minuten unter Beobachtung bei 110°C erhitzt und im Tageslicht ausgewertet.

2.3.2.4 Isolierung des Hernandulcins mittels Säulenchromatographie (SC)

Das Hernandulcin wurde aus dem ätherischen Öl nach folgendem Schema isoliert:

Stationäre Phase:	Kieselgel 60 zur SC, Korngröße 63-200 μm , Merck KGaA, Darmstadt	
Mobile Phase:	MP A: Fraktion 1-39	CH_2Cl_2 -EtOAc (65,5:1)
	Fraktion 40-78	CH_2Cl_2 -EtOAc (19:1)
	Fraktion 79-90	CH_2Cl_2 -EtOAc (9:1)
	MP B: Fraktion 1-40	Cyclohexan-Aceton (19:1)

Die Adsorbentien wurden in dem jeweils verwendeten Fließmittel suspendiert und in eine mit Watte abgedichtete Säule gegeben. Das ätherische Öl (ohne Verdünnung) wurde vorsichtig auf die gefüllte Säule (38,5 cm x 1,7 cm) aufgegeben und mit dem MP A chromatographiert (Belastung der Säule 1:100, Tropfgeschwindigkeit: ca. 1 ml pro Min.). Es wurden 90 Fraktionen von ca. 5 ml gesammelt. Alle Fraktionen wurden mittels DC, wie unten beschrieben untersucht, hinsichtlich ihres Hernandulcingehalts vereinigt und am Rotationsverdampfer bei 35°C eingeengt.

Dann folgte eine zweite Auftrennung der Hernandulcin-haltigen Fraktionen (Fraktionen 52-80) in einer Glassäule (30 cm x 1,5 cm) an Kieselgel mit dem MP B (Belastung der Säule 1:250, Tropfgeschwindigkeit ca. 2 ml pro Min.). Es wurden 40 Fraktionen je 5 ml gesammelt und auf DC-Platten kontrolliert. Nach der DC-Auftrennung wurden die Fraktionen in zwei

Vereinigungen zusammengefasst. Die Vereinigung (13-18) enthielt Hernandulcin, während die Vereinigung (19-30) Epihernandulcin aufwies.

Kontrolle der Säulenchromatographiefraktionen mittels DC

Proben aus allen gesammelten Fraktionen der Säulenchromatographie wurden auf DC-Platten wie folgt beschrieben analysiert:

Stationäre Phase: DC-Alufolien Kieselgel 60 F₂₅₄, Schichtdicke 0,2 mm, Merck KGaA, Darmstadt

Mobile Phase: MP 1: Fraktion 1-90 (1. Auftrennung) CH₂Cl₂-CHCl₃-EtOAc
(16:3:1)

MP 2: Fraktion 1-40 (2. Auftrennung) n-Hexan-Aceton (17:3)

Detektion: 1. Die Platte wurde unter UV-Licht 254 nm ausgewertet.
2. Vanillin-Schwefelsäure Reagenz: Die Platte wurde mit dem Reagenz besprüht und anschließend für 5-10 Min. auf 110°C erhitzt und im Tageslicht ausgewertet.

Die Referenzsubstanz Hernandulcin wurde bei der AK vom Prof. Gust (Institut für Pharmazie der FU-Berlin) nach Kim *et al.* (2003) synthetisiert, die analytischen Daten sind im Anhang A gezeigt.

2.3.2.5 Gaschromatographische Analyse des ätherischen Öls

Mit Hilfe einer GC-Analyse wurde der Gehalt an Campher und Hernandulcin im ätherischen Öl quantitativ untersucht.

Trennsäule: HP-5 (crosslinked 5% PHME Siloxane) Hewlett Packard (hp), USA.
30 m x 0,32 mm ID, Filmdicke: 0,5 µm

Temperaturprogramm: GC-Injektor: 220°C

GC-Ofen Max.: 300°C

Flammenionisationsdetektor: 350°C

Säulentemperatur:

Anfangstemperatur: 70°C (4 min)

Aufheizrate: 2°C/min bis auf 125°C (5 min)

10°C/min bis auf 250°C (2 min)

Trägergas: N₂, Gasfluss 2,7 ml/min

Injektions: Automatische Probenaufgabe (mit Autosampler, Hewlett Packard 7973)

Injektionsvolumen: 1 µl (1% Öl in Hexan)

splitless injection

2.3.2.6 Untersuchungen mittels Hochdruckflüssigkeitschromatographie (HPLC)

Die Bestimmung von Campher und Hernandulcin im Öl wurde auch durch analytische HPLC nach folgendem Protokoll durchgeführt:

Apparatur: Isokratisches HPLC- System, Knauer, Berlin

Stationäre Phase: Eurospher 100 C18, 5 µm, 4x250 mm, Knauer, Berlin

Mobile Phase: Acetonitril/Aqua bidest. 6:4 (v/v)

Flußrate: 1 ml/min

Aufgabevolumen: 15 µl (3% Öl in MeCN)

Detektion: UV-Spektrum Detektor, 205 nm

Temperatur: RT

2.3.3 Bestimmung des Süßungsgrads von Hernandulcin

Dieser erfolgte auf organoleptischem Wege durch Vergleich der Süßkraft von Hernandulcin mit der von Saccharose. Es wurde eine ethanolische Stammlösung von Hernandulcin (1 mg/300 µl) hergestellt, die sehr süß im Geschmack ist. Von der Stammlösung wurden dann eine Reihe von Verdünnungen (1:50- 1:300) in EtOH gemacht.

Von Saccharose wurde eine leicht süße wässrige Lösung mit einer Konzentration von 7 mg/ml hergestellt (Nelson *et al.*, 2001). Es wurden sowohl von der Saccharose- als auch von jeder Hernandulcinverdünnung 50 µl auf einem Stück Filterpapier aufgebracht. Die Süßigkeit jeder Verdünnung wurde mit der von der Zuckerlösung verglichen.

Zur Bestimmung des Süßungsgrads einer Substanz sollte man in der Standardprozedur ein ausreichendes Volumen der Testsubstanzlösung in den Mund nehmen und schmecken. Weil das große Mengen der Testsubstanz erfordert, was im Falle des Hernandulcins sehr schwer zu realisieren war, wurde der Test modifiziert und ein Filterpapier verwendet um das in kleinen Mengen isolierbare Hernandulcin testen zu können.

2.3.4 Zellbiologische Methoden

2.3.4.1 Zelllinien des humanen hepatozellulären Karzinoms HepG2

Für die in dieser Arbeit durchgeführten Experimente wurde die humane Hepatomzelllinie HepG2 (DSMZ: ACC180) verwendet. HepG2-Zellen wurden 1975 aus dem Lebertumorgewebe eines 15-jährigen männlichen Argentiniers mit hepatozellulärem Karzinom isoliert. Bei HepG2 handelt es sich um eine mäßig differenzierte humane Hepatomzelllinie mit dem Wildtyp-p53, die keine Hepatitis-B Gene besitzen (Aden *et al.*, 1979; Knowles *et al.*, 1980). Sie wachsen adhärent epithel-ähnlich in Monolayern in kleinen Aggregationen bei einer ca. 50-60 stündigen Verdopplungszeit und bleiben langfristig morphologisch stabil. HepG2-Zellen exprimieren eine Vielzahl von Serumproteinen wie z.B. Albumin, α 1-Antitrypsin, α -Fetoprotein, Transferrin, Haptoglobin, Komplementfaktor C3, Plasminogen, β -lipoprotein (Knowles and Aden, 1983).

2.3.4.2 Kultivierung der HepG2-Zelllinie

HepG2-Zellen wurden in sterilen Gewebekulturflaschen mit modifizierter Oberfläche in einem Brutschrank mit 5% CO₂ bei 37°C und einer wasserdampfgesättigten Atmosphäre kultiviert. Die Kultivierung erfolgte im MEM-EARLE Medium (mit 2,2 g/l NaHCO₃ und stabilem Glutamin) unter Zusatz von 10% fetalem Kälberserum, 1% nichtessentiellen Aminosäuren, 1% Natriumpyruvat und ohne Antibiotikazusatz.

2.3.4.3 Subkultivierung der HepG2-Zelllinien

Die Zellkulturen wurden beim Erreichen der Konfluenz einmal wöchentlich unter Verwendung einer Trypsin/EDTA-Lösung (0,05% / 0,02% in PBS, pH 7,2) im Verhältnis von 1:8 gesplittet.

Nach Absaugen des alten Mediums, wurden die Zellen zunächst mit 5 ml Dulbecco-PBS gewaschen, um das verbrauchte Medium mit den Trypsininhibitoren zu entfernen. Zu den Zellen wurden dann 2 ml einer Trypsin/EDTA-Lösung zugegeben und bei 37°C für 4-6 Min. inkubiert, bis die Zellen vom Boden der Kulturflasche vollständig abgelöst sind (nicht abgelöste Zellen konnten durch leichtes Abklopfen anschließend in Suspension gebracht werden). Nach einer mikroskopischen Überprüfung der Zellablösung wurden 2 ml eines neuen Kulturmediums zu den Zellen gegeben, um die Wirkung des Trypsins abzustoppen und das zytotoxische EDTA zu neutralisieren. Nach einer sorgfältigen Suspendierung der Zellen ins neue Kulturmedium wurden die Zellen in neuen Kulturflaschen weiterkultiviert.

2.3.4.4 Bestimmung der Zellzahl

Für Versuche mit definierter Zellzahl wurde die Zellzahl mit Hilfe eines elektronischen CASY-Zellzählgerätes (*Cell Counter Analyser System*) bestimmt, so dass die Zellen in der gewünschten Dichte ausgesät werden konnten. Hierbei stellt die Messung eine Kombination aus elektrischem Widerstandsmessprinzip und Pulsflächenanalyse dar. Bei diesem Verfahren ist es möglich, gleichzeitig die Zellzahl und die Größenverteilung (lebende und tote Zellen zu differenzieren) einer Zellpopulation zu bestimmen. Zur Zählung wurden 100 µl der Zellsuspension mit 10 ml CASY[®]TON (einer isotonen Elektrolytlösung) verdünnt. Das Probenvolumen wird mit konstanter Strömungsgeschwindigkeit durch eine spannungsbelegte Messkapillare gesaugt. Dabei wird der definierte Widerstand der Kapillare beim Durchtreten der Probe durch eine Präzisionsmeßpore durch die Isolator-Wirkung intakter Zellen erhöht. Unter der Voraussetzung, dass die Zellen die Kapillare einzeln passieren, ist diese Widerstandsänderung ein Maß für das Zellvolumen. Nach Durchführung der Einzelmessungen wird das Integral des Messsignals (Pulsflächenanalyse) und aus der volumenlinearen Originalverteilung eine durchmesserlineare Größenverteilung berechnet.

2.3.4.5 Kryokonservierung und Revitalisierung der Zellen

Eine Konservierung von Kulturzellen und Geweben kann durch Einfrieren der Zellen in flüssigem Stickstoff bei -196°C erfolgen. So eingefrorene Zellen sind jahrelang haltbar und nach Bedarf jederzeit wieder auftau- und kultivierbar. Die Kryokonservierung wurde sowohl als Schutz vor Verlust der Zelllinie bei Kontamination als auch zur Aufbewahrung von Zellen angewendet. Die Lagerung in Flüssigstickstoff bewahrt die Zellen vor genetischer Variabilität und bringt sowohl die Stoffwechselaktivität als auch die Zellvermehrung vollständig, aber reversibel zum Erliegen.

Als Einfriermedium diente das Zellmedium, welchem 10% DMSO zugefügt wurde. DMSO schützt die Zellen während des Einfrierens vor der irreversiblen Zerstörung durch Kristallbildung.

Zum Einfrieren der Zelllinie wurden konfluent wachsende Zellen mit Hilfe von Trypsin-EDTA-Lösung von der Zellkulturflasche (75 cm²) abgelöst, in frischem Medium suspendiert und in Zentrifugenröhrchen überführt. Die Zellen wurden bei 1600-1800 rpm für 5 Minuten pelletiert. Anschließend wurde das Pellet im Einfriermedium resuspendiert (ca. 2x10⁶ Zellen/ml) und in Kryoröhrchen aliquotiert.

Da sich, trotz der Zugabe von DMSO, die zerstörerische Bildung von Eiskristallen nicht vollständig verhindern lässt, darf eine Einfriergeschwindigkeit von -1°C pro Minute nicht

überschritten werden. Hierzu wurde die zum Einfrieren fertige Zellsuspension in einem mit Isopropanol gefüllten Gefriercontainer (Cryo 1°C Freezing Container, Nalgene) bei -80°C eingefroren. Dieser Container gewährleistet eine langsame und kontinuierliche Abkühlung mit ca. 1°C/Min. Anschließend wurden die Kryoröhrchen in Flüssigstickstoff (-196°C) gelagert.

Revitalisierung der Zellen

Im Gegensatz zum Einfrieren soll das Auftauen der gefrorenen Zellen schnell erfolgen um die schädigende Wirkung von DMSO auf die Zellen einzuschränken. Die Zellen wurden deshalb schnell in einem Wasserbad (37°C) aufgetaut und sofort mit 10 ml des Auftaumediums (entspricht Zellmedium mit 20% FCS) vorsichtig vermischt. Die Zellsuspension wurde anschließend für 5 Minuten bei 1800 rpm zentrifugiert und das Einfriermedium mit dem zellschädlichen DMSO abdekantiert. Die Zellen wurden dann im Auftaumedium resuspendiert und auf Kulturflaschen verteilt. Ab dem nächsten Tag wurde ein Mediumwechsel alle 2-3 Tage durchgeführt, bis die Zellen ein konfluentes Wachstum erreichten. Als die Zellen eine konfluente Monoschicht bildeten, wurden sie in ein 10%iges FCS-Medium überführt.

2.3.5 Bestimmung der Zytotoxizität mittels MTT-Test

Die Zytotoxizität des ethanolischen Extraktes, der ätherischen Öle, Campher und vom Hernandulcin wurde an der HepG2-Zelllinie mittels MTT-Test bestimmt.

Das Prinzip der MTT-Methode (Mosmann, 1983) basiert auf der enzymatischen Reduktion des gelben, wasserlöslichen Tetrazoliums Salzes MTT [3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-Diphenyltetrazoliumbromid] zum wasserunlöslichen Formazan (blau-violett) Abb. 2.1. Diese Reduktion findet in den Mitochondrien vitaler Zellen statt, in denen sich das blaue Endprodukt lagert. Die Färbung der Zellen ist visuell sehr gut erkennbar. Mit Hilfe von DMSO kann das im Zellinneren kristallin abgelagerte Formazan in Lösung gebracht werden. Die Intensität des entstehenden Farbstoffs ist der Aktivität der Dehydrogenasen und damit der Überlebensrate der Zellen proportional und kann spektrophotometrisch gemessen werden.

Der MTT-Test wurde an der HepG2-Zelllinie (Passage 7-15) vorgenommen und nach Freshney *et al.* (1990) durchgeführt. Dabei wurden 96 Well Mikrotiterplatten verwendet, pro Kavität wurden ca. 7×10^3 Zellen in 100 µl Medium ausgesät. Die Testsubstanzen wurden in DMSO gelöst und mit Medium auf die gewünschten Konzentrationen aufgefüllt. 100 µl der zu untersuchenden Substanzlösung wurden nach 24 Stunden Inkubation (37°C, 5% CO₂, Brutschrank) pro Kavität zugegeben und die Zellen wurden für 3 Tage weiter inkubiert. Dann

wurden 20 µl einer 5 mg/ml MTT-Lösung (in PBS-Puffer) pro Kavität zugegeben, für 3 Minuten geschüttelt und 2 Stunden im Brutschrank (37°C, 5% CO₂) inkubiert. Anschließend wurden alle Flüssigkeiten entfernt und 100 µl DMSO (pro Kavität) zugegeben. Die Platte wurde für 15 Min. geschüttelt und die Absorption bei λ 580 nm (Hintergrundwellenlänge: λ 620 nm) im Plattenphotometer vermessen.

Es wurde eine Konzentrations-Wirkungskurve dargestellt. Aus dieser Kurve wurde die Konzentration bei der eine 50%ige Inhibition des Zellwachstums auftrat (IC₅₀) bestimmt.

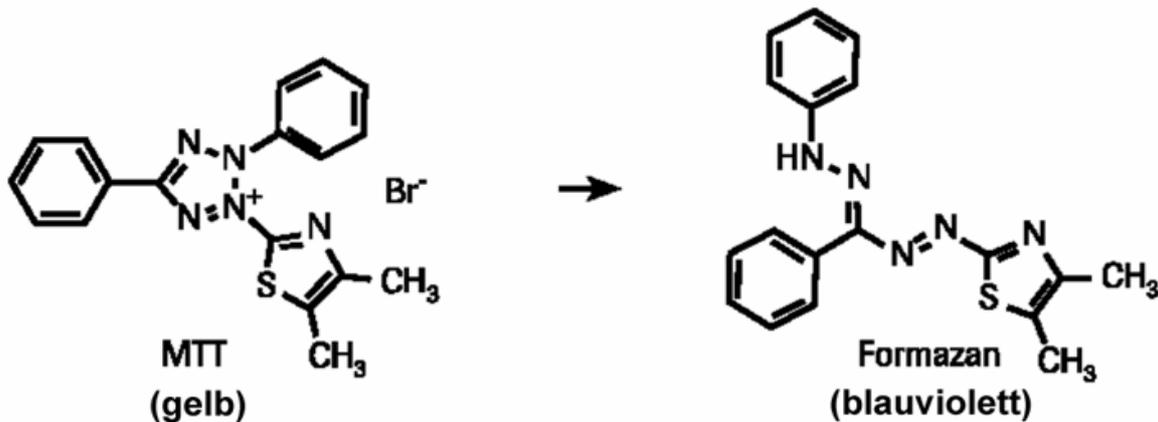


Abb. 2.1: Prinzip des MTT-Tests (Roche Applied Science).

2.3.6 Hämatoxylin-Färbung von Zellkulturen

Die Hämatoxylinfärbung ist eine Übersichtsfärbungsmethode, die zur Visualisierung der Zellkerne im Zellverband dient. Sie wird benutzt zur histologischen Darstellung der Zell- bzw. Gewebestrukturen, wie z.B. Zellkernen, Mitochondrien, Myelin, Elastin und Kollagenfasern.

Zur Durchführung der Hämatoxylinfärbung wurden 10⁵ HepG2-Zellen (Passage 4, 7, 19) auf sterilisierten entfetteten Deckgläschen in einer 6 Well Gewebekulturplatte kultiviert (die Deckgläschen wurden zuvor mit einer Mischung aus 37% HCl/Methanol im Verhältnis von 1:9 entfettet, mit bidest. Wasser gewaschen und in absolutem Ethanol gelagert ggf. zur sofortigen Benützung abgeflammt). Nach Anhaftung der Zellen wurden 2 ml Medium zugegeben und im Brutschrank für ca. 24 Stunden inkubiert. Zur optimalen Vorbereitung der Zellen sollte auf eine gut vereinzelte Aussaat geachtet werden. Danach wurden die Zellen mit der zu untersuchenden Substanz bzw. der Negativkontrolle (DMSO) behandelt und für weitere 3 Tage inkubiert.

Zum Fixieren und Färben der Zellen wurde das Kulturmedium (mit der Substanz) vorsichtig mit Hilfe einer Pasteurpipette abgesaugt. Anschließend wurden die auf den Deckgläschen adhären Zellen zweimal für je 5 Min. mit jew. 2 ml 1 x PBS-Puffer (pH 7,4) gewaschen.

Die Fixierung erfolgte durch die Zugabe von 2 ml einer 4%igen Formalinlösung in PBS-Puffer (pH 7,4) und Inkubation für 20 Minuten bei RT. Anschließend wurden die Zellen 3-mal für je 5 Min. mit bidest. Wasser gewaschen und luftgetrocknet. Die Zellen wurden dann mit der Hämatoxylinlösung für 10 Minuten gefärbt, mit bidest. Wasser gewaschen. Zur Beobachtung unter dem Lichtmikroskop wurde das Deckgläschen umgekehrt mit den präparierten Zellen nach unten auf einen Glycerol/PBS Tropfen (1:1) auf einen Objektträger gelegt.

2.3.7 Molekularbiologische Methoden

2.3.7.1 Isolierung apoptotischer DNA

Für diesen Zweck wurden die Zellen in einer Dichte von 2,5 Millionen in eine Kulturflasche 2-3 Tage kultiviert. Nach Inkubation der Zellen mit der zu untersuchenden Substanz für 4-72 Stunden erfolgte die Isolation der DNA aus den behandelten Zellen wie folgt:

Das Medium mit abgelösten Zellen wurde in vorgekühlte 15 ml Zentrifugierröhrchen überführt. Die anhaftenden Zellen wurden mit einem sterilen Zellschaber abgelöst und in 15 ml Röhrchen transferiert. Die Zellen wurden durch Zentrifugation bei 1600-1800 rpm für ca. 8 Min. pelletiert, mit 1 ml PBS gewaschen und in ein 2 ml Eppendorfgefäß überführt. Zum Pelletieren wurden die Zellen bei 1900 rpm und 4°C für 10 Min. zentrifugiert und der Überstand wurde abgossen. Anschließend wurde das Zellpellet in 600 µl Lysepuffer resuspendiert und für ca. 30 Min. bei 4°C inkubiert. Zum Trennen der Zelldebris vom Überstand wurde der Ansatz zentrifugiert (12000 x g, 4°C, 20-30 Min.). Das klare Lysat (enthält die apoptotischen DNA-Fragmente) wurde in ein neues Eppendorfgefäß überführt. Zum Lysat wurden dann RNase mit einer Endkonzentration von 300 µg/ml zugegeben und das Gesamte wurde für 1 Stunde bei 37°C im Wasserbad inkubiert. Die restlichen Proteine wurden durch Zugabe von Proteinase K mit einer Endkonzentration von 300 µg/ml und einer 3-stündige Inkubation bei 50°C abgebaut.

Zur Fällung der DNA-Fragmente wurden 500 mM NaCl und 50% Isopropanol zugegeben und der Ansatz wurde anschließend bei -20°C über Nacht inkubiert. Die DNA wurde dann durch Zentrifugation (12000 x g, 4°C, 15 Min.) pelletiert, der Überstand wurde abgossen und das DNA-Pellet wurde bei RT luftgetrocknet. Die DNA wurde dann in 25 µl TE Puffer aufgenommen und mit 5 µl *Loading dye* vermischt und mittels DNA-Agarosegel analysiert.

2.3.7.2 Nachweis der DNA-Fragmentation mittels Agarosegelelektrophorese

Agarose ist das wichtigste Trägermaterial für die Elektrophorese von Nukleinsäuren. Es handelt sich um ein Polymer, das aus verknüpften Galaktoseeinheiten besteht.

Die Wanderungsgeschwindigkeit der DNA-Moleküle wird dabei von mehreren Faktoren beeinflusst: Der Form der DNA (zirkular, linear, doppelsträngig oder einzelsträngig), der Agarosekonzentration, der angelegten Spannung sowie der Wahl des Laufpuffers. Bei einem leicht alkalischen pH-Wert liegen die Phosphatreste der Nukleinsäure negativ geladen vor. Da bei Nukleinsäuren das relative Verhältnis zwischen Phosphatresten und Molekulargewicht und damit die relative Molekülladung konstant bleibt, ist die elektrophoretische Beweglichkeit von DNA-Molekülen durch ein Gelnetzwerk proportional zum Molekulargewicht (bzw. zur Anzahl der Basenpaare des Moleküls).

Durch Vergleich der Wanderungstrecke einzelner DNA-Fragmente unbekannter Größe mit Fragmenten bekannter Basenpaaranzahl lässt sich die Größe der unbekanntes DNA bestimmen.

Durchführung:

Zur Analyse der apoptotischen DNA-Fragmente wurde in dieser Arbeit die Agarose-Gelelektrophorese verwendet (Sambrook *et al.*, 1989). Zur Herstellung dieser Agarosegele wurde die Agarose in 1 x TAE Puffer in einer Konzentration von 1,5% in der Mikrowelle aufgekocht, abgekühlt, sofort auf einen Gelträger mit einem Kamm gegossen und zum Festwerden bei RT für 15 Min. inkubiert. Nach dem Festwerden wurde der Gelträger mit dem Agarosegel in das Elektrophoresegerät transportiert und in ½ x TAE als Laufpuffer getaucht. Die zu untersuchenden DNA-Proben wurden mit 1/6 Volumen eines 6 x Ladepuffers versetzt und in die Geltaschen geladen. Die DNA-Auftrennung erfolgte dann bei 90 Volt für ca. 90 Min. bis die blaue Lauffront des Bromphenolblaus ca. 2 cm vom Gelende entfernt ist. Zur Detektion wurden die Gele nach der Auftrennung für 20 Minuten in einer 2,5 µg/ml Ethidiumbromid Lösung gefärbt. Das fluoreszierende Ethidiumbromid interkaliert zwischen den Basen der Nukleinsäuren und macht sie unter UV-Strahlung sichtbar. Zur Dokumentation wurden die gefärbten Gele auf einem UV-Leuchttisch mit einer Wellenlänge von 302 nm gelegt sowie mit Hilfe einer Digitalkamera fotografiert (Geldokumentationssystem von Herolab).

2.3.8 Untersuchung der Kernmorphologie mittels AO/EB Färbung

Zur Bestimmung der Zahl der apoptierten Zellen nach einer Substanzbehandlung wurden die Zellen mit einer Acridinorange/Ethidiumbromid Mischung gefärbt. Ethidiumbromid und

Acridinorange sind fluoreszierende DNA-Farbstoffe, die zwischen den DNA-Basen interkalieren können. Acridinorange kann als Lebendfarbstoff von Zellen aufgenommen werden und färbt somit sowohl lebende als auch tote Zellkerne grün. Im Gegensatz dazu kann Ethidiumbromid von der Zelle nur durch eine geschädigte Zellmembran aufgenommen werden und färbt somit tote Zellkerne orange. Diese Doppelfärbungsmethode macht es möglich, zwischen verschiedenen Zustandsformen der Zelle zu unterscheiden:

- Lebende Zellen weisen einen grünen, normal strukturierten Zellkern und orange RNA-Flecken im zytoplasmatischen Bereich auf
- Frühapoptotische Zellen haben einen grünen, kondensierten, geschrumpften oder fragmentierten Zellkern
- Spätapoptotische Zellen zeigen einen orangen, kondensierten, geschrumpften oder fragmentierten Zellkern
- Nekrotische Zellen zeigen einen orangen, normalkonfigurierten oder ballonierten Zellkern (großer als normal)

Zur Durchführung der AO/EB Färbung wurden die HepG2-Zellen (Passage 10-13) in einer 6 Well Gewebekulturplatte mit einer Dichte von (6×10^5 /Well) ausgesät und für 24 Stunden im Brutschrank kultiviert. Danach wurden die Zellen mit der zu untersuchenden Substanz behandelt und für 48 Stunden weiter inkubiert. Als Positivkontrolle wurden die Zellen mit Staurosporin (500 nM Endkonzentration in DMSO) behandelt, welches als Induktor des intrinsischen Weges der klassischen Apoptose in verschiedenen Zellkultursystemen dient (Leist and Jäättelä, 2001). Als Negativkontrolle dienten HepG2-Zellen, die mit DMSO für 48 Stunden behandelt wurden. Dann wurde das Medium mit den abgelösten Zellen abpipettiert, abzentrifugiert und mit den adhären Zellen gepoolt und bei 1700 rpm für 5 Minuten pelletiert. Anschließend wurde das Zellpellet mit PBS einmal gewaschen und in neuem PBS mit einer Endkonzentration von 10^6 Zellen/ml resuspendiert. Zum Färben wurden 2 μ l der AO/EB Lösung zu 50 μ l Zellsuspension zugegeben, vorsichtig durchgemischt und bei RT für 5 Minuten im Dunkeln inkubiert. Danach wurden die gefärbten Zellen auf einen Objektträger aufgetragen, mit einem Deckgläschen bedeckt und unter dem Fluoreszenz-Mikroskop (BX41; Olympus, Japan) bei einer Exzitationswellenlänge von 490 nm und einer 400 fachen Vergrößerung ausgezählt. Der Test wurde 3-mal wiederholt und es wurden jew. 100 Zellen gezählt. Die betrachteten Bilder wurden mit einer Digitalkamera (DXM1200; Nikon, Japan) dokumentiert.

2.3.9 Nachweis von Membranintegrität mittels LDH-Test

Die Zerstörung der Zellmembran durch toxische Substanzen ist ein morphologisches Charakteristikum der Zellnekrose. Sie führt zur Freisetzung der Plasmabestandteile (z.B. die Enzymen) in das Zellkulturmedium.

Die Laktatdehydrogenase (LDH) ist ein stabiles, im Zytoplasma aller Zellen vorkommendes Enzym, welches bei Zellwandschädigung in das Kulturmedium abgegeben wird und mittels LDH-Test nachgewiesen werden kann (für Prinzip siehe Abb. 2.2).

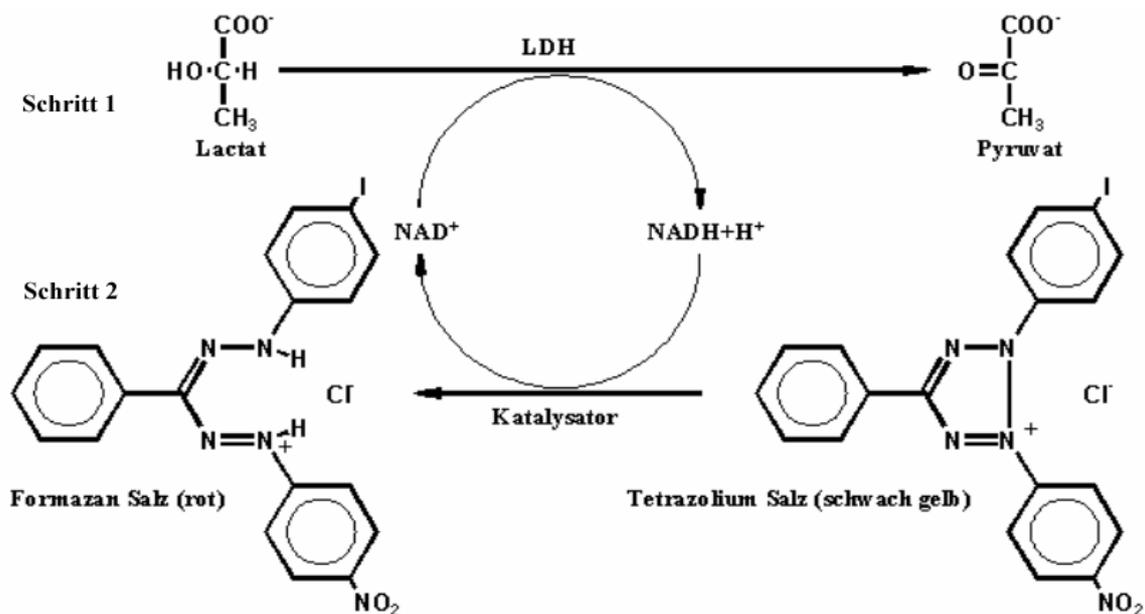


Abb. 2.2: Prinzip des LDH-Tests (modifiziert von *Cytotoxicity Detection Kit*, Roche).

Die freigesetzte LDH oxidiert das Lactat zum Pyruvat, dabei wird NAD^+ auf $\text{NADH}+\text{H}^+$ reduziert. Im zweiten Reaktionsschritt werden 2H von $\text{NADH}+\text{H}^+$ auf das schwach gelbe Tetrazoliumsalz INT (2-[4-Iodophenyl]-3-[4-nitrophenyl]-5-phenyltetrazoliumchlorid), mit Hilfe von Diaphorase als Katalysator, transferiert, was zur Entstehung eines roten Formazan Salzes führt. Die rote Farbe kann anschließend photometrisch bei λ 485 nm gemessen werden.

Durchführung des LDH-Tests:

Die kultivierten konfluenten HepG2-Zellen (Passage 2-4) wurden durch Trypsinierung geerntet und im Kulturmedium suspendiert, die Konzentration der Zellsuspension wurde mit Hilfe eines Casy-Zellzählgeräts auf $62,5 \times 10^3$ Zellen/ml eingestellt. Dann wurden 200 μl der Zellsuspension pro je Kavität (96 Well Mikrotiterplatte) ausgesät und bei 37°C , 5% CO_2 inkubiert. Nach 48 Stunden wurde das Medium entfernt und durch 200 μl eines frischen Assay-Mediums (mit 1% FCS), das die zu untersuchenden Substanzen enthielt, ersetzt und unter den gleichen Bedingungen für 4 Stunden weiter inkubiert.

Zur Bestimmung der Freisetzung von LDH wurde das *Cytotoxicity Detection Kit* (Roche Applied Science) verwendet. Dabei wurden 100 μl der Zellüberstand pro Kavität einer neuen

96 Well Mikrotiterplatte überführt, mit 100 µl Substratreagenz versetzt und im Dunkeln bei RT für 30 Minuten inkubiert. Anschließend wurde die enzymatische Reaktion durch Zugabe von 50 µl einer 1 M HCl Lösung gestoppt. Die entstandene rote Farbe wurde bei λ 485 nm in einem Plattenphotometer gemessen. Als Negativkontrolle dienten Zellen, die nur mit Medium und DMSO inkubiert wurden. Als Positivkontrolle wurden die Zellen mit 1% Triton X-100 behandelt.

Zusätzlich zu dem LDH-Test wurden ein Zytotoxizitätsassay (MTT) (Abschnitt 2.3.5) und ein DNA-ladder-Assay (Abschnitt 2.3.7) unter den gleichen Bedingungen durchgeführt. Die MTT Bestimmung wurde an der HepG2-Zelllinie (Passage 5-7) vorgenommen. Die Bestimmung erfolgte unter Verwendung einer 96 Well Mikrotiterplatte. Pro Kavität wurden ca. 20×10^3 Zellen in 200 µl Medium ausgesät. Nach einer 48 Stunden Inkubationszeit (37°C, 5% CO₂, Brutschrank) wurde die zu untersuchende Substanz (in 200 µl Medium mit 1% FCS) zugegeben und für 4 Stunden im Brutschrank inkubiert. Die Auswertung erfolgte wie im Abschnitt 2.3.5 beschrieben.

2.3.10 Proteinchemische und immunologische Methoden

2.3.10.1 Herstellung der Zellkernextrakt

Zur Gewinnung des Zellextraktes wurde das *Nuclear Extract Kit* (Active Motif) mit kleinen Änderungen verwendet.

HepG2-Zellen (Passage 6-12) wurden in 25 cm² Kulturflaschen in einer Dichte von 3 Mio. eingesät und im Brutschrank bei 37°C und 5% CO₂ für 2-3 Tage kultiviert. Dann wurden die zu testenden Substanzen zugegeben und für 16 oder 48 Stunden weiter inkubiert. Nach Beendigung der Inkubationszeit wurden die Zellen mit Hilfe eines Zellschabers in einer eiskalten PBS/Phosphataseinhibitoren Lösung suspendiert um weitere Proteinmodifikationen zu hindern. Die Zellsuspension wurde in vorgekühlte 15 ml Zentrifugierröhrchen überführt und abzentrifugiert (1600 rpm, 8 Min., 4°C). Das Zellpellet wurde in 500 µl Hypotonic Puffer resuspendiert, für 15 Min. auf Eis zum Schwellen der Zellen inkubiert. Anschließend wurden 25 µl der Detergenzlösung zugegeben und für 20 Sekunden stark gevortext. Das Homogenat wurde dann für 30 Sekunden bei der maximalen Geschwindigkeit und 4°C zentrifugiert und der zytoplasmatische Überstand wurde abdekantiert. Das Kernpellet wurde in 50 µl *complete lysis buffer* (enthält Proteaseinhibitoren zum Schützen der Proteine vor den proteolytischen Aktivitäten) resuspendiert, gevortext und für 45 Minuten bei 4°C unter ständigem Schütteln (150 rpm) auf Eis extrahiert. Anschließend wurde der Ansatz bei 4°C und maximaler

Geschwindigkeit für 30 Minuten zentrifugiert. Der Überstand mit den löslichen Kernproteinen wurde abpipettiert, in vorgekühlten Reaktionsgefäßen aliquotiert und bei -80°C gelagert.

2.3.10.2 Bestimmung der Proteinkonzentration mittels BCA-Assay

Der BCA-Assay ist eine Detergenz-kompatible Methode und beruht auf der Benutzung von *bicinchoninic acid* (BCA) zur kolorimetrischen Detektion und Quantifikation der Proteine in ihrer Lösung (Smith *et al.*, 1985). Hierbei werden Cu^{2+} Ionen in basischem Medium durch Proteine zu Cu^{1+} Ionen reduziert (Biuret Reaktion). Ein Cu^{1+} Kation kann dann mit zwei Bicinchoninsäure-Molekülen einen violetten, purpurnen sowie wasserlöslichen Chelatkomplex bilden. Makromolekulare Strukturen des Proteins und die Anzahl der Peptidbindungen sind für die Farbkomplexbildung verantwortlich (Wiechelman *et al.*, 1988). Die Farbintensität des Chelatkomplexes ist linear zur ansteigenden Proteinkonzentration und kann spektralphotometrisch bei 580 nm gemessen werden.

Zur Quantifizierung der Kernproteine wurde in dieser Arbeit das BCA-Protein-Assay Kit (Pierce) nach Angaben des Herstellers verwendet. Hierzu wurden auf einer 96 Well Mikrotiterplatte per Zweifachbestimmung jeweils 10 μl der zu bestimmenden Proteinlösung mit 200 μl einer frisch hergestellten Reagenzmischung (besteht aus BCA und Kupfersulfat) versetzt und für zwei Stunden bei RT inkubiert. Die Intensität der violetten Farbe wurde dann mit Hilfe eines Plattenphotometers gemessen und die Proteinkonzentration ($\mu\text{g}/\mu\text{l}$) wurde anhand einer erstellten Eichgerade bestimmt.

Zur Erstellung der Eichgerade wurde zunächst eine Reihe definierter BSA-Lösungen (*bovin serum albumin*) hergestellt. Eine Konzentrationssteigende (125-1800 $\mu\text{g}/\text{ml}$) BSA-Verdünnungsreihe wurde in *complete lysis buffer* aus einer Stammlösung (2 mg/ml) hergestellt.

Von jeder Verdünnung wurden 10 μl auf eine 96 Well Mikrotiterplatte überführt und mit dem Reagenz, wie oben beschrieben, behandelt und gemessen.

2.3.10.3 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

Zum Analysieren der extrahierten Kernproteine wurde die SDS-PAGE verwendet. Bei der diskontinuierlichen Sodiumdodecylsulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese werden die Proteine unter denaturierenden Bedingungen der Größe nach getrennt (Laemmli, 1970).

Hierbei wandern die Proteine durch ein elektrisches Feld in einem Polyacrylamid-Netzwerk (30% Acrylamid/ 0,8% Bisacrylamid), das als Molekularsieb fungiert. Die Zugabe des

Detergenz Sodiumdodecylsulfat (SDS) führt zur Linearisierung der Proteine durch Zerstörung der nicht kovalenten Bindungen in den Proteinketten. Die SDS-Moleküle lagern sich an die hydrophoben Regionen des Proteins an, wodurch es zu einer Maskierung der Eigenladung der Proteine kommt. Somit wird eine Auftrennung der Proteine nicht durch ihre Eigenladung beeinflusst, sondern nur durch die Größe des Proteins. Die Zugabe eines Reduktionsmittels wie β -Mercapthoethanol und die Erhitzung der Proteine auf 95°C führen zur Spaltung der Disulfidbrücken und somit zur Entfaltung der globulären Proteine und Lösung ihrer Tertiär- und Sekundärstrukturen.

Zur Durchführung der SDS-PAGE wurden 5% Sammelgele und 10% Trenngele gegossen, die genaue Zusammensetzung der SDS-Polyacrylamidgele ist in Tab. 2.1 beschrieben. 25 μ l der jew. Proteinprobe wurden mit 5 μ l *Cracking Buffer* (5x) vermischt, bei 95°C für 5 Minuten denaturiert und auf dem Gel aufgetragen. Als Größenmarker wurde der *low range molecular weight* Proteinstandard (BioRad) verwendet, 10 μ l (ca. 6 μ g) wurden pro Gel aufgetragen. Die Elektrophorese wurde zunächst für 10 Minuten mit 100 V betrieben, anschließend erfolgte die Auftrennung der Proteine bei 180 V für 60 Minuten in einem SDS-haltigen Laufpuffer. Beim Erreichen des unteren Gelrandes durch die Bromphenolblaufront wurde die Elektrophorese beendet. Dann wurden die Gele in eine frisch hergestellte *Coomassie blue*-Färbelösung für 30 Minuten angefärbt und danach in der Entfärbelösung für 30 Minuten bei RT auf dem Schüttler entfärbt. Durch kurzzeitiges Erhitzen der Gele in der Färb-/Entfärbelösung mit der Mikrowelle, konnte die Färb- bzw. Entfärbezeit erheblich reduziert werden. Das Gel wurde mit destilliertem Wasser gewaschen und auf Whatman-Papier im Geltrockner für eine Stunde bei 80°C getrocknet. Schließlich wurde das Gel mit einem Geldokumentationssystem digitalisiert und für die Auswertung verwendet. Mit dieser Methode lassen sich ca. 0,1 μ g Protein pro Bande nachweisen.

Zusammensetzung	Für 2 Sammelgele 5%	Für 2 Trenngele 12%
H ₂ O dest.	3,4 ml	3,3 ml
Acrylamid/Bisacrylamid (30% / 0,8%)	0,83 ml	4,0 ml
1,5 M Tris-HCl (pH 8,8)	-----	2,5 ml
1 M Tris-HCl (pH 6,8)	0,63 ml	-----
SDS 10%	0,05 ml	0,1 ml
APS 10%	0,05 ml	0,1 ml
TEMED	0,005 ml	0,005 ml

Tab. 2.1: Zusammensetzung der SDS-Polyacrylamidgele (Sambrook *et al.*, 1989).

2.3.10.4 Untersuchung der Mutagenität durch Bestimmung der Ku70/86 Proteine

Das Ku Protein ist ein Teil des Non-Homologous End-Joining NHEJ-Reparatursystems, es ist ein Heterodimer und besteht aus zwei Einheiten, Ku70 und Ku86. Im Falle einer DNA Beschädigung durch DNA-Doppelstrangbruch (DSB), binden die Ku70/Ku86 Proteine an die Enden der DNA-Brüche und helfen somit den gebrochenen DNA-Doppelstrang wieder in Ordnung zu bringen.

Ein Mangel an die Ku-Proteinen oder ihre Unfähigkeit die DNA-Brüche zur reparieren kann zu Chromosomeninstabilität führen und somit zu unkontrolliertem Zellwachstum (Tumor). Deswegen ist die Bestimmung der Ku-Proteine in den Zellen und Geweben von großer Bedeutung für die Forschung und Entwicklung neuer Medikamente. Bei einer DNA-Beschädigung durch bestimmte Substanzen oder Faktoren (radioaktive Strahlung) werden die Ku-Proteine in der Regel überexprimiert (Brown *et al.*, 2000).

Zur Bestimmung der Ku70/86 Proteine wurden in dieser Arbeit ELISA und Western Blot Verfahren benutzt.

2.3.10.4.1 ELISA (enzyme linked immunosorbent assay)

Beim ELISA-Verfahren können geringe Mengen von Antigen bzw. Antikörpern detektiert und mit Hilfe eines Mikrotiterplatten-Readers quantifiziert werden. Für diesen Zweck werden Antikörper verwendet, die mit einem Enzymsystem gekoppelt sind, welches eine Farbreaktion katalysiert, die zur Detektierung und Quantifizierung des vorhandenen Antigens dient. Erforderliche Antikörper (AK) werden entweder über das Immunsystem von Tieren gebildet (polyklonale Antikörper) oder in Zellkulturen hergestellt (Monoklonale AK).

Zur quantitativen Studie der Ku70/86 Proteine wurde in dieser Arbeit das Ku70/86 DNA Repair Kit (Active Motif) verwendet. Das Kit beruht im Prinzip auf einem indirekten ELISA-Verfahren um die Ku70/86 Regulation zu bestimmen. Doppelsträngige lineare DNA-Moleküle mit glatten Enden (*blunt ends*) wurden auf 96 Well ELISA-Platten immobilisiert. Wenn die Ku70/86 Proteine im Kernextrakt vorhanden sind, binden sie spezifisch an DNA und können dann mit einem Antikörper erfasst werden. Dafür werden die DNA-Protein Komplexe mit primären Anti-Ku-Antikörpern behandelt, nach einem Waschschrift folgt eine zweite Behandlung mit sekundären HRP-konjugierten Anti-IgG-Antikörpern, die eine Farbreaktion katalysieren und somit einfach mit einem Spektrophotometer quantifiziert werden.

Zur Durchführung des ELISA-Verfahrens, wurden zuerst die *wells* mit 40 µl Bindpuffer AM6 equilibriert, dazu wurden 10 µl einer 1 µg/µl Verdünnung des Proteinextrakts (in *complete lysis buffer*) zugegeben und bei RT für eine Stunde bei 100 rpm geschüttelt. Als Positivkontrolle dienten 2,5 µg/10 µl des Raji-Kernextrakts. Ein Nullabgleich Experiment wurde auch parallel mit nur 10 µl/Well *complete lysis buffer* durchgeführt. Nach der Inkubation wurden die *wells* mit 200 µl Waschpuffer 3-mal gewaschen. Anschließend wurde 100 µl einer 1:1000 Verdünnung der Anti-Ku70- bzw. Anti-Ku86-Antikörper zugegeben und zum Hybridisieren bei 100 rpm für 1 Stunde geschüttelt.

Die ungebundenen Antikörper wurden mit 200 µl Waschpuffer entfernt. Dann folgte eine Zugabe von 100 µl der HRP-konjugierten Anti-IgG-Antikörper (1:1000 verdünnt) und es wurde bei RT und 100 rpm für eine Stunde geschüttelt. Zum Entfernen der ungebundenen Antikörper wurden die *wells* 4-mal mit 200 µl Waschpuffer gewaschen. Anschließend wurden 100 µl einer *developing* Lösung pro Well zugegeben und die Platten wurden im Dunklen für 5 Minuten zum Entstehen einer blauen Farbe inkubiert. Zum Stoppen der Farbreaktion wurden 100 µl *stop solution* pro Well zugegeben (die Farbe ändert sich von blau auf gelb). Schließlich wurde die Intensität der gelben Farbe mit dem Plattenphotometer bei 450 nm und 620 nm (Referenzwellenlänge) gemessen.

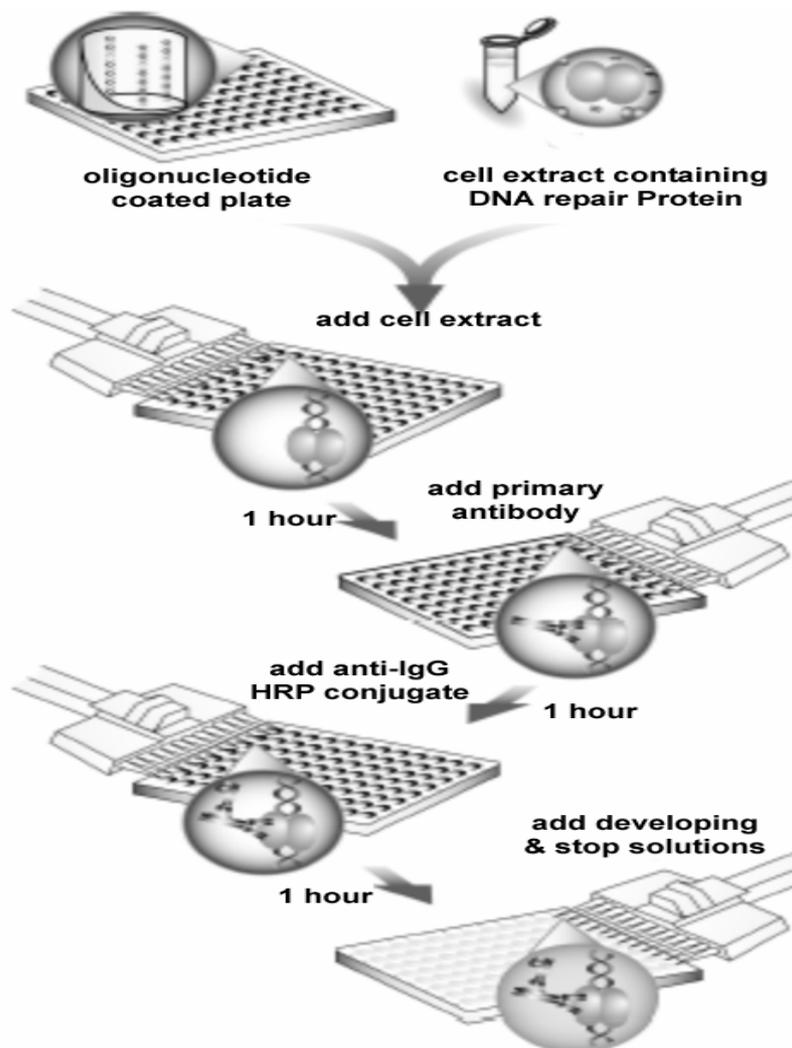


Abb. 2.3: Quantifizierung der Ku-Proteine mittels ELISA-Platten (Ku70/86 DNA Repair Kit, Active Motif).

2.3.10.4.2 Western Blot

Die Ku Proteine lassen sich spezifisch mit einem Anti-Ku Antikörper detektieren. Bei der Immunoblot- oder Western-Blot-Technik wurden die zu detektierenden Ku70/86 Proteine zunächst durch SDS-Gelelektrophorese getrennt, dann durch einen Elektrotransfer aus dem SDS-Gel auf eine Nitrocellulosemembran immobilisiert und anschließend mit Antikörpern detektiert. Zur Detektion der Zielproteine wurde die Nitrocellulosemembran zuerst mit spezifischen Anti-Ku-Antikörpern behandelt. Dann folgte eine Behandlung mit sekundären Anti-IgG-HRP-konjugierten Antikörpern, die spezifisch an die primären Anti-Ku-Antikörper binden. Zu Visualisierung der Proteinbanden wurde die Nitrocellulosemembran dann mit dem

Detektionssubstrat Luminol behandelt, welches durch die Peroxidase der sekundären Antikörper in Gegenwart von Wasserstoffperoxid oxidiert wird. Dabei entsteht eine Lichtstrahlung von 428 nm Wellenlänge, die durch die Exposition der Membran mit einem Fluorographiefilm (Hyperfilm ECL, Amersham) dokumentiert werden kann Abb. 2.4.

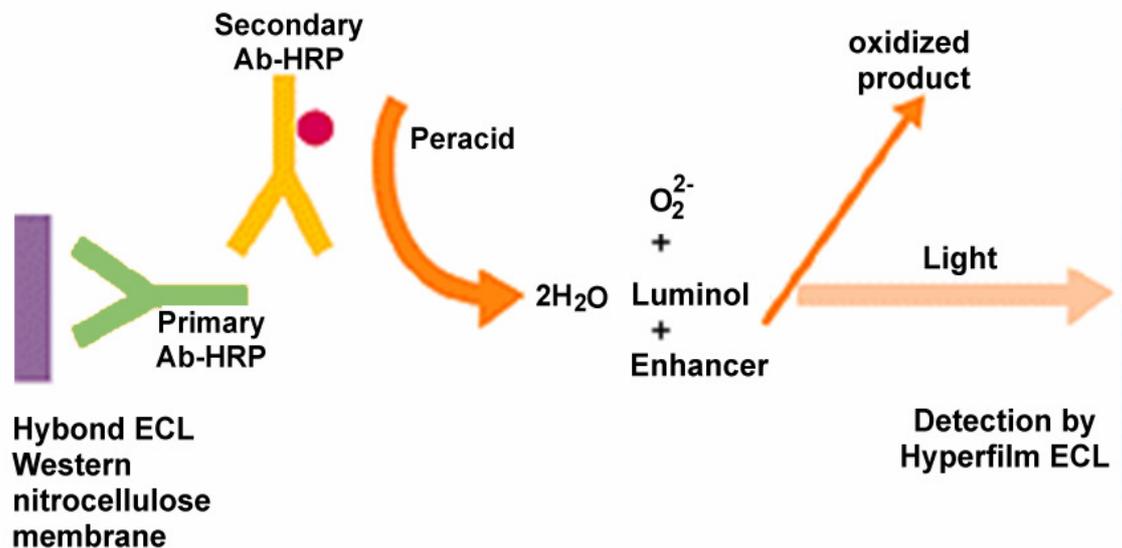


Abb. 2.4: Prinzip der Immunodetektion von Proteinen mittels Western Blot (GE Healthcare).

Die Durchführung des Western Blots erfolgte wie folgt:

10 μg der isolierten Kernproteine (Abschnitt 2.3.10.1) wurden mittels SDS-PAGE der Größe nach getrennt und anschließend mit der *Mini Protean Blot* Apparatur (BioRad) auf eine Nitrocellulosemembran übertragen. Für diesen Schritt wurden zuvor die Membran sowie das benötigte Filterpapier für 10 Minuten in 1 x Blot-Puffer äquilibriert. Die Übertragung erfolgte für 1,5 Stunden bei 50 Volt.

Anschließend wurde die Membran in 1 x Ponceau-Rot angefärbt zur Überprüfung der Transfereffizienz. Die Laufricht, die Taschen und die Markerbanden auf der Membran wurden mit Bleistift markiert. Die Membran wurde mit bidest. Wasser wieder entfärbt und zweimal für 10 Minuten in TBS gewaschen. Die Membran wurde über Nacht bei 7°C in 20 ml *blocking* Puffer gehalten. Nach zwei Waschschritten für je 10 Minuten in TBS/Tween 20/Triton X-100 und einem Waschschriff in TBS für 10 Minuten erfolgte die Antikörper-Antigenreaktion. Dafür wurde die Membran in 3 ml der Anti-Ku-Antikörperlösung (1:3000) in *blocking* Puffer für eine Stunde inkubiert. Anschließend wurde die Membran zweimal für je 10 Minuten in TBS/Tween 20/Triton X-100 und einmal in TBS gewaschen. Dann folgte eine Inkubation mit 3 ml einer 1:3000 Verdünnung der sekundären Anti-IgG-Antikörper für eine Stunde mit anschließendem Waschen, wie bereits vorher beschrieben. Zur Detektion

wurde das *ECL-Western blotting* Kit (Pierce) nach Angaben des Herstellers verwendet. Die Membran wurde für 1 Min. in der Detektionsmischung unter leichtem Schwenken inkubiert. Anschließend wurde die Membran in einer Röntgenkassette zusammen mit einem Fluorografiefilm (Hyperfilm ECL, Amersham) exponiert. Die Expositionszeit betrug 1 Min.-10 Min.

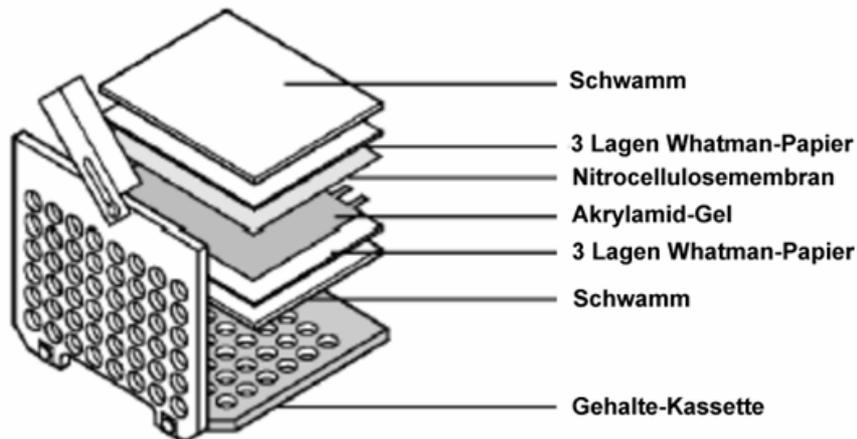


Abb. 2.5: Aufbau des Sandwich-Blots (Mini Trans-Blot[®] Manual BioRad).

2.3.10.5 Ermittlungen der Proteinbandenintensität mit Hilfe des Programms *EasyWin 32*

Nach dem Blotting der Proteine wurden die entwickelten Hyperfilme gescannt und als digitale TIF-Datei gespeichert. Die Quantifizierung erfolgte durch Vergleich der Intensitäten der einzelnen Proteinbanden auf dem Hyperfilm mit Hilfe des Computerprogramms *EasyWin 32*. Anhand der Negativkontrolle konnte die Änderung in den Ku-Proteinen durch die Testsubstanzen abgeschätzt werden (Abb. 2.6).

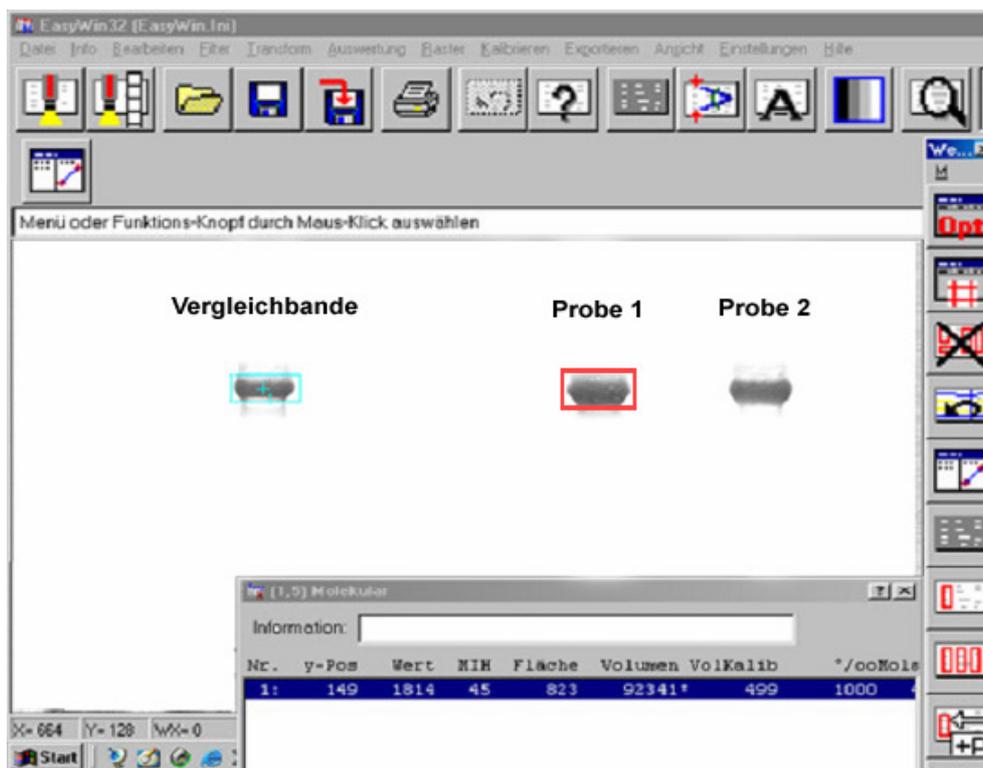


Abb. 2.6: Das Quantifizierungsprogramm *EasyWin 32*. Negativkontrolle (mit DMSO behandelt) in hellblau, zu bestimmende Bande in Spur daneben, rot umrahmt.

2.3.11 Pharmakologische Methoden

2.3.11.1 Bestimmung der Hemmung der humanen neutrophilen Elastase

Zur Bestimmung der Aktivitätshemmung humaner neutrophiler Elastase durch die Pflanze wurde das Substrat *N*-Methoxysuccinyl-L-Ala-L-Ala-L-Pro-L-Val-*p*-nitroanilid genutzt (Nakajima *et al.*, 1979), welches durch die Elastase gespalten wird. Durch die Spaltung wird das gelbe *p*-Nitroanilin freigesetzt, welches man bei 405 nm messen kann. Wenn die Testsubstanz die Aktivität der Elastase hemmen kann, wird weniger von dem gelben *p*-Nitroanilin freigesetzt.

Die Untersuchung erfolgte nach der Methode von Stein (1983), von den zu untersuchenden Substanzen wurden 10 mg/ml Stocklösungen in DMSO hergestellt und diese mit Tris/HCl Puffer (60 mM, pH 7,5) zur gewünschten Konzentration verdünnt. Das Substrat wurde auch in DMSO gelöst und mit Tris/HCl Puffer auf einer Endkonzentration von 10 mM verdünnt. 125 µl der Substratlösung (1,428 mM) wurden mit 455 µl der Testsubstanzlösung gemischt. Nach der Zugabe von 20 µl Enzymlösung (7,20 mU) wurde die Mischung für eine Stunde bei 37°C inkubiert. Zum Stoppen der Reaktion wurden 500 µl einer Sojabohnen-Trypsininhibitor-Lösung (0,2 mg/ml in 60 mM Tris/HCl Puffer, pH 7,5) zugegeben. Die Absorption des freigesetzten *p*-Nitroanilins wurde bei 405 nm photometrisch gemessen. Die Absorptionen für

das Substrat, Puffer, DMSO und Testsubstanz allein wurden auch gemessen (Leerwerte). Die Leerwerte sollten verhindern, dass Eigenabsorptionen der beteiligten Verbindungen das Ergebnis beeinflussen. Die erhaltenen Leerwerte wurden von den entsprechenden Absorptionen der Testlösungen abgezogen. Die Höhe der gemessenen Absorption ist proportional zu der Aktivität des Enzyms und umgekehrt proportional zu der Hemmung. Die Lösung des 100%-Wertes setzte sich aus dem Enzym, dem Substrat, DMSO und Puffer zusammen. Hiermit wurde die ungehemmte Aktivität des Enzyms bestimmt. Die ermittelten Absorptionen der gemessenen Substanzen wurden prozentual auf diesen Wert bezogen. Alle Versuche wurden mindestens 3-mal durchgeführt. Die IC_{50} -Werte wurden aus Konzentrations-Wirkungskurven berechnet.

2.3.11.2 Spasmolysetest an Bronchialsegmenten der Schweine ¹

Für die Untersuchung wurden isolierte Schweinelungen verwendet, die von der Lehr- und Versuchsanstalt für Tierzucht und Tierhaltung, Teltow Ruhlsdorf, Deutschland, bezogen wurden. Die Lungen wurden in eisgekühlter, mit O_2/CO_2 (95:5) gesättigter Krebs-Henseleit-solution (KHS) transportiert.

Präparation und Anschluss der Testorgane an die Messgeräte:

Aus den Schweinelungen wurden Bronchialsegmente heraus präpariert, in KHS Medium überführt und von dem umgebenden Fett- und Bindegewebe befreit. Die Bronchialsegmente wurden in kleine Ringe (3-5 mm lang und 3-5 mm breit) geschnitten, auf zwei horizontal L-förmigen Edelstahlhäkchen ($\varnothing = 300 \mu m$) aufgehängt und bei $37^\circ C$ in kontinuierlich mit O_2/CO_2 (95:5) gesättigtes KHS-Medium in 20 ml Organbäder eingebracht.

Für die Registrierung isometrischer Längenänderungen wurden präparierten Ringe mit einem isotonisch arbeitenden Transducer (Typ TF6V5iso, Fleck, Mainz) mit einer Vorlast von 20 mN verbunden (Ruhespannung). Die Aufzeichnung der Kontraktionen erfolgte mit Hilfe eines Verstärkers (Transducer Coupler 4711, TSE, Bad Homburg), der mit einem 4-Kanal-x/t-Schreiber (Kompensograph C 1016, Siemens) verbunden war.

Durchführung der Untersuchung:

Nach einer 60-minütigen Stabilisierungsphase mit einem Mediumwechsel nach 30 Minuten, folgte eine Äquilibrationsphase von 105 Minuten. Während der Äquilibration wurden die Ringe Zweimal je 20 Min. entweder mit $3 \mu M$ Carbachol oder mit $100 \mu M$ Histamin stimuliert. Nach der Beendigung jeder Stimulierung wurden die Organe mit Nährlösung für

¹ Für die Testung des Öls danke ich Herrn Görnemann und Herrn Professor Dr. Pertz (Institut für Pharmazie, FU-Berlin).

20 Min. gespült, um Carbachol bzw. Histamin zu entfernen, somit konnten die Organe bis zum Baseline-Niveau wieder relaxieren. Die Spannung wurde auf 20 mN justiert. Nachfolgend wurden jeweils kumulative Konzentrations-Wirkungskurven für Carbachol oder Histamin in Abwesenheit bzw. Gegenwart des entsprechenden Antagonisten aufgezeichnet: 0,1 μM Atropin (Antagonist der M3-Muskarinrezeptoren), 1 μM Mepyramin (Antagonist der H1-Histaminrezeptoren) oder 50-100 $\mu\text{g/ml}$ ätherisches Öl von *L. dulcis*.

Die Zugabe des Antagonisten im Organbad erfolgte nach der Äquilibrierungsphase und die Bronchialringe wurden damit für 60 Minuten inkubiert, bis der Antagonist mit den Rezeptoren ins Gleichgewicht kommt. Alle Bestimmungen erfolgten in Gegenwart von Indomethacin (5 μM), um die Produktion vaskulärer Eikosanoiden durch Cyclooxygenasen zu hemmen. Zur Blockierung der M3-Muskarinrezeptoren wurde Atropin (1 μM) zusätzlich in den Versuchen mit Histamin zugegeben.

Ein Kontrollexperiment wurde nur mit dem Lösemittel (DMSO) gemacht um festzustellen, ob DMSO einen Einfluss auf die Carbachol- bzw. Histamin-induzierten Kontraktionen hat.

2.3.11.3 Untersuchung der antispasmodischen Aktivität des Öls an der Rattentrachea ²

Die antispasmodische Aktivität des ätherischen Öls vom *L. dulcis* am oberen Atemweg wurde an Hand von isolierter Rattentrachea untersucht.

Präparation der Rattentrachea

Gesunde Ratten beiderlei Geschlechts wurden durch eine Ethernarkose getötet. Anschließend wurde ihnen die Trachea entnommen, vorsichtig gespült, ggf. von Kehlkopf und anhängendem Gewebe befreit.

Segmente aus drei aneinanderhängenden Knorpelringen wurden mit Hilfe spezieller Organhaken horizontal in einem auf 37°C temperierten Organbad befestigt, welches 5 ml einer Carbogen begasten Krebs-Henseleit-Lösung enthält. Dieses Segment wurde dann über zwei Organhaken gestülpt, wobei der Musculus trachealis weder mit dem beweglichen, noch dem fest installierten Organhaken in Berührung kam (siehe Abb. 2.7).

Der bewegliche Organhaken ist mit einem isotonisch arbeitenden Kraftaufnehmer verbunden. Die Ausschläge werden nach Verstärkung des Signals durch einen Transducer einem angeschlossenen Schreiber aufgezeichnet. Zu Versuchsbeginn wird die Trachea einer Vorspannung von 0,5 g ausgesetzt.

² Für die Testung der Öle danke ich die Arbeitsgruppe von Herrn Professor Dr. Eugen J. Verspohl (Münster).

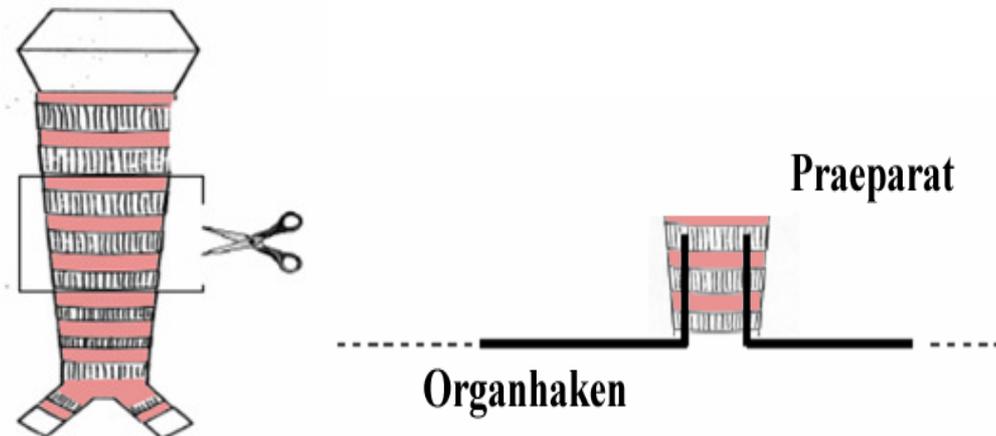


Abb. 2.7: Präparation der Rattentrachea. Links: Segment aus drei aneinanderhängenden Knorpelringen. Rechts: Schematische Darstellung der Präparataufhängung.

Durchführung der Untersuchung

Die Untersuchungen an der isolierten Rattentrachea wurden in einem 5-ml-Organbad durchgeführt (Organbad Mayflower, Hugo Sachs Elektronik, March). Es ist speziell für die Kontraktions- bzw. Relaxationsmessung kleiner Organpräparationen wie z.B. der Rattentrachea oder kleiner Blutgefäße konzipiert.

Nach einer 60-minütigen Äquilibrationsphase mit verschiedenen Spasmogenen wurden die drei Trachealringe im Organbad horizontal mit einer Vorspannung von 1 g aufgehängt (37°C Badtemperatur).

Es wurden Konzentrations-Wirkungskurven für das Spasmogen BaCl_2 in Abwesenheit bzw. Gegenwart der zu untersuchenden Substanz (das ätherische Öl) aufgenommen. BaCl_2 wurde in den drei verschiedenen Konzentrationen (5, 10 und 15 mM) eingesetzt, die jeweils drei Minuten auf die Trachea einwirken konnten, bevor kumulativ die nächsthöhere Konzentration zugesetzt wird. Die Konzentration von 10 mM BaCl_2 wurde auch von Peiper und Zobel (1987) zur Muskelkontraktion einer isolierten Rattentrachea verwendet.

2.3.11.4 Untersuchung des Effekts des ätherischen Öls auf die mukoziliären Clearance

Die mukoziliäre Clearance des respiratorischen Epithels ist der wichtigste und auch effizienteste Reinigungsmechanismus in den luftleitenden Atemwegsabschnitten (Trachea, Bronchien, Bronchioli). Die luftleitenden Atemwege sind von einem respiratorischen Epithel ausgekleidet. Dieses ist gegen das Lumen von einer unterschiedlich viskösen Flüssigkeitsschicht bedeckt, welche aus einer niederviskösen Sol- und einer höherviskösen Gel-Phase besteht. Die Gel-Phase wird durch den metachronalen Zilienschlag rachenwärts bewegt und transportiert so Partikel aus der Lunge hinaus (Mukoziliärtransport).

Zur Messung der mukozilären Clearance wurde die *in vivo* Mikrodialysetechnik verwendet. Die Trachea wurde vorsichtig enthüllt und einen kleinen Schnitt wurde direkt jenseits des Kehlkopfes gemacht. Ein 80 μm *Microcapillary* Röhrchen (DEAKTA, 22851 Norderstedt, Deutschland) wurde mit dem Fluoreszenzfarbstoff Rhodamin 123 beladen (15 nl/g Körpergewicht) und 16 mm in die Trachea eingeführt. Das *Microcapillary* Röhrchen wurde zu einer Mikrospritze angeschlossen, damit der Farbstoff leicht gesetzt werden konnte, indem man 500 nl-Luft ins Röhrchen drückt. Die Spitze eines Mikrodialysegeräts wurde 4 mm durch den gleichen Schnitt in die Trachea eingelegt und gut in ihrer Position fixiert (siehe Abb. 2.8).

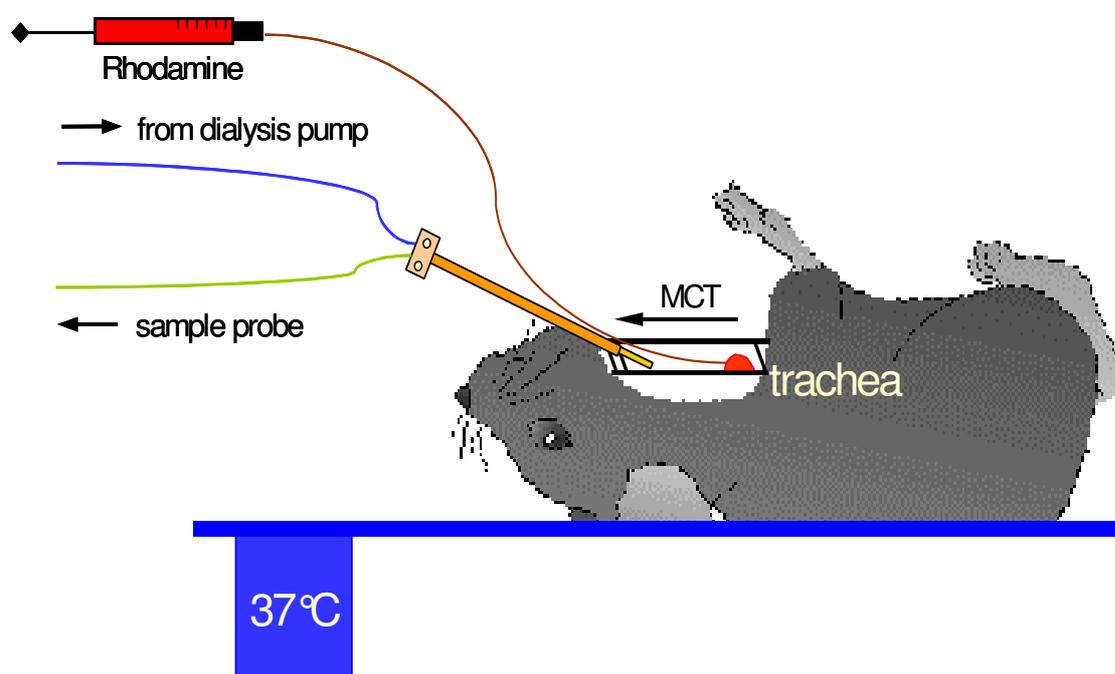


Abb. 2.8: Untersuchung der mukoziliären Transportgeschwindigkeit an Versuchsratten.

Der Tracheaschnitt soll so klein wie möglich sein um die Trocknung der Schleimhaut durch die Atmungsluft zu vermeiden. Die mukoziliäre Transportgeschwindigkeit kann anhand der Zeit berechnet werden, die der Rhodamintropfen braucht um die definierte 12 mm Strecke entlang der Trachea vom *Microcapillary* Röhrchen bis zur Spitze der Mikrodialyse zu passieren. Für die Untersuchung wurde eine CMA/102 Mikrodialyse-Pumpe (CMA Microdialysis, 17118 Solna, Schweden) mit einer konstanten Strömungsrate von 4 $\mu\text{l}/\text{Minute}$ verwendet. Nach Absetzung des Fluoreszenzfarbstoffs wurden Dialysate in Zeitabstand von 15 Sekunden in 96 Well Nunc Platten mit runden Böden (1 $\mu\text{l}/\text{Well}$) gesammelt. Nach 24 Minuten und nachdem alle 96 Proben gesammelt wurden, wurde die Nunc Platte sofort in einen FluoStar Galaxy Fluoreszenz Mikroplattenleser eingelegt (BMG Lab Tech, 07743 Jena, Deutschland), die Proben wurden bei einer Wellenlänge von 485 nm angeregt und die

Emission bei 520 nm gemessen. In allen Versuchen wurden die Testsubstanzen (ätherisches Öl) bzw. die Negativkontrolle (Saline) in drei Zeiten 24, 12 und 1 Std. vor Beginn des Experimentes der Ratte gegeben.

2.3.12 Mathematische Berechnungen und statistische Methoden

Die Daten sind als Mittelwert von n unabhängigen Experimenten dargestellt. Als Maß für die Streuung wurden die Standardabweichungen (SD , bei mindestens 3 unabhängigen Experimenten) oder die Spannweite (R , bei 2 unabhängigen Experimenten) verwendet. Die Prüfung auf Signifikanz der Unterschiede der Mittelwerte erfolgte mit dem Mann-Whitney-U-Test. Überschreitungswahrscheinlichkeiten P von $<0,05$ wurden als signifikant angesehen. Die experimentell gewonnenen Konzentrations-Wirkungs-Daten in Abschnitt 2.3.11.2 wurden mit Hilfe der Software (GraphPad Prism 4.0, GraphPad Software, San Diego, CA, USA) ausgewertet. Die Anpassung erfolgte entsprechend der *Hill*-Gleichung zwecks Ermittlung der Parameter E_{\max} , pEC_{50} . Der Vergleich der gewonnenen Ergebnisse erfolgte mit Hilfe des t -Tests nach *Student*. Ein Signifikanzniveau von $P<0,05$ wurde angenommen.

3. ERGEBNISSE

3.1 Ergebnisse der botanischen Studie

3.1.1 Die makroskopischen und histologischen Merkmale von *L. dulcis*

Die Blätter

Die Blätter sind bis ca. 8 cm lang und 5 cm breit, sie sind simpel, gegenständig, netznervig und oval mit grob gezähntem Blattrand. Beide Seiten der Blätter sind rau und stark behaart. Während die Blattoberseite dunkelgrün ist, ist die Unterseite hellgrün und mit besonders hervortretenden Mittel- und Seitennerven. Ein 1,5 bis 3,5 cm langer Stiel befestigt das Blatt am Pflanzenstängel.

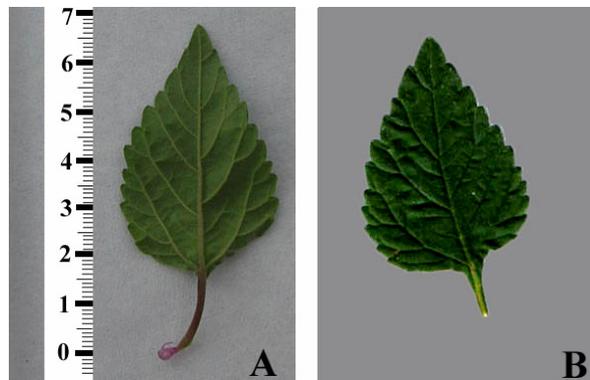


Abb. 3.1: Unter- (A) und Oberseite (B) eines Blattes.

Unter dem Mikroskop kann man mit einer Flächenansicht die netzförmige Nervatur, die welligen Epidermiszellen und die Stomata erkennen. Stomata sind als diacytischer Spaltöffnungstyp und auf der unteren Epidermis mehr als auf der oberen zu finden. Die Haare sind teilweise gebogen, pyramidenförmig, bestehen aus eins, zwei oder drei Zellen und mit mehreren Zellen an der Basis umgeben (Abb. 3.2 und 3.3).

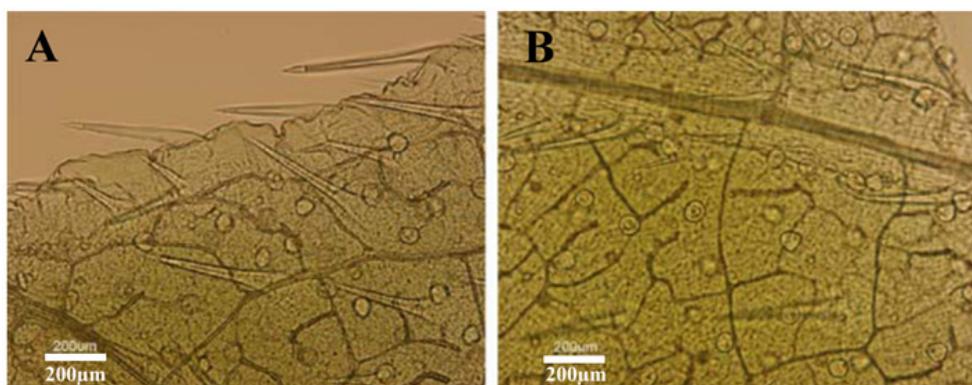


Abb. 3.2: Mikroskopische Flächenansicht der Blätter (A: Unterseite, B: Oberseite).

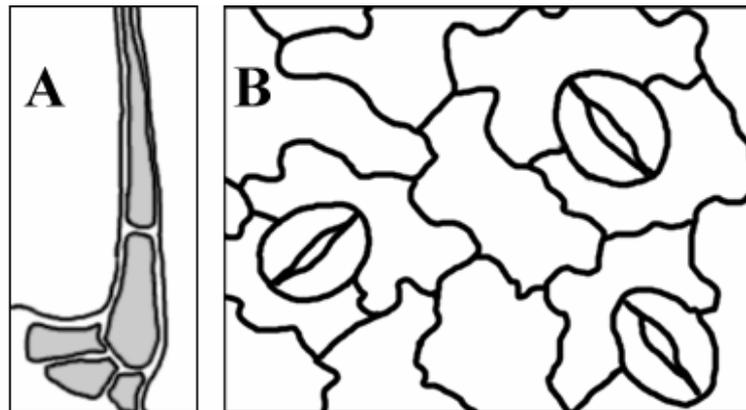


Abb. 3.3: A: Kegelhaar von Blättern. B: Diacytische Spaltöffnungen.

Die Drüschuppen sind sowohl auf der Blattoberseite als auch auf der Unterseite vorhanden (mehr auf der Unterseite) und mit einem gelblichen Sekret (ätherisches Öl) gefüllt (Abb. 3.4).

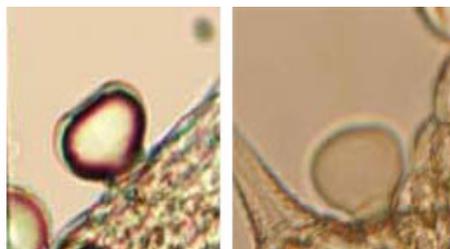


Abb. 3.4: Drüschuppen der Blätter.

Im Blattquerschnitt konnte ein bifaziales Laubblatt erkannt werden, welches aus Palisadenparenchym und darunter gelegenem Schwammparenchym besteht. Das Palisadenparenchym besteht aus zwei Lagen langgestreckter, senkrecht zur Blattoberfläche stehender, chloroplastenreicher Zellen. Das Schwammparenchym besteht aus unregelmäßig geformten Zellen.



Abb. 3.5: Querschnitt eines Blattes mit dem Leitbündel im Bereich der Mittelrippe (links) und der Blattspreite (rechts).

Die Blüten

Sie sind im Zeitraum von Mitte März bis Mitte Oktober zu sehen (Langtagspflanzen). Die Blüten gruppieren sich auf einer Achse und bilden gemeinsam die Blütenstände, die zapfenförmig und einzeln in den Blattachseln sind (Köpfchen ≤ 1 cm oder Kegel: 1,5-2,5 cm lang). Einzelblüten sind glockenförmig, klein (ca. 3 mm lang) und weiß am Anfang dann werden sie braungelb (während der Formation der Samen). Jede Einzelblüte sitzt auf einer grünen Brakteole. Die Blumenkrone besteht aus 4 weißen Kronblättern, die von unten integriert und von oben frei sind. Der Blütentyp ist unimetrisch. Der Blütenstiel ist hellgrün und ca. 1,5-3,2 cm lang (Abb. 3.6 und 3.7).



Abb. 3.6: Blütenstände von *L. dulcis*. A: Köpfchen und Kegel. B: Längsschnitt eines Blütenstands.

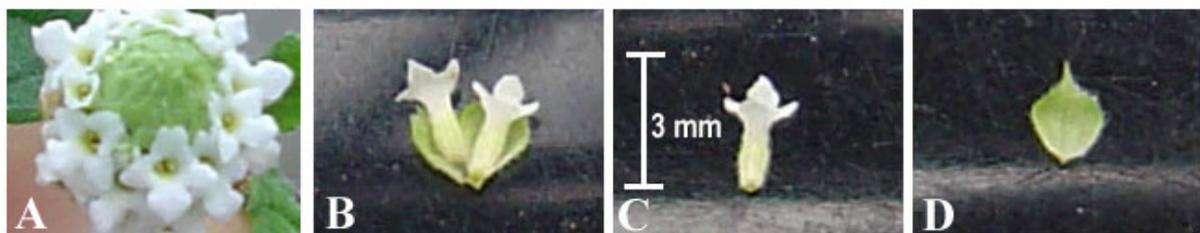


Abb. 3.7: Bau der Blütenstände. A: Übersicht eines Blütenstands, Kronblätter sind unimetrisch. B: Blüten mit ihren Tragblättern. C: eine Einzelblüte. D: eine Brakteole.

Unter dem Mikroskop sieht eine Einzelblüte mit einem zweifächerigen Fruchtknoten zwittrig aus. Eine Vielzahl von goldgelben und runden Pollen ist auch hier zusehen. Besonders auffallend sind viele Haare und reichliche Drüschuppen auf der Oberfläche der Kelch. Die Tragblätter sind auch stark behaart und bedeckt mit verschiedenen Arten von Drüschuppen und Drüsenhaaren, die ein- bzw. zweizellige Köpfchen haben und mit gelborangefarbigem Sekretinhalt gefüllt sind (Abb. 3.8).

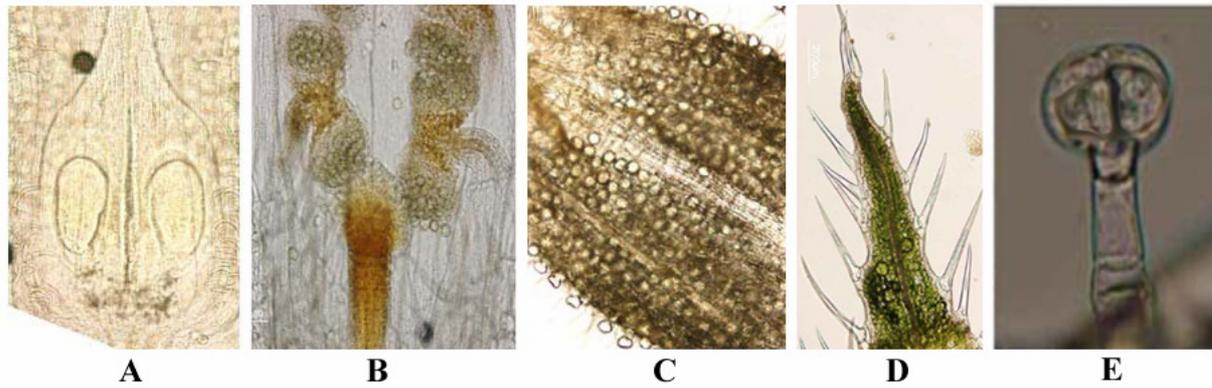


Abb. 3.8: Die mikroskopischen Merkmale der Blüten von *L. dulcis*. A: Ein 2-fächiger Fruchtknoten. B: Die Fortpflanzungsorgane der Blüte: die Stempel und Staubblätter. C: Der Kelch mit den Drüschuppen. D: Die Spitze eines Tragblattes. E: Ein Drüsenhaar auf der Oberfläche der Tragblätter mit zweizelligem Kopf.

Die Sprossachse

Die runde behaarte Sprossachse ist hellgrün oder rotgrün und kann hart sowie holzig werden. Sie ist lang mit ca. 4,5-8,5 cm langen Internodien (Abb. 3.9A). Der Spross wächst auf kriechende Weise und an den Stellen wo sie die Erde berührt, entstehen neue Wurzeln aus den Knoten. Aus diesen Knoten entsteht auch ein neuer Spross mit oder ohne zwei Blütenstände (Abb. 3.9B). Diese Eigenschaft wurde für die asexuelle Vermehrung der Pflanze benutzt. Manchmal entstehen die Wurzeln auch aus den Internodien.



Abb. 3.9: Morphologische Merkmale der Sprossachse. A: Die kriechenden Sprossen mit den Internodien und den Blütenständen. B: Entstehung neuer Wurzeln aus den Knoten.

In einem Querschnitt der Sprossachse (Abb. 3.10) sieht man unter dem Mikroskop die folgenden Strukturen:

- Die Epidermis mit Trichomen und Drüschuppen.
- Mehrere Parenchymschichten, einige davon besitzen eine dicke Zellwand, die man als Kollenchymzellen bezeichnet und die als Festigungsgewebe fungieren.

- Leitbündel besteht aus Phloem und Xylem. Rund um die Leitbündel befindet sich ein totes Festigungsgewebe (Sklerenchym), welches die Stabilität des Stängels unterstützt.
- Zentrales Mark besteht aus parenchymatischen Zellen.

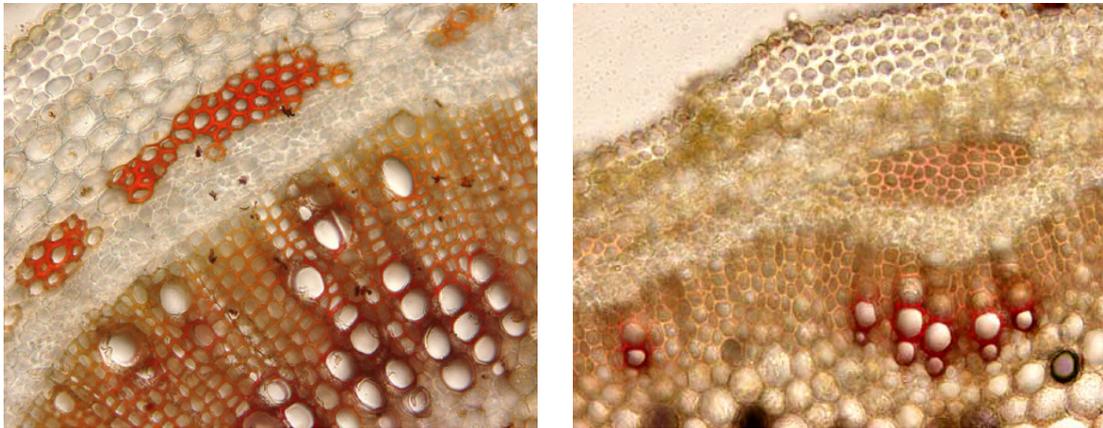


Abb. 3.10: Querschnitt eines verholzten Stängels (links) & eines jungen Stängels (rechts). Präparat wurde mit Phloroglucin/HCl gefärbt, verholzte Zellen sieht man in roter Farbe.

Die Wurzel

In einem Querschnitt der Wurzel (Abb. 3.11) sieht man unter dem Mikroskop das typische Bild einer jungen dikotylen Wurzel:

- In der Mitte befindet sich eine runde Struktur (Zentralleitbündel), die aus Xylem und Phloem besteht. Die Xylem-Zellen sind sternförmig in der Mitte des Leitbündels angeordnet, während die Phloem-Zellen dazwischen liegen.
- Die Endodermis ist die innerste Grenzschicht zwischen der Wurzelrinde und dem Zentralleitbündel. Die Endodermiszellen sind zusätzlich mit einem Streifen aus Holz und Suberin radial imprägniert (Caspar Streifen). Die Endodermis kontrolliert die Stoffaufnahme in die Pflanze.
- Die Wurzelrinde stellt den größten Teil der Wurzel dar und besteht aus parenchymatischen Zellen.
- Die äußerste Schicht der Wurzel heißt Epidermis, aus der die Wurzelhaare wachsen.

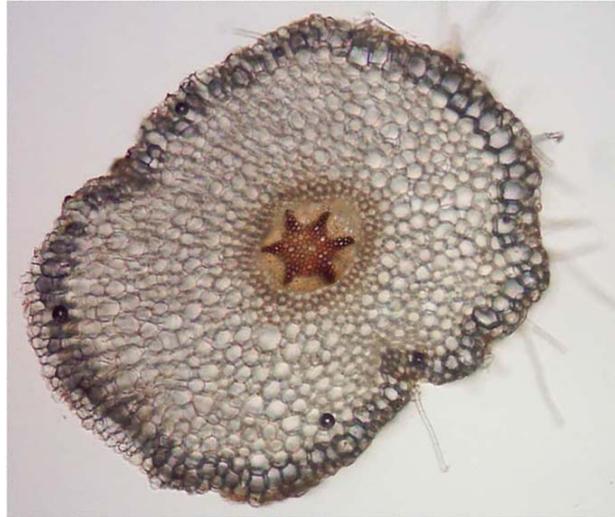


Abb. 3.11: Querschnitt der Wurzel von *L. dulcis*.



Abb. 3.12: Das Aussehen der Wurzel der *L. dulcis*.

Die Pflanzen aus Nicaragua und Panama haben auch die gleichen makroskopischen und mikroskopischen Merkmale.

Anhand der mikroskopischen Studie der Droge haben wir festgestellt, dass die meisten Drüschuppen, wo das ätherische Öl produziert wird, sich in den Blüten, den Blättern und viel weniger in den jungen (nicht verholzten) Stängeln befinden, während die verholzten

Stängel und die Wurzeln so gut wie keine Drüsenschuppen besitzen. Aus diesem Grund haben wir zur Gewinnung des ätherischen Öls nur Blüten, Blätter und grüne Stängel verwendet. Diese Vermutung ließ sich später durch sensorische (organoleptische) Untersuchungen einzelner Teile der Pflanze bestätigen (Tab. 3.1).

Teil der Pflanze	Süßer Geschmack
Blätter	++
Blüten	+++
Blütenstiel	+
junge Stängel (grün)	+
verholzte Stängel	-
Wurzeln	-

Tab. 3.1: Organoleptische Untersuchung der Pflanzenteile der *L. dulcis*.

3.2 Ergebnisse der phytochemischen Studie

3.2.1 Optimierung der Destillationsdauer zur Gewinnung des ätherischen Öls

Das ätherische Öl wurde aus der frischen Pflanze bzw. der Droge mittels Wasserdampfdestillation, wie in Abschnitt 2.3.2.1 beschrieben, extrahiert. Zur Optimierung der Destillationsdauer wurden 25 g getrockneter Blüten und Blätter (geerntet in Juni 2005) für 7 Stunden lang destilliert, jede Stunde wurde das Volumen des extrahierten Öls abgelesen. Abb. 3.13 zeigt die gewonnene Ölmenge mit der Destillationsdauer (repräsentative Ergebnisse).

Wie die Abbildung zeigt wird das meiste Öl innerhalb der ersten vier Stunden aus der Droge extrahiert, die nach vier Stunden gewonnene Ölmenge ist so klein, dass es sich nicht mehr lohnt den Prozess fortzusetzen. Anhand dieser Ergebnisse wurde die Destillation zur Gewinnung des ätherischen Öls für alle Analysen nur für vier Stunden durchgeführt. Das mittels Destillation gewonnene Öl ist gelb, aromatisch, sehr süß und hat eine Dichte von 0,933.

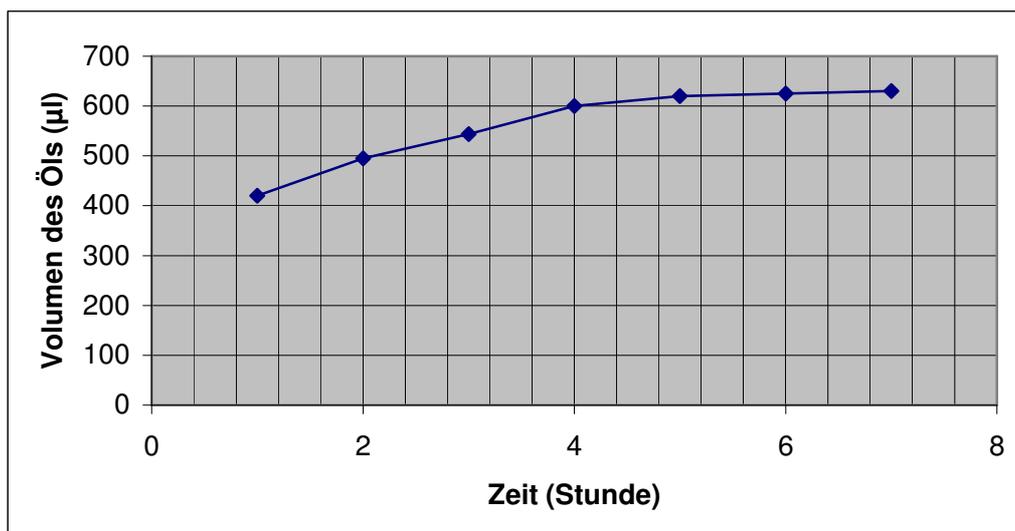


Abb. 3.13: Zunahme des extrahierten Ölvolumens mit der Destillationsdauer (repräsentatives Beispiel).

3.2.2 Der Wassergehalt von *L. dulcis*

Zur Bestimmung des Wassergehalts der verschiedenen Pflanzenteile sowie der ganzen Pflanze wurden Blätter, Blüten, Stängel, Wurzel oder die ganze Pflanze im Trockenschrank bei 30°C bis zum stabilen Gewicht getrocknet. Der Prozentsatz des Wassergehalts in jedem Pflanzenteil wurde berechnet und in Tab. 3.2 dargestellt.

Pflanzenteil	Blätter	Blüten	Stängel	Wurzel	Ganze Droge
Wassergehalt % (w/w)	77,9±2,6	75,3±2,5	75,8±1,5	60,1±1,2	76,1±2,4

Tab. 3.2: Wassergehalt von *L. dulcis* und seine Pflanzenteile. Mittelwert±SD, n=3.

3.2.3 Bestimmung des Gehalts des ätherischen Öls in der Pflanze

Der Gehalt des ätherischen Öls wurde sowohl für die ganze Pflanze als auch für ihre Einzelteile in frischer und trockener Form mittels Wasserdampfdestillation bestimmt. Nach dem Ernten wurde die Pflanze in einem Trockenschrank bei 25-30°C getrocknet oder direkt frisch einer 4-stündigen Destillation unterzogen. Tabellen 3.3 und 3.4 zeigen den Gehalt (Ausbeute) des Öls bezogen auf die Trockenmasse bzw. auf das Gewicht der Pflanzenteile (ml/100g).

Destillation der trockenen Teile			
Pflanzenteil	Jahreszeit	Quelle	Prozentsatz des Öls % (v/w)
Ganze Droge	Jan. 2005	Mexiko	0,8±0,05
Ganze Droge	Jun. 2005	Mexiko	1,5±0,1
Ganze Droge	Jun. 2007	Nicaragua	1,3±0,07
Ganze Droge	Jun. 2007	Panama	1,2±0,1
Ganze Droge	Okt. 2006	Panama	0,5±0,07
Blätter	Jul. 2005	Mexiko	1,8±0,05
Blüten	Jun. 2005	Mexiko	4,2±0,1
Blüten	Dest.: Mai 2006	Nicaragua	3,4± 0,7
Blätter und Blüten	Jun. 2005	Mexiko	2,3±0,1
Stängel	Jul. 2005	Mexiko	0,05±0,005

Tab. 3.3: Prozentsatz des Öls (v/w) in der trockenen Droge und den Pflanzenteilen. Mittelwert±SD, n=3.

Destillation der frischen Teile			
Pflanzenteil	Jahreszeit	Quelle	Prozentsatz des Öls % (v/w)
Blätter	Jul. 2005	Mexiko	0,5±0,1
Blüten	Jun. 2005	Mexiko	2,7±0,3
Blätter+Blüten	Jun. 2005	Mexiko	0,7±0,06
Stängel	Jul. 2005	Mexiko	0,02±0,0007

Tab. 3.4: Prozentsatz des Öls (v/w) in den verschiedenen Teilen der frischen Pflanze. Mittelwert±SD, n=3.

Aus den Ergebnissen dieser Studie kann man folgendes beobachten:

- I. Die Blüten enthalten ca. 4-5 fach mehr Öl als die Blätter. Dies lässt sich auch mit der GC gut nachweisen. Beispielsweise enthalten 100 g frische Blüten ca. 900 mg Campher und 320 mg Hernandulcin während die gleiche Menge frischer Blätter nur ca. 130 mg Campher und 50 mg Hernandulcin enthält (siehe Abschnitt 3.2.7).
- II. Die Pflanze enthält im Sommer (Juni und Juli) mehr ätherisches Öl als im Januar oder Oktober, da die Blüten nur zwischen März und Oktober existieren.

- III. In der gleichen Jahreszeit produziert die Pflanze aus Mexiko mehr ätherisches Öl als die aus Nicaragua oder Panama.

3.2.4 Ergebnisse der DC-Analyse verschiedener Extrakte aus *L. dulcis*

Verschiedene Extrakte aus *L. dulcis* wurden, wie in Abschnitt 2.3.2.2.2 beschrieben, vorbereitet und mittels Dünnschichtchromatographie in spezifischen Fließmittelsystemen untersucht. Die Detektion mit unterschiedlichen Sprühreagenzien (siehe 2.3.2.3) schlossen sich an, um einen Überblick über weitere nicht bereits in dieser Pflanze detektierte Inhaltsstoffe zu gewinnen.

- A. Zur Überprüfung auf **Alkaloide** wurde der hergestellte Extrakt A auf einer DC Platte aufgetragen, als Positivkontrollen wurden Alkaloidlösungen (1% Nicotin bzw. Papavirin in Ethanol) auf derselben DC-Platte getrennt. Die Platte wurde mit MP B entwickelt und mit Sprühreagenz II besprüht. Nach dem Besprühen färbten sich nur die Positivkontrollen orange-rot, was auf keine Alkaloidvorkommen in *L. dulcis* hindeutete.
- B. Zur Überprüfung auf **Saponine** wurden die Extrakte B und E einer DC unterzogen. Als Vergleichssubstanzen dienten Standard-Saponin und Aescin (0,1% in Methanol). Als Fließmittel wurden MP B oder F verwendet. Zur Visualisierung der Saponine wurde Reagenz I oder V eingesetzt. Es konnten keine Saponine in *L. dulcis* detektiert werden. Die Droge bildete auch keinen Schaum, was die DC-Analyse bestätigte.
- C. Zur Überprüfung auf **Cumarine** wurden Extrakte C und E auf einer DC-Platte mit MP C, oder D oder E entwickelt. Nach der Abdunstung der MP wurde die Platte unter UV-Licht (366 nm) betrachtet und mit dem Reagenz III oder IV besprüht. Eine intensiv blau fluoreszierende Bande wurde für die Vergleichssubstanz (0,1% Scopoletin in MeOH) aber nicht für die Extrakte aus *L. dulcis* beobachtet.
- D. Zur Überprüfung auf **Anthraglykoside** wurde Extrakt D auf einer DC-Platte mit MP B getrennt. Anschließend wurde die entwickelte Platte unter UV-Strahlung mit einer Wellenlänge von 366 nm beobachtet. Es wurde keine gelbe oder rote Fluoreszenz detektiert. Auch nach der Besprühung mit einer 10%igen ethanolschen Kalilauge (Bornträger-Reaktion) bildeten sich keine roten oder gelben Niederschläge auf der Platte also auch keine Anthraglykoside.

3.2.5 DC Untersuchung des ätherischen Öls und des ethanolischen Extrakts

Auf einer DC-Platte wurden das ätherische Öl und der ethanolische Extrakt, mit dem MP A als Fließmittel, hinsichtlich ihres Campher und Hernandulcin Gehalts getrennt. Nach Abdunsten des Lösemittels wurden die Platten unter UV-Licht und mit dem Reagenz V detektiert. Abb. 3.14 zeigt, dass Hernandulcin und Campher mittels Dünnschicht-Chromatographie auseinander getrennt werden können. Die Trennung zeigt auch eine dominante Bande, die langsamer als die Hernandulcin-Bande auf der DC-Platte wandert und wie bei Hernandulcin eine Fluoreszenzminderung verursacht. Diese Bande gehört dem Epihernandulcin, ein Epimer von Hernandulcin (Souto-Bachiller *et al.*, 1997).

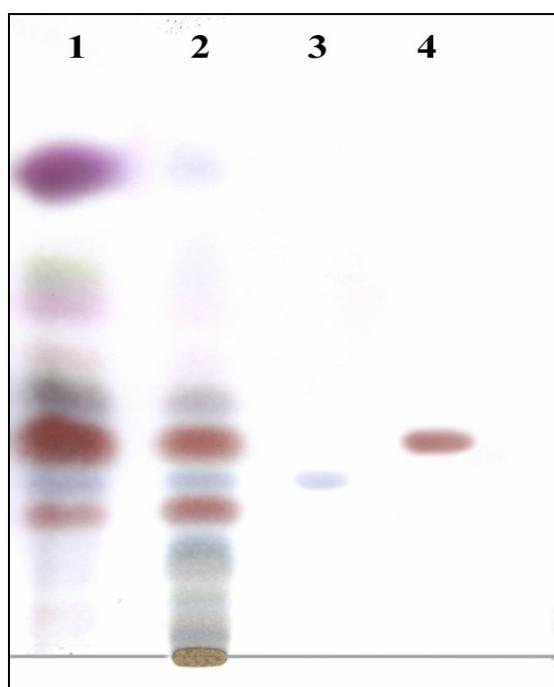


Abb. 3.14: DC-Analyse des ätherischen Öls und des ethanolischen Extrakts von *L. dulcis*. Spur 1: Öl (Mexiko) in Hexan (1:20), Spur 2: 100 mg/ml Et-Extrakt, Spur 3: 10 mg/ml Campher, Spur 4: 3 mg/ml Hernandulcin.

3.2.6 Isolierung des Hernandulcins mittels Säulenchromatographie (SC)

Der Süßstoff Hernandulcin wurde aus dem ätherischen Öl mittels Säulenchromatographie, wie in Abschnitt 2.3.2.4 beschrieben, isoliert.

Parallel zur SC-Isolierung wurde ein DC-Screening durchgeführt um die Hernandulcin-haltigen Fraktionen identifizieren zu können.

Zur Bestimmung der Reinheit des isolierten Hernandulcins wurde anschließend eine Gaschromatographie Analyse durchgeführt (siehe Verfahren 2.3.2.5). Eine Reinheit bis zu ca. 87% konnte erreicht werden (siehe Abb. 3.15). Die Verunreinigung besteht aus zwei

unbekannten Substanzen, die auch bei der Analyse des ätherischen Öls beobachtet werden konnten.

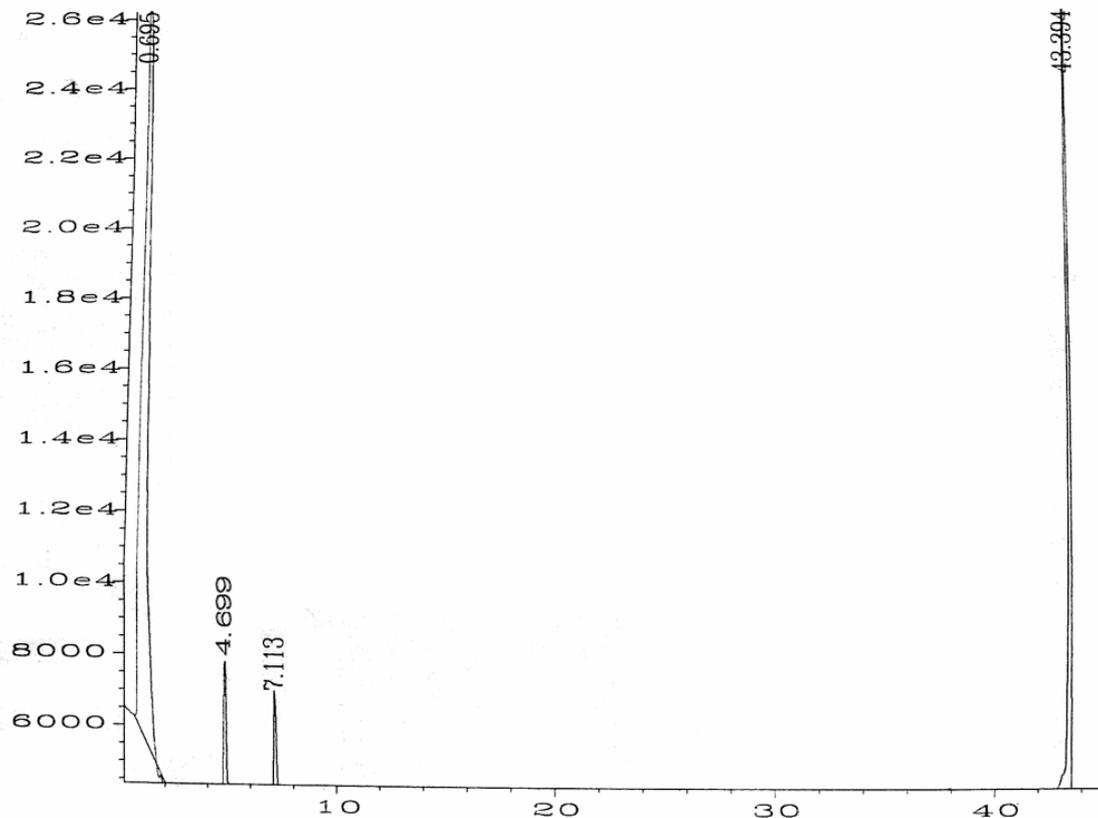


Abb. 3.15: GC-Analyse des isolierten Hernandulcins. Ein Leerlauf wurde zuerst nur mit absolutem Ethanol gemacht, anschließend wurde 1µl einer 10 mg/ml Hernandulcin-Lösung in Ethanol in die GC-Säule eingespritzt. Hernandulcin ist bei $R_t=43,3$ Min. zu sehen.

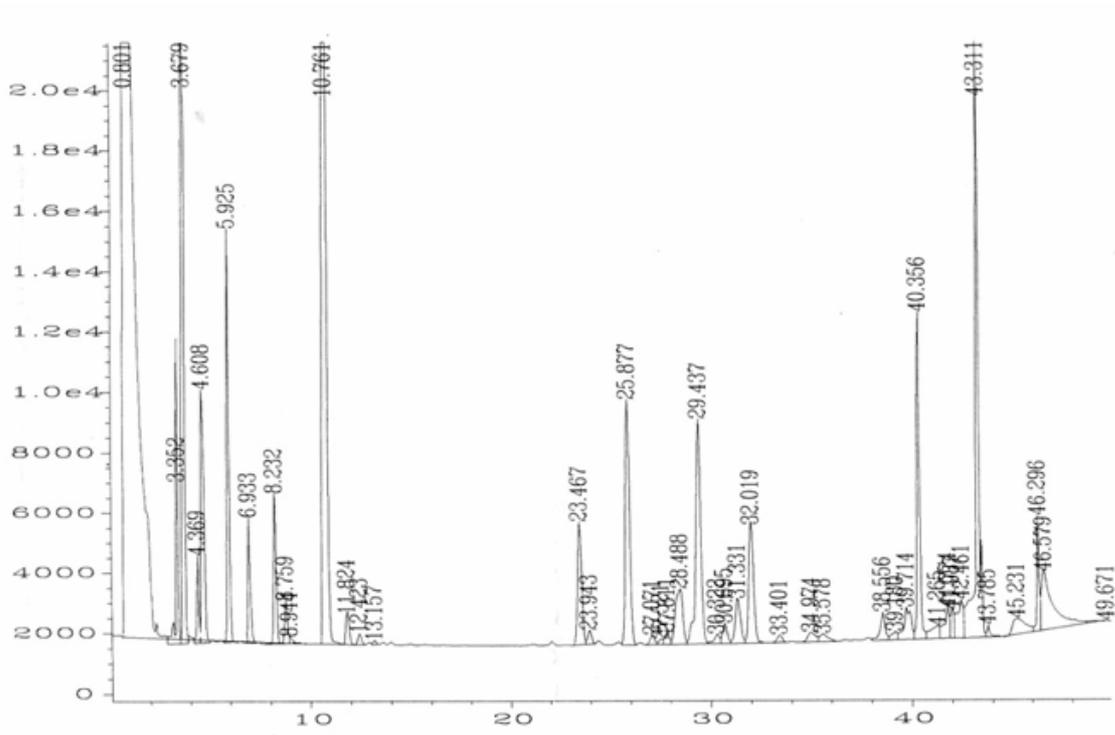
3.2.7 Bestimmung des Gehalts an Campher und Hernandulcin mittels Gaschromatographie

Nach Optimierung der Methode zur chromatographischen Trennung wurden die Retentionszeiten vom Lösemittel und die Referenzsubstanzen Campher und Hernandulcin als Einzelverbindung und im Gemisch bestimmt. Die Peaks der beiden Substanzen trennten sich vollständig voneinander ($R_{t \text{ Campher}}=10,7$ Min., $R_{t \text{ Hernandulcin}}=43,3$ Min.).

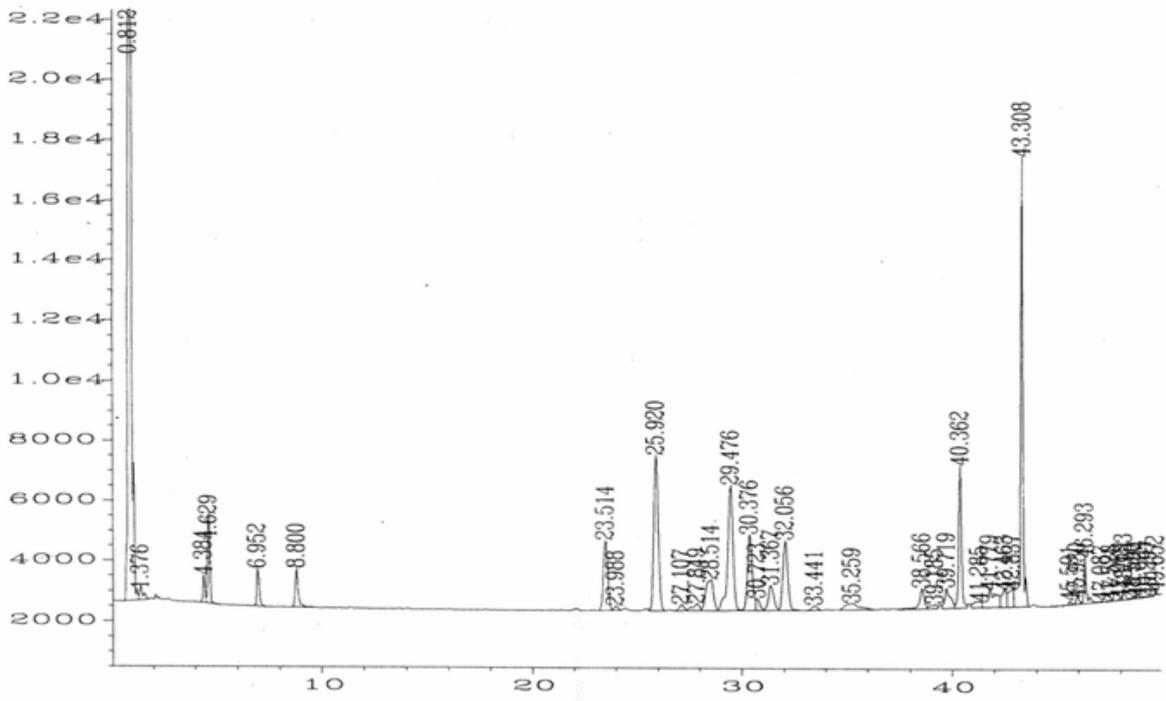
Der Gehalt an Campher und Hernandulcin wurde für ätherische Öle (aus Mexiko, Nicaragua und Panama) bestimmt. Die Ergebnisse sind in Tab. 3.5 zusammengefasst, Abb. 3.16 zeigt Beispielchromatogramme.

Droge oder Pflanzenteil	Campher %		Hernandulcin %	
	Im Öl % (w/v)	In Pflanzenteilen % (w/w)	Im Öl % (w/v)	In Pflanzenteilen % (w/w)
Ganze Droge Ernte Juni 2005, <i>n</i> =4	32,6±0,2	0,5±0,003	10,1±0,8	0,2±0,01
Frische Blüten Ernte Juni 2005, <i>n</i> =3	31,1±1,1	0,9±0,03	11,2±0,3	0,3±0,01
Trockne Blüten Ernte Juni 2005, <i>n</i> =3	33,8±1,2	2,5±0,09	12,7±0,6	0,9±0,04
Frische Blätter Ernte Juli 2005, <i>n</i> =3	32,8±0,01	0,1±0,00004	12,5±0,1	0,05±0,0006
Trockne Blätter Ernte Juli 2005, <i>n</i> =3	34,1±0,6	0,6±0,01	11,4±0,5	0,2±0,01
Frische Stängel Ernte Juni 2005, <i>n</i> =3	31,2±0,9	0,006±0,0002	13,6±0,7	0,003±0,0002
Droge aus Panama Ernte Okt. 2006, <i>n</i> =3	-----	-----	13,8±1,9	0,07±0,009
Droge aus Panama Del.=1:10, <i>n</i> =3	0,01±0,009	0,07×10 ⁻³ ±0,001×10 ⁻³	14,5±2,2	0,07±0,01
Blüten aus Nicaragua <i>n</i> =2	-----	-----	27,5±4,5	1,2±0,2
Blüten aus Nicaragua Del.=1:2, <i>n</i> =2	0,09±0,02	0,003±0,001	30,6±1,3	1,1±0,1

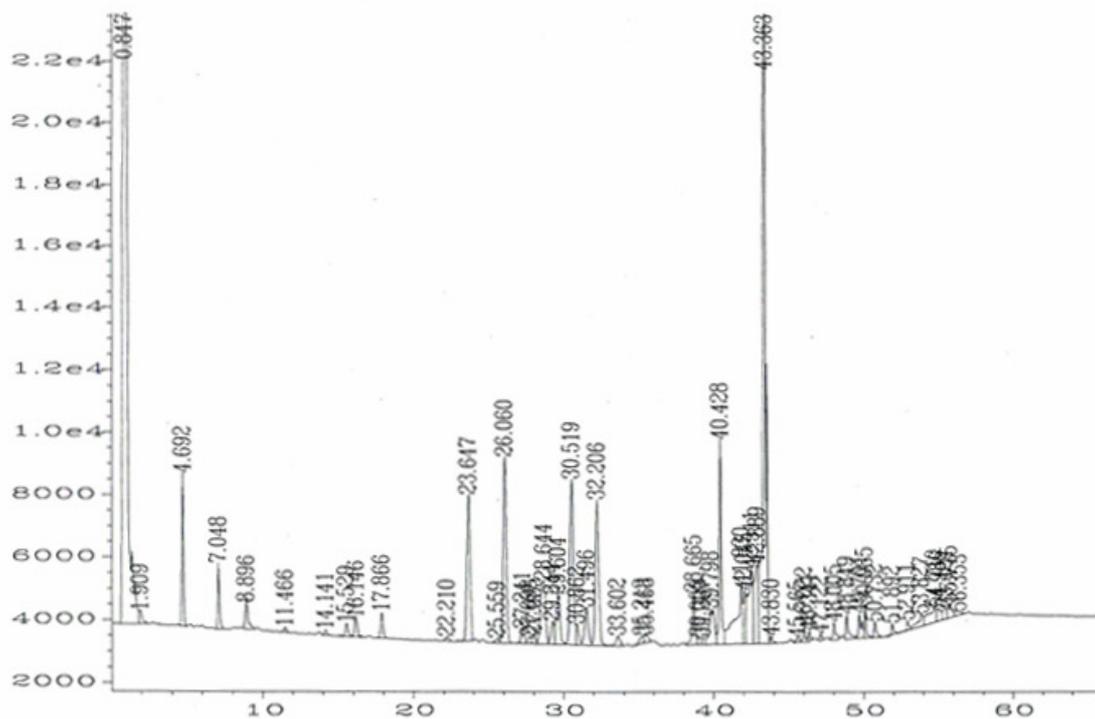
Tab. 3.5: GC-Bestimmung des Gehalts an Campher und Hernandulcin in den ätherischen Ölen von *L. dulcis*. Mittelwert ±Streuung (*R* bei *n*=2 oder *SD* bei *n*≥3). Del.: Verdünnung des Öls in Hexan 1:100 falls nicht anders erwähnt.



A



B



C

Abb. 3.16: Gaschromatogramme von *Lippia dulcis* aus Mexiko (A), Panama (B) und aus Nicaragua (C). Peaks von Campher und Hernandulcin sind bei $R_t=10,7$ Min. und $43,3$ Min. zu sehen.

3.2.8 Bestimmung des Gehalts an Campher und Hernandulcin mittels HPLC

Die ätherischen Öle wurden mit Hilfe der analytischen HPLC analysiert und der Gehalt an Campher und Hernandulcin wurde für die untersuchten Öle bestimmt (Beschreibung in 2.3.2.6). Für die Quantifizierung wird die Peakfläche der interessanten Substanz bei geeigneter Wellenlänge aus dem Chromatogramm herangezogen, da diese der Konzentration direkt proportional ist. In der vorliegenden Arbeit wurde die Kalibriermethode mit externem Standard benutzt. Es wurden jeweils 5 verschiedene Konzentrationen des Campher- bzw. des Hernandulcin -Standards durchgeführt. Die Kalibrierlösungen wurden im Konzentrationsbereich 2-40 mg/ml für Campher und 1-15 mg/ml für Hernandulcin in MeCN hergestellt. 15 μ l der jeweiligen Lösung wurden in die HPLC-Anlage eingespritzt. Die Kalibrierung erfolgte anhand der Peakflächen. Hierbei wird die Peakfläche gegen die entsprechende Konzentration aufgetragen. So entstand eine Gerade (siehe Abb. 3.17), anhand ihrer Gleichung konnte man bei bekannter Peakfläche die Konzentration errechnen.

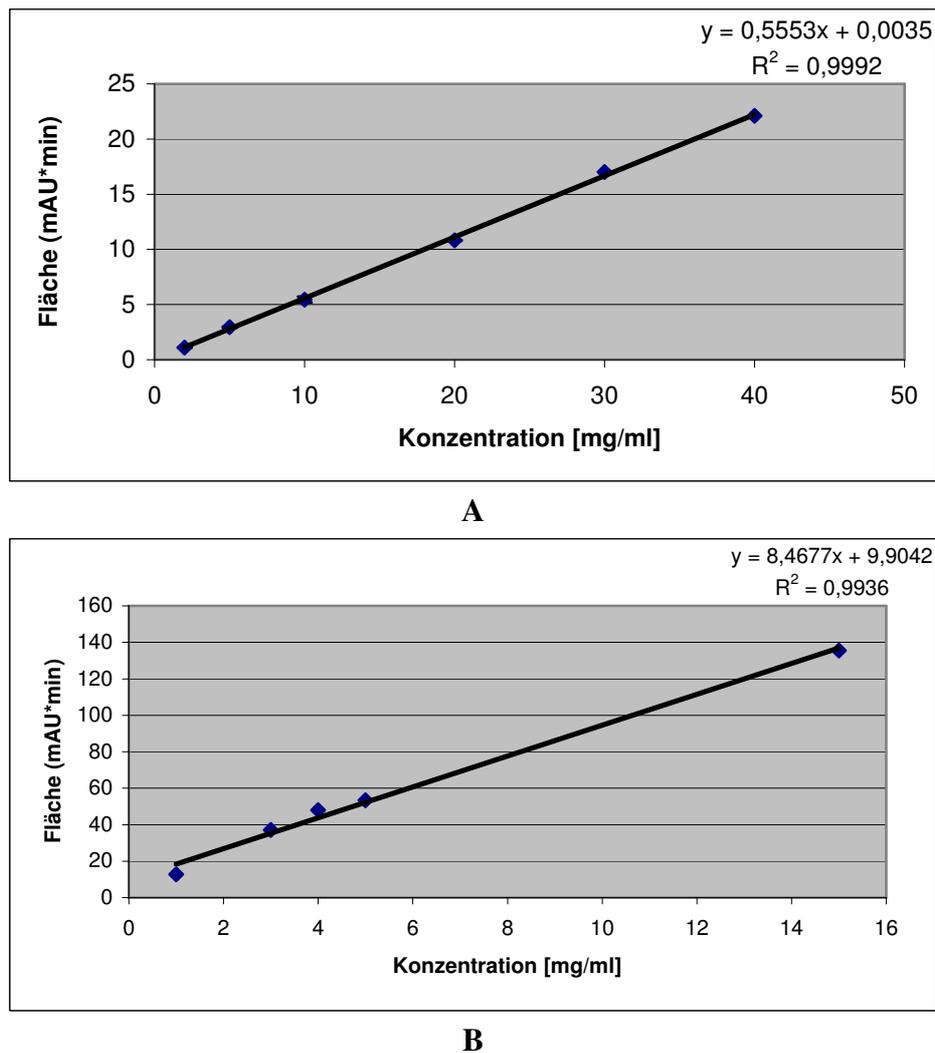


Abb. 3.17: HPLC-Kalibriergeraden von Campher (A) und Hernandulcin (B). Mittelwert \pm SD, $n=3-5$.

Zur Analyse des mexikanischen Öls wurden 15 μ l einer 30 μ l/ml Öllösung in MeCN in der HPLC-Anlage eingespritzt. Nach den Ergebnissen der HPLC-Studie enthielt das mexikanische Öl $47,6\pm 2,7$ mg/100 μ l Campher und $12,1\pm 0,9$ mg/100 μ l Hernandulcin ($n=6$). Während die GC-Studie für das gleiche Öl einen Gehalt von $32,6\pm 0,2$ mg/100 μ l Campher und $10,1\pm 0,8$ mg/100 μ l Hernandulcin ergab ($n=4$) (siehe Tab. 3.5). Der Vergleich der Ergebnisse der GC- und HPLC-Messungen zeigte, dass mit Hilfe der HPLC ein signifikant ($p<0,01$) größerer Gehalt an Campher und ein signifikant ($p<0,05$) größerer Gehalt an Hernandulcin im mexikanischen Öl bestimmt werden konnten.

Das Öl aus Nicaragua wurde unter den gleichen Bedingungen wie beim Mexikanischen Öl analysiert. Die HPLC-Analyse zeigte $14,2\pm 0,05$ mg/100 μ l Campher und $46,4\pm 1,7$ mg/100 μ l Hernandulcin ($n=4$). Interessanterweise zeigte die GC-Analyse so gut wie kein Campher in dem Öl aus Nicaragua ($0,09\pm 0,02$ mg/100 μ l, $n=2$). Hernandulcin-Gehalt nach Ergebnissen

der GC-Studie betrug $29,1 \pm 3,3$ mg/100 μ l Öl $n=4$. Beispielchromatogramme sind in Abb. 3.18 gezeigt.

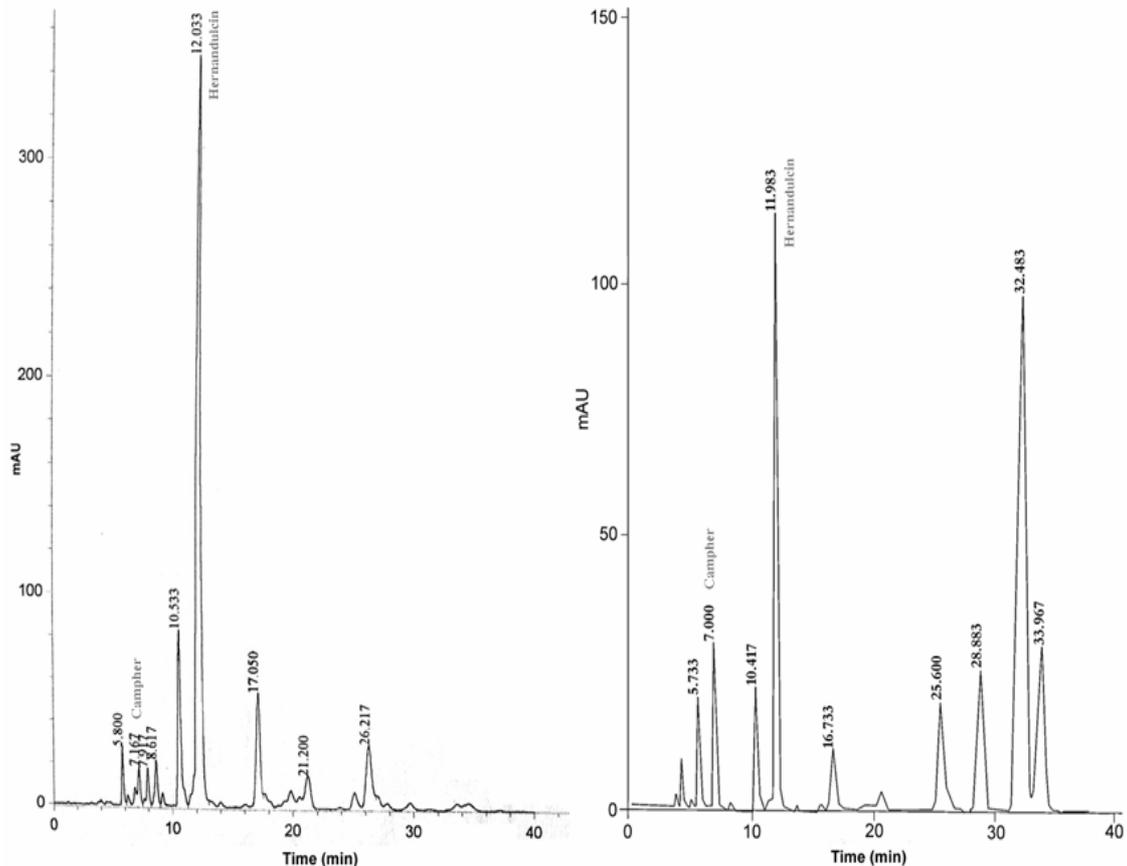


Abb. 3.18: HPLC-Chromatogramme von *L. dulcis* aus Nicaragua (links) und aus Mexiko (rechts).

3.3 Bestimmung des Süßungsgrads von Hernandulcin

Der Test wurde, wie in Abschnitt 2.3.3 beschrieben, durchgeführt. Aus einer ethanolischen Stammlösung von Hernandulcin (1 mg/300 μ l) wurde eine Reihe von Verdünnungen (1:50-1:300) gemacht. Die Verdünnung 235x war genauso leicht süß wie eine 7 mg/ml Saccharoselösung. Das heißt 14 μ g/ml Hernandulcin entsprechen 7000 μ g/ml Saccharose, in anderen Worten Hernandulcin ist in unserer Untersuchung ca. 500-mal süßer als Saccharose.

3.4 Bestimmung der Zytotoxizität mittels MTT-Assay

Der MTT-Assay zur Bestimmung der Zytotoxizität der Testsubstanzen wurde an HepG2-Zellen entsprechend dem Abschnitt 2.3.5 durchgeführt. Zunächst wurde die optimale Zelldichte für die Versuche bestimmt, um im linearen Bereich zu arbeiten. Eine optimierte Zellzahl pro Well ist eine Voraussetzung für reproduzierbare Messergebnisse. Die Zellen wurden in Verschiedenen Zelldichten ausgesät und nach einer 72-stündigen Inkubation mit MEM-Medium, wurde der MTT-Test durchgeführt. Es wurde die Zellzahl 7000/Well

gewählt, somit konnte vorausgesetzt werden, dass sich eine Zu- oder Abnahme der Zellproliferation über einen mehrtägigen Versuch sicher bestimmen lässt.

Um eine Reduktion des MTT durch die Testsubstanzen auszuschließen, wurde in Blindversuchen der Einfluss der Substanzen auf die Bestimmungsmethode untersucht. Es ergaben sich keine Hinweise auf eine entsprechende Störung der Methode.

Um die zytotoxischen bzw. proliferationshemmenden Effekte des verwendeten Lösemittels (DMSO) von denen der Testsubstanzen abgrenzen zu können, wurde der Einfluss von DMSO allein auf die Zellvitalität getestet (siehe Tab. 3.6).

DMSO Konz. % (v/v)	0	0,125	0,25	0,5	1,0	1,5
Zellproliferation %	100±5,1	98,5±3,1	97,9±2,9	94,1±3,7	84,4±5,2	63,5±3,7

Tab. 3.6: Einfluss von DMSO auf die HepG2-Zellproliferation. Inkubationszeit: 72 Std.. Mittelwert±SD, n=8.

Wie in der Tabelle deutlich zu erkennen hat DMSO im Konzentrationsbereich von 0,125% bis 0,5% keinen signifikanten Effekt ($p > 0,05$) auf der Vitalität der Zellen. Eine DMSO Konzentration von 1% in der Zellkultur führte bereits zu tendenziell toxischen Effekten (ca. 16% Hemmung der Vitalität). Anhand dieser Ergebnisse wurden die Testsubstanzen für den MTT-Test in DMSO (<0,5%) aufgenommen.

Um die Zytotoxizität der Testsubstanzen auf die HepG2-Zellen zu bestimmen wurden 25- 250 µg/ml des Camphers, des ethanolischen Extrakts und des ätherischen Öls (aus Mexiko) und 12,5-250 µg/ml des ätherischen Öls aus Panama eingesetzt. Vom Hernandulcin wurden Konzentrationen von 5-250 µg/ml verwendet. Als negative Kontrolle wurde die Absorption für DMSO-behandelte Zellen vermessen (16 wells), der Mittelwert davon berechnet und als 100% festgelegt. Die Proliferationshemmung wurde nach folgender Gleichung berechnet und in Abb. 3.19 dargestellt:

$$\% \text{ Proliferationshemmung} = 100 - (\text{Mittelwert OD}_{\text{Testsubstanz}} \times 100 / \text{Mittelwert OD}_{\text{Kontrolle}})$$

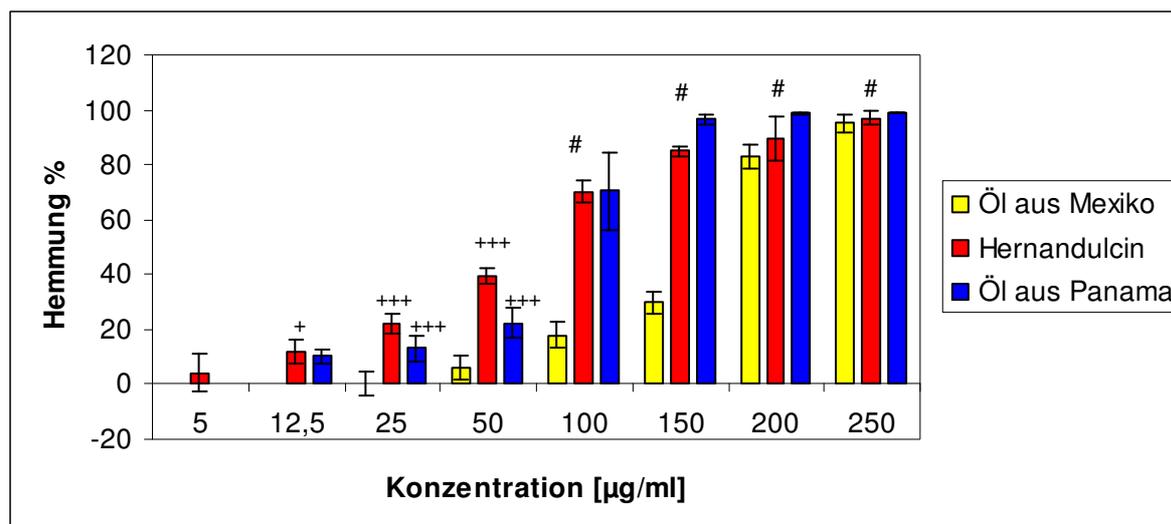


Abb. 3.19: Proliferationshemmung der HepG2-Zellen durch steigende Konzentrationen der Testsubstanz. Zellen wurden mit verschiedenen Konzentrationen der Testsubstanz inkubiert, anschließend wurde die Zellvitalität mittels MTT-Test bestimmt. Signifikante antiproliferative Wirkung ($P < 0,05$) wurde durch + gekennzeichnet. Signifikant erniedrigte Zellvitalität ($P < 0,001$) wurde mit +++ markiert. Rautezeichen steht für signifikante Werte ($P < 0,001$) bei allen drei Testsubstanzen im Vergleich zur DMSO-Kontrolle. Mittelwert \pm SD, $n \geq 8$.

Die ätherischen Öle und Hernandulcin zeigten eine konzentrationsabhängige Zytotoxizität auf die HepG2-Zellen. Die IC_{50} -Werte wurden durch lineare Regression aus der Konzentrations-Wirkungskurve ermittelt.

Die IC_{50} für das mexikanische Öl ist $168,8 \pm 3,1$ µg/ml, für das panamaische Öl $79,8 \pm 8,7$ µg/ml und $67,2 \pm 4$ µg/ml für Hernandulcin.

Der ethanolische Extrakt zeigte keine Hemmung auf HepG2-Zellen, bei der höchsten Konzentration (250 µg/ml) war die Hemmung $6,7 \pm 3,7\%$ ($n=5$).

Campher beeinflusste auch die Zellvitalität kaum, bei 250 µg/ml war die Hemmung nur $3,7 \pm 4,6\%$ ($n=13$).

3.5 Morphologische Untersuchung der behandelten HepG2-Zellen mittels Hämatoxylin Färbung

Hämatoxylin ist ein basischer Farbstoff, der „saure“ Zellstrukturen wie die Nukleinsäuren des Kerns blau färbt, d.h. Hämatoxylin gefärbte Zellkerne sehen unter dem Mikroskop blau aus (Chromatinblau). In dieser Arbeit wurden HepG2-Zellen, wie in Abschnitt 2.3.6 beschrieben, kultiviert und mit der zu untersuchenden Substanz für 72 Std. inkubiert. Anschließend wurden die Zellen fixiert und mit Hämatoxylin gefärbt. Die Abb. 3.20 stellt die Morphologie einer intakten HepG2-Zelllinie und die morphologischen Veränderungen der HepG2-Zellen nach 72-stündiger Inkubationszeit mit den verschiedenen Testsubstanzen dar.

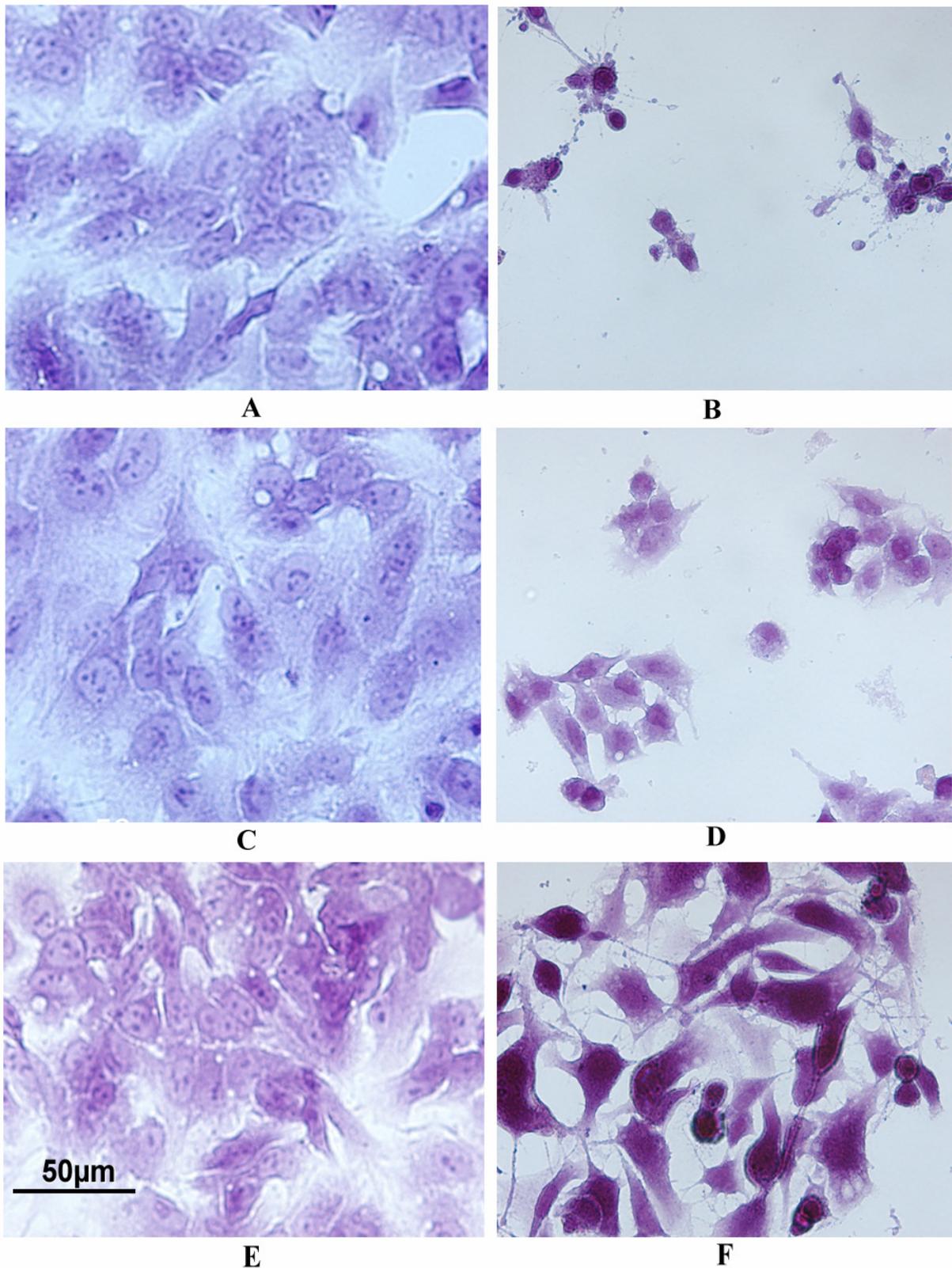


Abb. 3.20: Lichtmikroskopische Bilder Hämatoxylin-gefärbter HepG2-Zellen. Die Zellen wurden mit den zu untersuchenden Substanzen für 72 Std. inkubiert und anschließend mit Hämatoxylin gefärbt. A: 0,45% DMSO, B: 500 nM Staurosporin, C: 250 µg/ml Campher, D: 67 µg/ml Hernandulcin, E: 250 µg/ml ethanolischer Extrakt, F: 168 µg/ml Öl aus Mexiko.

Wie aus Abb. 3.20 deutlich zu erkennen, führte die Behandlung der HepG2-Zellen mit dem Öl bzw. Hernandulcin zu Reduzierung der Zellzahl, Zerstörung der Zell-Monolayer und Kondensierung des Chromatins. Dagegen zeigten die mit Campher bzw. ethanolischem Extrakt behandelten Zellen konfluente Monolayer.

3.6 *In vitro* Nachweis der Apoptose mittels DNA-Fragmentation (Ladder-Assay)

Ein wichtiges biochemisches Merkmal der Apoptose ist die Spaltung des Chromatins in kleine DNA-Fragmente (ihre Größe ist mehrfach von ca. 180 bp), die man auf einem Agarosegel als DNA-Leiter erkennen kann. Zuerst wird das Chromatin in *high molecular weight* (HMW) DNA-Fragmente gespalten, die anschließend durch Aktivierung mehrerer DNA-Fragmentationsfaktoren, u.a. *Caspase-activated*-DNase und $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$ abhängige Endonuklease in kleinere DNA-Fragmente abgebaut werden (Liu *et al.*, 1997; Arends *et al.*, 1990).

In dieser Arbeit wurden die zu untersuchenden Substanzen mit HepG2-Zellen, wie in Abschnitt 2.3.7.1 beschrieben, für 4, 16, 24, 48 oder 72 Std. inkubiert. Als Positivkontrolle wurde Staurosporin 500 nM verwendet, DMSO diente als Negativkontrolle. Die DNA wurde anschließend aus den behandelten Zellen isoliert (Verfahren 2.3.7.2) und auf einem 1,5%igen Agarosegel analysiert (Abb. 3.21).

Für HepG2-Zellen, die mit 250 µg/ml Campher oder ethanolischem Extrakt für 48 und 72 Std. inkubiert wurden, wurde keine DNA-Fragmentierung beobachtet.

Die Behandlung der Zellen mit 168 bzw. 250 µg/ml Öl aus Mexiko für 4-72 Std. führte zu einer DNA-Fragmentierung in einer konzentrations-/zeitabhängigen Weise. Während 50 µg/ml des mexikanischen Öls keine Wirkung auf die Zell-DNA nach 4-16 Stunden zeigten.

Inkubation der Zellen mit 79 bzw. 150 µg/ml des panamaischen Öls (16-72 Std.) induzierte die DNA-Fragmentierung in einer konzentrations-/zeitabhängigen Weise. Allerdings wurde keine DNA-Ladder auf dem Agarosegel für 35 µg/ml des panamaischen Öls beobachtet (4 und 16 Std.).

Hernandulcin konnte in den Konzentrationen von 50, 67, 150 µg/ml eine DNA-Fragmentierung bei HepG2-Zellen induzieren (4-72 Std.). Eine Behandlung der Zellen mit 30 µg/ml Hernandulcin für 4-16 Stunden verursachte dagegen keine DNA-Leiter.

Bei der Negativkontrolle konnte keine DNA-Leiter auf dem Agarosegel beobachtet werden.

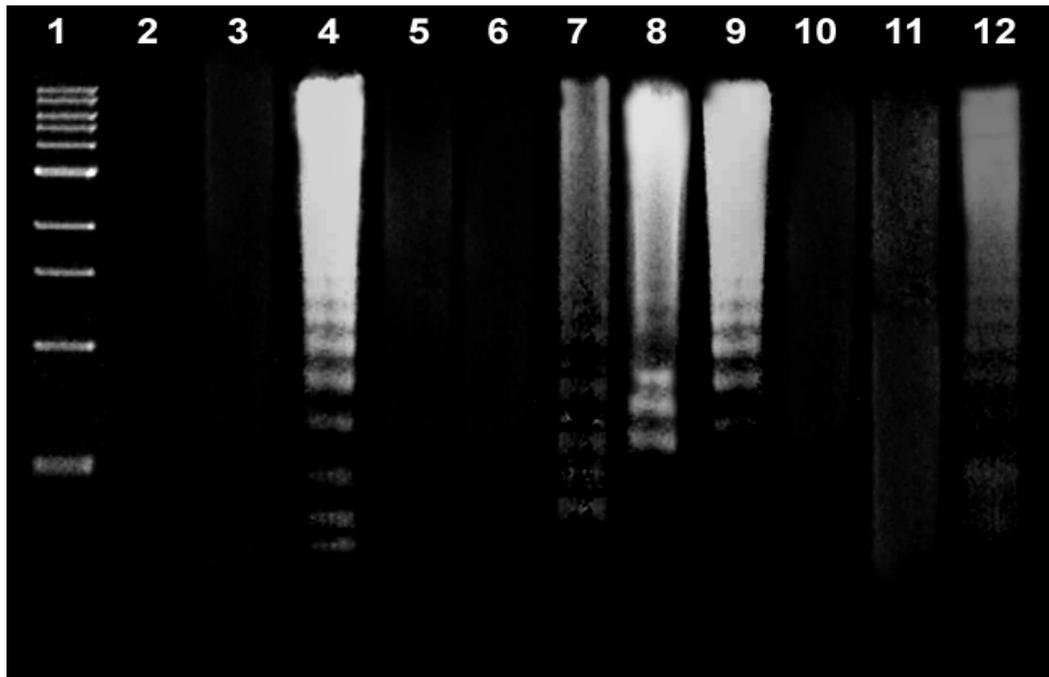


Abb. 3.21: Apoptotische DNA-Leiter in HepG2-Zellen. Inkubationszeit: 48 Std. Spur 1: DNA-Größenstandard 1 kb DNA *ladder*, Spur 2: negative Kontrolle, Spur 3: negative Kontrolle mit DMSO, Spur 4: 500 nM Staurosporin, Spur 5: 250 µg/ml Campher, Spur 6: 250 µg/ml etha. Extrakt, Spur 7: 67 µg/ml Hernandulcin, Spur 8: 150 µg/ml Hernandulcin, Spur 9: 168 µg/ml Öl (Mexiko), Spur 10: 35 µg/ml Öl (Panama), Spur 11: 79 µg/ml Öl (Panama), Spur 12: 150 µg/ml Öl (Panama), $n \geq 4$.

3.7 Quantifizierung der apoptotischen Wirkung mittels AO/EB Färbung

Zur Bestimmung der apoptotischen Eigenschaften des ätherischen Öls bzw. des Hernandulcins, wurden in dieser Arbeit HepG2-Zellen mit 67 µg/ml Hernandulcin bzw. 168 µg/ml Öl, wie in Abschnitt 2.3.8 beschrieben, für 48 Stunden behandelt. Als Positivkontrolle wurden die Zellen mit 500 nM Staurosporin behandelt. Die behandelten HepG2-Zellen wurden dann einer AO/EB Färbung unterzogen, die morphologischen Änderungen wurden mittels Fluoreszenzmikroskopie beobachtet. 100 Versuchszellen wurden ausgezählt und der prozentuale Anteil apoptotischer Zellen wurde kalkuliert.

Die Positivkontrolle (Staurosporin) zeigte die typischen Merkmale einer klassischen Apoptose: geschrumpften Zellen und Kondensation des Zellkernes. Es bildeten sich die sogenannten apoptotischen Körperchen (Abb. 3.22), die Zellmembran blieb zunächst intakt (grüne Färbung), erst in einem späteren Stadium kam es zu einem Verlust der Integrität der Zellmembran (rote Färbung). Im Gegensatz zum Staurosporin-induzierten Zellschaden kam es bei den Testsubstanzen (Öl und Hernandulcin) nicht zur vollständigen Kernfragmentierung. Ca. 20% der mit ätherischem Öl behandelten Zellen und nur 5% der mit Hernandulcin

inkubierten Zellen zeigten apoptotische Änderungen, die Zellkerne waren geschrumpft, kondensiert und im frühen Stadium grün gefärbt, später kam es auch zu einer roten Färbung bei einigen Zellen (siehe Abb. 3.22). Allerdings zeigten nur 1-1,5% der DMSO-behandelten HepG2-Zellen (Negativkontrolle) apoptotische Änderungen.

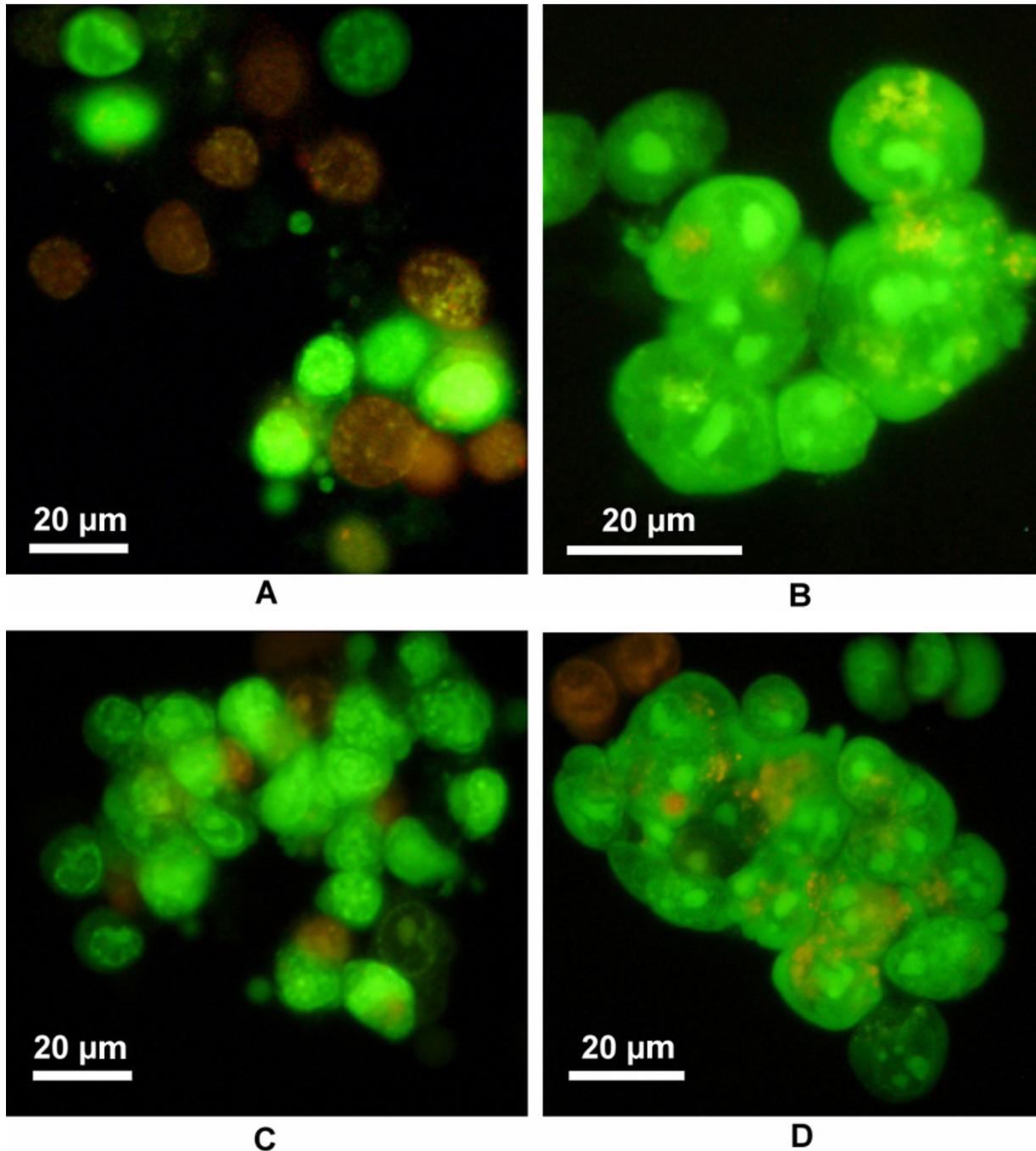


Abb. 3.22: Fluoreszenzmikroskopische Bilder der AO/EB Zellfärbung. HepG2-Zellen wurden für 48 Std. mit 500 nM Staurosporin (A), 0,3% DMSO (B), 168 µg/ml äthe. Öl aus Mexiko (C) und 67 µg/ml Hernandulcin (D) inkubiert.

3.8 Bestimmung des Einflusses der Testsubstanzen auf die Zellmembranintegrität (LDH-Test)

Wenn die Zellen zytotoxischen Schadstoffen ausgesetzt werden, können die Zellen auf verschiedene Art und Weise sterben. Apoptose und Nekrose sind die wichtigsten Wege zur Zerstörung der Zellen. Bei der Zellyse wird das Enzym LDH in den zellulären Überstand freigesetzt und kann biochemisch gemessen werden. In dieser Arbeit wurde die Wirkung der ätherischen Öle und des Hernandulcins auf die Zellmembranintegrität mittels LDH-Test bestimmt.

Die in der Zelle enthaltene LDH-Konzentration unterscheidet sich je nach Zelllinie, deswegen ist es sehr wichtig vor der Untersuchung, die optimale Zellkonzentration von der verwendeten Zelllinie zu ermitteln. Die optimale Zellzahl ist die Zahl bei der die Differenz zwischen der maximalen Kontrolle (vollständige Nekrose) und der minimalen Kontrolle (Kulturmedium) am höchsten ist. Zur Bestimmung der optimalen Zellzahl wurden verschiedene Konzentrationen von HepG2-Zellen mit 1% Triton X-100 (maximale Kontrolle), wie in Abschnitt 2.3.9 beschrieben, behandelt und anschließend die freigesetzte Menge an LDH gemessen. Parallel wurde auch das spontan im Kulturmedium freigesetzte LDH (ohne Substanzbehandlung) gemessen (minimale Kontrolle). Die Messungen wurden in Abb. 3.23 dargestellt.

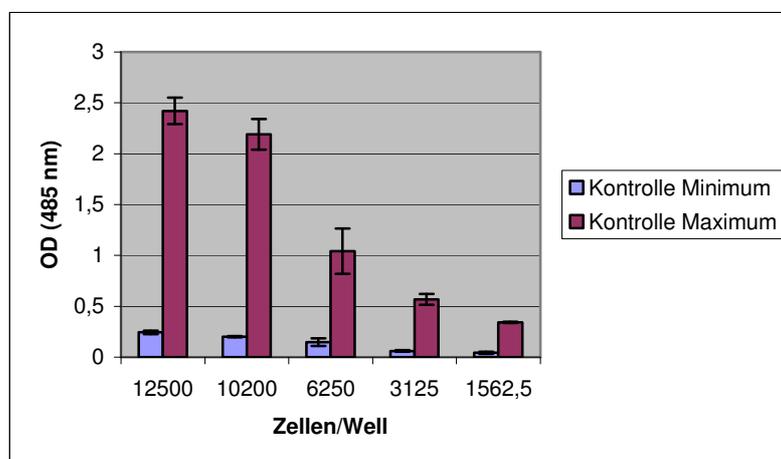


Abb. 3.23: Ermittlung der optimalen Zahl von HepG2-Zellen für den LDH-Test. Blaue Säulen zeigen die minimale LDH-Menge (Zellen wurden mit Kulturmedium mit 1% FCS inkubiert), rote Säulen stehen für die maximale LDH-Menge (Zellen wurden mit 1% Triton X-100 inkubiert). Mittelwert \pm SD, $n=2$.

Bei Zellzahlen, die größer als 12500 pro Kavität sind, konnte die maximale freigesetzte LDH-Menge nicht gemessen werden. Anhand dieser Studie wurden HepG2-Zellen zur Durchführung des LDH-Tests immer mit einer Konzentration von 12500 Zellen pro Kavität verwendet.

Zur Ermittlung des Effekts der ätherischen Öle bzw. des Hernandulcins auf die Membranintegrität, wurden die HepG2-Zellen mit einer Reihe verschiedener Konzentrationen

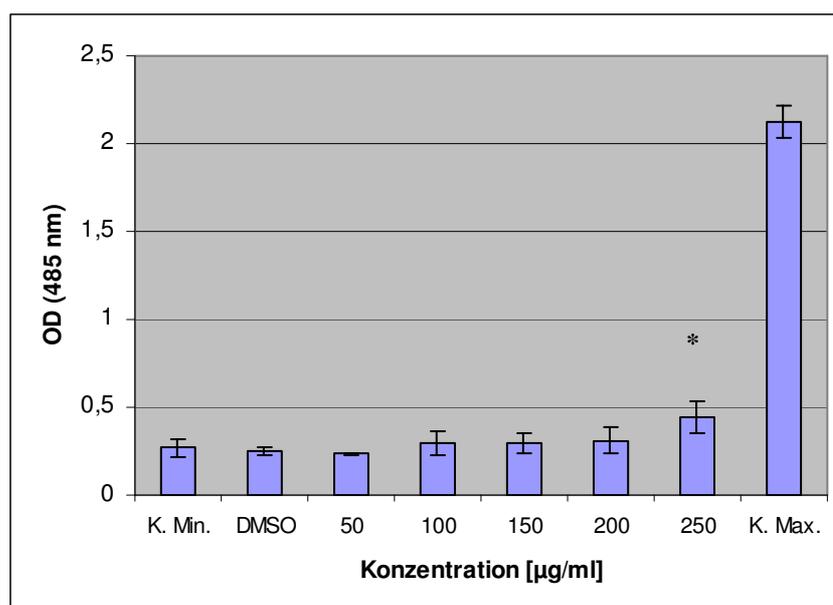
der Testsubstanzen, wie im Abschnitt 2.3.9 beschrieben, behandelt. Zusätzlich zu den minimalen/maximalen Kontrollen wurden auch folgende Kontrollen gemacht:

- Substanzkontrolle: liefert Informationen über die LDH-ähnliche Aktivität der Testsubstanz. Hierbei wird das Öl bzw. das Hernandulcin mit dem Substrat gemischt und die Absorption (OD_{485}) gemessen.
- Blank Kontrolle: Das Kulturmedium wird mit dem Substrat gemischt und die Absorption (OD_{485}) gemessen. Die Blank Kontrolle muss von allen gemessenen Absorptionen der Testsubstanzen abgezogen werden.

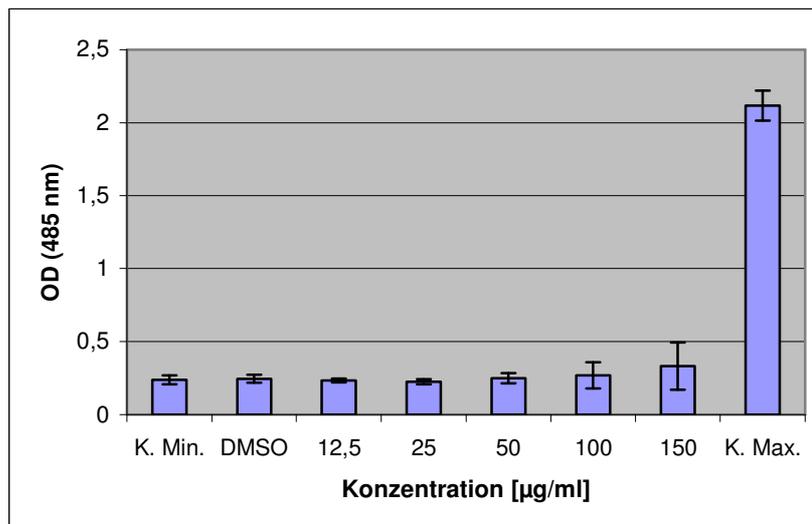
Das in allen LDH-Versuchen verwendete DMSO erwies sich im Konzentrationsbereich von 0,27- 0,45% als nicht toxisch.

Für Hernandulcin und das panamaische Öl konnte im verwendeten Konzentrationsbereich (6- 150 $\mu\text{g}/\text{ml}$) keine signifikante Zytotoxizität nachgewiesen werden. Für das mexikanische Öl gab es auch im Konzentrationsbereich 50-200 $\mu\text{g}/\text{ml}$ keine signifikante Zytotoxizität. Das mexikanische Öl konnte mit einer Konzentration von 250 $\mu\text{g}/\text{ml}$ eine geringe signifikante ($p < 0,05$) Menge vom LDH freisetzen.

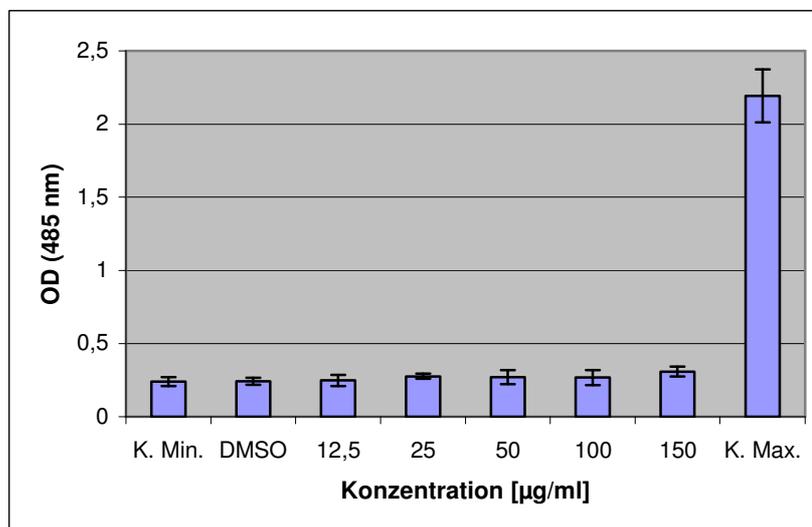
Durch einen fehlenden Anstieg der zytoplasmatischen LDH im Überstand der mit den Testsubstanzen behandelten HepG2-Zellen konnte eine Zytotoxizität durch Nekrose ausgeschlossen werden, als Ursache des Zelltodes blieb nur die Apoptose. Der leichte Anstieg der LDH Konzentration bei 250 $\mu\text{g}/\text{ml}$ des mexikanischen Öls ist im Zusammenhang mit einem Übergang von der Apoptose in die Nekrose bei massivem Zelltod durch Apoptose zu sehen. Ergebnisse der LDH-Studie sind in Abb. 3.24 zusammengefasst.



A



B



C

Abb. 3.24: LDH-Freisetzung in behandelten HepG2-Zellen. Die Zellen wurden für 4 Std. mit dem ätherischen Öl aus Mexiko (A), aus Panama (B), oder mit Hernandulcin (C) im Medium mit 1% FCS inkubiert. K. Min.: Kontrolle Minimum, K. Max.: Kontrolle Maximum. Mittelwert \pm SD, $n=3$. * $P<0,05$ vs. Kontrolle mit DMSO. Keine der untersuchten Konzentrationen übte einen deutlichen Effekt auf die LDH-Freisetzung aus. Die OD-Werte gleichen der minimalen Kontrolle.

3.8.1 Untersuchung der Zytotoxizität mittels MTT-Assay

Zur Ergänzung des LDH Assays und zum besseren Verstanden des Toxizitätsmechanismus wurde unter den gleichen Bedingungen (4-stündige Wirkungsdauer, 1% FCS-Medium) noch ein MTT-Test für die ätherischen Öle und das Hernandulcin durchgeführt.

Zur Optimierung des MTT-Tests wurde zuerst die optimale Zelldichte für eine 4-stündige Inkubation (die Inkubationsdauer mit den Versuchsubstanzen) ermittelt. Dafür wurden die Zellen in verschiedenen Dichten ausgesät, mit 1% FCS-Medium für 4 Std. inkubiert und

anschließend einem MTT-Test unterzogen (siehe Verfahren 2.3.5). Abb. 3.25 zeigt die Linearität der Messung von niedrigen zu hohen Zellzahlen.

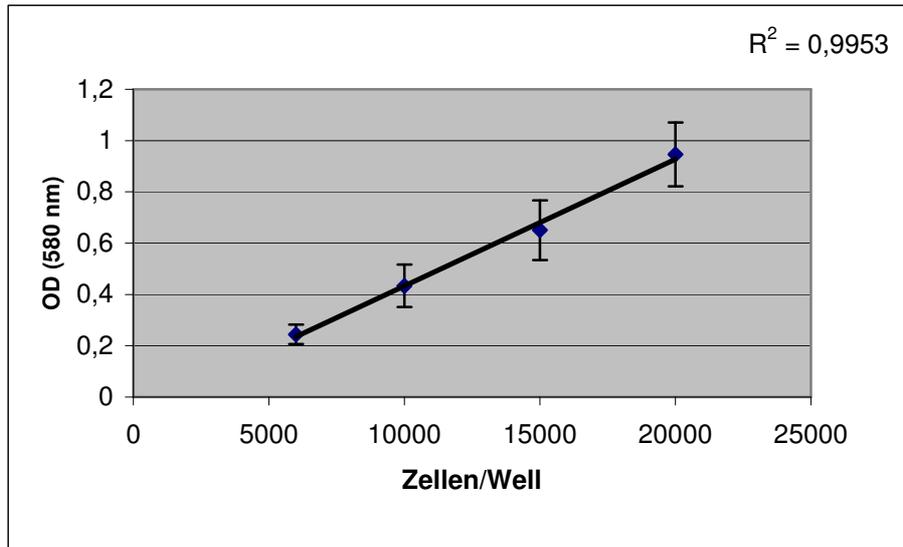
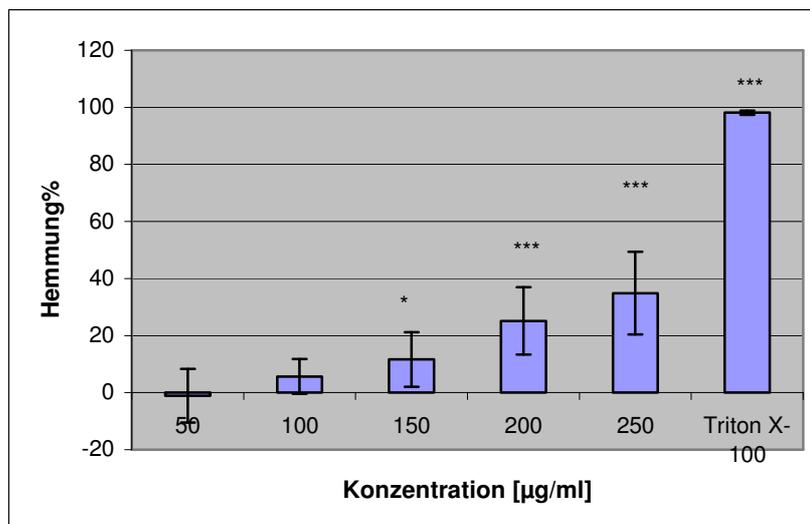


Abb. 3.25: Bestimmung der optimalen Zellzahl für einen 4-stündigen MTT-Test.

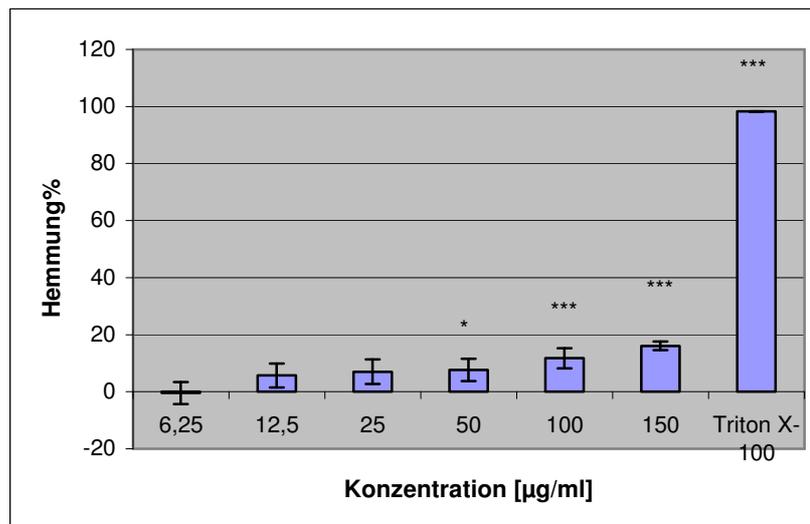
Kultivierte HepG2-Zellen wurden mit 5 mg/mL MTT für 2 Std. inkubiert. Die Absorption für jede Zellzahl wurde bei λ 580 nm gemessen. Dargestellt sind die Mittelwerte und Standardabweichungen aus jeweils 16 Well pro Datenpunkt. Erreichte Farbstoffumsätze der Zellen sind als Extinktionswerte (OD) dargestellt.

Anhand dieser Ergebnisse wurde eine Ausgangszelldichte von 20×10^3 Zellen/Well für den MTT-Test gewählt. Diese Zelldichte soll für reproduzierbare Messergebnisse sorgen.

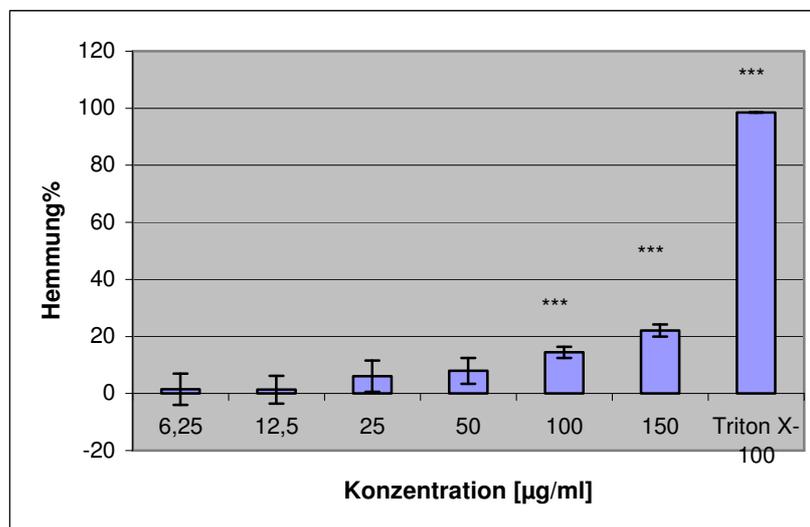
Zur Ermittlung der Zytotoxizität der Öle bzw. des Hernandulcins wurden die HepG2-Zellen in einem 1% FCS-Medium mit verschiedenen Konzentrationen der Testsubstanzen (6,25-150 μ g/ml vom panamaischen Öl bzw. Hernandulcin und 50-250 μ g/ml vom mexikanischen Öl) für 4 Std. inkubiert. Anschließend wurde die Vitalität der behandelten Zellen mittels MTT wie in Abschnitt 2.3.5 beschrieben gemessen und in Abb. 3.26 dargestellt.



A



B



C

Abb. 3.26: Zytotoxizität der Öle und des Hernandulcins mittels MTT-Test. Diagram zeigt die Beeinflussung der Zellproliferation durch steigende Konzentration an Öl aus Mexiko (A), Hernandulcin (B) und Öl aus Panama (C). Gezeigt sind die Mittelwerte \pm SD, $n=3$. * $P<0,05$, *** $P<0,001$ vs. Kontrolle mit DMSO.

Das Öl aus Mexiko weist ab 150 $\mu\text{g/ml}$ eine signifikant erniedrigte Zellvitalität auf. Die Zahl der proliferierenden Zellen wurde unter dem Einfluss von Hernandulcin ab 50 $\mu\text{g/ml}$ niedriger. Die antiproliferative Wirkung vom panamaischen Öl lag im Bereich von 100-150 $\mu\text{g/ml}$.

3.9 Quantifizierung der gesamten Proteinmenge im Zellkernextrakt mittels BCA-Test

Der Proteingehalt des nuklearen Extrakts wurde mit dem BCA-Protein-Assay Kit bestimmt (Abschnitt 2.3.10.2). Zur Herstellung der Eichgerade wurde die optische Dichte OD_{580} für eine Reihe von verschiedenen BSA-Konzentrationen gemessen. Die gemessenen ODs wurden im Diagramm gegen die entsprechenden Konzentrationen aufgetragen (Abb. 3.27).

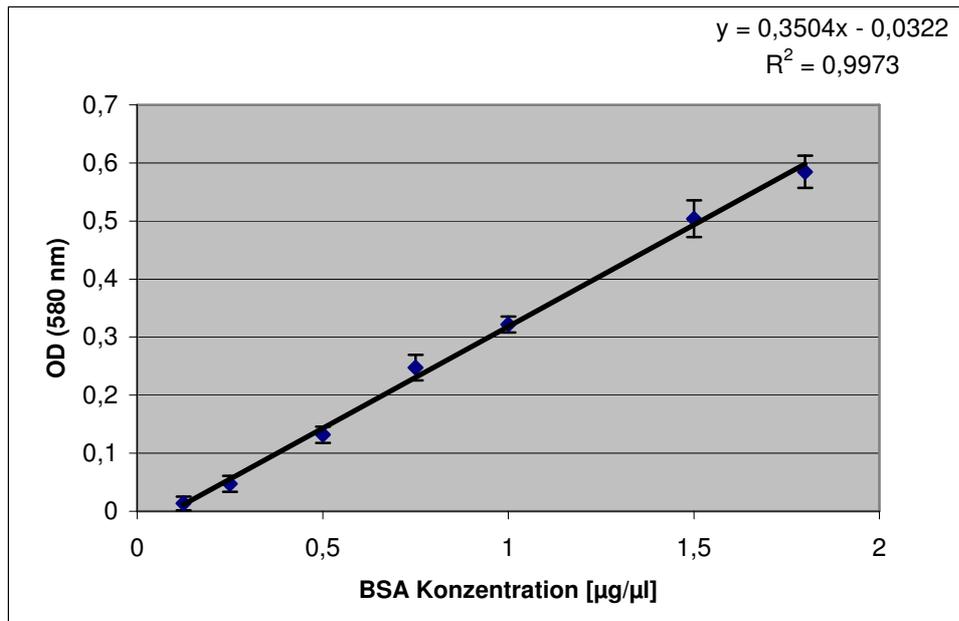


Abb. 3.27: Herstellung einer BSA-Eichgerade mit Hilfe des BCA-Protein-Assay Kits. Mittelwert \pm SD, $n=2$.

Mit Hilfe der Gleichung der Regressionsgerade wurde die Proteinkonzentration im Kernextrakt errechnet.

Beispielrechnung:

Die OD₅₈₀ für einen 4x verdünnten Kernextrakt aus HepG2-Zellen ohne Substanzbehandlung war ca. 0,520, die Proteinkonzentration kann aus der Gleichung berechnet werden:

$$OD_{580} = 0,3504 \text{ Konz.} - 0,0322$$

Die Proteinkonzentration für die 4 x Verdünnung = 1,57 µg/µl, das entspricht 6,28 µg/µl für den Kernextrakt.

3.10 Analyse der Zellkernextrakte mittels SDS-PAGE

Die isolierten Zellkernextrakte wurden auf SDS-Polyacrylamidgelen, wie in Abschnitt 2.3.10.3 beschrieben, analysiert. Auf dem Gel werden die Kernproteine ihrer Größe nach getrennt. Mit Hilfe eines Proteinstandards konnte man die Position der Ku70/86 Proteine genau bestimmen. Das Gel gibt auch Informationen über die Stärke der Kernextrakte und die Qualität der Isolierung. Abb. 3.28 zeigt das Gelbild verschiedener Kernextrakte, die aus den behandelten HepG2-Zellen isoliert werden.

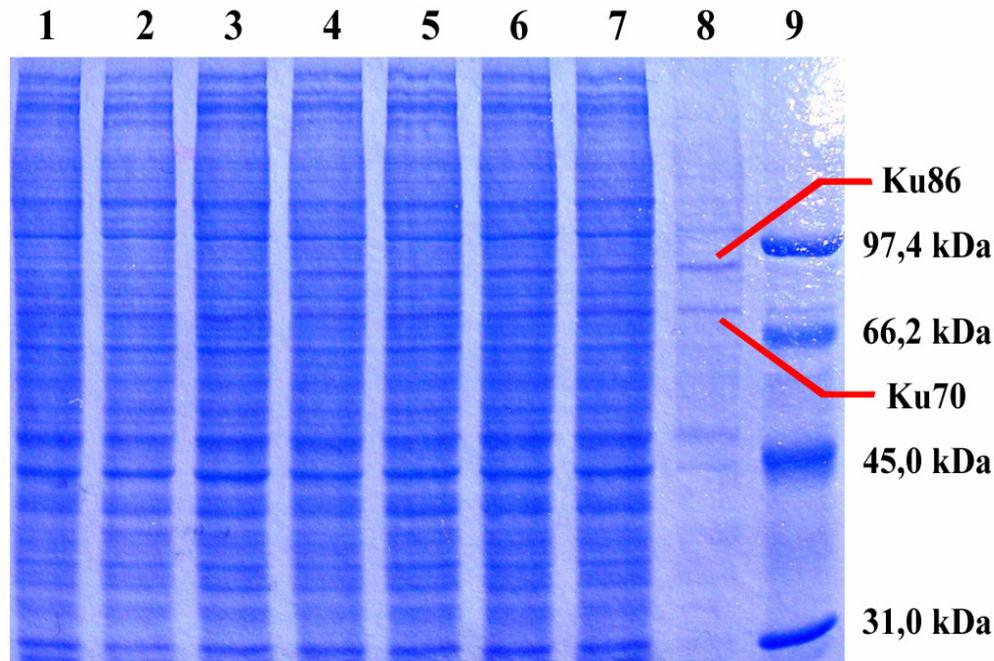


Abb. 3.28: Analysieren der Zellkernextrakte mittels SDS-PAGE. HepG2-Zellen wurden mit den Testsubstanzen inkubiert, die Kernproteine wurden extrahiert und auf einem 10% SDS-Gel bei 180 Volt für eine Stunde getrennt. Spur 1: 0,3% DMSO, Spur 2: 168 µg/ml Öl (Mexiko), Spur 3: 50 µg/ml Öl (Mexiko), Spur 4: 0,14% DMSO, Spur 5: 79 µg/ml Öl (Panama), Spur 6: 0,06% DMSO, Spur 7: 35 µg/ml Öl (Panama), Spur 8: 2,5 µg Raji Extrakt, Spur 9: 6 µg *low range molecular weight* Proteinstandard.

3.11 Untersuchung der Mutagenität durch Bestimmung der Ku70/86 Proteine

Die Beobachtung der Änderungen in der Expression der Ku-Proteine mittels immunologischer Methoden (ELISA bzw. Western Blot) dient als zuverlässige Methode zur Untersuchung der Mutagenität der Testsubstanzen. Es ist heute bewiesen, dass die Ku-Proteine eine wichtige Rolle im DNA-Reparaturmechanismus spielen. Bei einer DNA-Beschädigung durch bestimmte Substanzen oder Faktoren werden die Ku-Proteine in der Regel überexprimiert. Durch seine Affinität zu freien DNA-Enden ist das Ku70-Ku86 Heteromer für das Rekrutieren der DNA-Proteinkinase (DNA-PKcs) zu den DNA-Bruchstellen verantwortlich. Durch Phosphorylierung aktiviert die DNA-PKcs anschließend weitere Enzyme wie Artemis (besitzt Nuklease-Aktivität) und DNA-Ligase, die die DNA-Reparatur meistern (Abschnitt 1.6).

3.11.1 Ergebnisse der ELISA-Studie

HepG2-Zellen wurden, wie in Abschnitt 2.3.10.4.1 beschrieben, mit dem Öl bzw. Hernandulcin für 16 oder 48 Stunden inkubiert. Die Kernproteine wurden aus den behandelten Zellen isoliert und quantifiziert. Das Ku86 Protein in den Kernextrakten wurde immunologisch mit spezifischen Antikörpern auf ELISA-Platten quantifiziert. Als Negativkontrolle dienen

DMSO-behandelte HepG2-Zellen. Die Änderungen in der Ku86-Expression im Falle der behandelten Zellen wurden prozentual im Vergleich zur Negativkontrolle in Tab. 3.7 dargestellt.

Substanz		Änderung der Ku86-Expression %	
		nach 16 Std.	nach 48 Std.
Hernandulcin	30 µg/ml	126,9±8,8*	127,2±12,7*
Hernandulcin	50 µg/ml	k.A.	103±7,2
Hernandulcin	67 µg/ml	80,8±9,1*	68,5±12,1*
Hernandulcin	100 µg/ml	k.A.	45,5±8,7*
Öl aus Mexiko	50 µg/ml	125,8±12,1*	131,4±16,3*
Öl aus Mexiko	168 µg/ml	83,1±7,3*	51,2±10,8*
Öl aus Panama	35 µg/ml	121,9±6,1*	k.A.
Öl aus Panama	79 µg/ml	99,1±9,5	k.A.
Öl aus Panama	120 µg/ml	k.A.	42,7±7,3*

Tab. 3.7: Bestimmung der Ku86-Expression in den behandelten HepG2-Zellen mittels ELISA-Verfahren.
k.A.: keine Angabe, Mittelwert±SD, n=3. *p<0,05 vs. Kontrolle mit DMSO.

In der Regel wird eine Substanz als mutagen betrachtet, wenn sie eine Erhöhung von mind. zwei fach in der Expression der Ku-Proteine verursacht (Brown *et al.*, 2000; Lah *et al.*, 2005). Wie in Tab. 3.7 zu sehen, verursachte das Hernandulcin in kleinen Konzentrationen (30 µg/ml) eine leichte Erhöhung in der Ku86-Expression (ca. 1,3 fach), was nicht als Mutagenität betrachtet werden kann. Mit der Erhöhung der Hernandulcin-Konzentration (66-100 µg/ml) sank die Ku86-Expression, weil Hernandulcin in diesen Konzentrationen eine apoptotische Wirkung auf die Zellen zeigte (siehe Abschnitt 3.6). 50µg/ml des mexikanischen Öls und 35 µg/ml des panamaischen Öls führten auch zu einem leichten Anstieg in der Ku86-Expression (1,2-1,3 fach). Wie beim Hernandulcin zeigten die ätherischen Öle in ihren apoptotischen Konzentration eine Hemmung der Ku86-Expression.

3.11.2 Ergebnisse der Western-Blot-Studie

Quantifizierung des Ku86 Proteins in den behandelten HepG2-Zellen mittels Western Blot hat die Ergebnisse der ELISA-Studie noch mal bestätigt (Durchführung: Abschnitt 2.3.10.4.2). Auf den entwickelten Western-Blot-Filmen wurde eine Bande von ca. 86 kDa beobachtet,

deren Intensität proportional zur Ku86-Konzentration ist und mit dem Programm *EasyWin 32* bestimmt werden konnte (Abschnitt 2.3.10.5). Die gemessenen Intensitäten der Ku86-Banden wurden in Tab. 3.8 zusammengefasst und in Abb. 3.29 dargestellt.

Substanz		Intensität der Ku86-Expression vs. DMSO-Kontrolle %	
		nach 16 Std.	nach 48 Std.
Hernandulcin	30 µg/ml	123,5	127
Hernandulcin	67 µg/ml	70,8	73
Öl aus Mexiko	50 µg/ml	129,2	136
Öl aus Mexiko	168 µg/ml	62,2	67
Öl aus Panama	35 µg/ml	124,8	138
Öl aus Panama	79 µg/ml	103,5	102

Tab. 3.8: Änderung der Ku86-Expression in den behandelten Zellen mittels Western Blot.

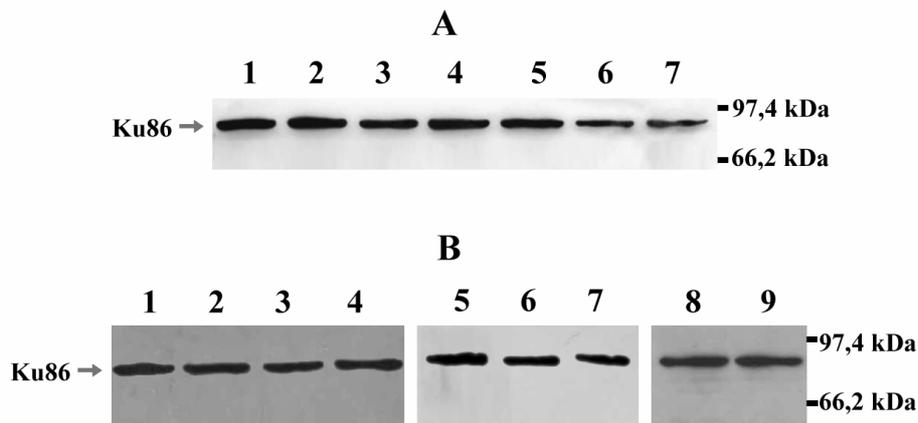


Abb. 3.29: Bestimmung der Ku86-Expression in den behandelten HepG2-Zellen mittels Western Blot.

A) nach einer 16-stündigen Inkubation mit den folgenden Substanzen: Spur 1: 50 µg/ml Öl aus Mexiko (I=129,2%), Spur 2: 30 µg/ml Hernandulcin (I=123,5%), Spur 3: 0,3% DMSO, Spur 4: 35 µg/ml Öl aus Panama (I=124,8%), Spur 5: 79 µg/ml Öl aus Panama (I=103,5%), Spur 6: 168 µg/ml Öl aus Mexiko (I=62,2%), Spur 7: 67 µg/ml Hernandulcin (I=70,8%). **B)** nach einer 48-stündigen Inkubation mit den folgenden Substanzen: Spur 1: 35 µg/ml Öl aus Panama (I=138%), Spur 2: 30 µg/ml Hernandulcin (I=127%), Spur 3: 0,3% DMSO, Spur 4: 50 µg/ml Öl aus Mexiko (I=136%), Spur 5: 0,3% DMSO, Spur 6: 67 µg/ml Hernandulcin (I=73%), Spur 7: 168 µg/ml Öl aus Mexiko (I=67%), Spur 8: 79 µg/ml Öl aus Panama (I=102%), Spur 9: 0,3% DMSO. I= Intensität der Ku86-Bande vs. DMSO-Kontrolle.

3.12 Ergebnisse der pharmakologischen Studie

3.12.1 Einfluss der Testsubstanzen auf der Aktivität der humanen neutrophilen Elastase

Die Untersuchung wurde entsprechend der Beschreibung unter Abschnitt 2.3.11.1 durchgeführt. Die Bestimmung erfolgte unter Verwendung des isolierten Enzyms aus menschlichen neutrophilen Granulozyten und eines synthetischen Peptids als Substrat. Für jede neue Charge der humanen neutrophilen Elastase wurde die Aktivität bestimmt. Damit sollte zum einen die Funktionsfähigkeit des Enzyms geprüft werden, zum anderen wurde auf diese Weise ermittelt, welche Enzymmenge für die Untersuchung optimal ist. Als Positivkontrolle wurde in dieser Arbeit GW311616A ($C_{19}H_{31}N_3O_4S \cdot HCl$) Sigma- Aldrich als spezifischer potenter Inhibitor der humanen neutrophilen Elastase (Macdonald *et al.*, 2001) verwendet. In Konzentrationen von 100 nM zeigte GW311616A eine Hemmung von 65,6% ($SD=2,7$, $n= 8$).

Der ethanolische Extrakt, das ätherische Öl und Hernandulcin wurden auf ihre Beeinflussung der Aktivität der humanen neutrophilen Elastase getestet. Die gemessenen Absorptionen (λ 405 nm) wurden gemittelt und die gemessenen Leerwerte (Testleerwert, Pufferleerwert, Substratleerwert) wurden davon subtrahiert. Dieser Wert prozentual bezogen auf den 100%-Wert (volle Aktivität der Elastase) ergab die Restaktivität des Enzyms und somit dessen Hemmung. Das ätherische Öl in einer Konzentration von 250 $\mu g/ml$ und das Hernandulcin in einer Konzentration von 100 $\mu g/ml$ zeigten keinerlei Wirkung auf die Aktivität der Elastase. Der ethanolische Extrakt konnte dagegen ab einer Konzentration von nur 5 $\mu g/ml$ die Aktivität der Elastase signifikant reduzieren, schon bei einer Konzentration von 100 $\mu g/ml$ war 76,6% der Aktivität gehemmt. Nach Auftragung der prozentualen Hemmung gegen die Konzentration des ethanolischen Extrakts konnte eine Kurve erhalten werden (Abb. 3.30), aus der man den IC_{50} -Wert berechnen konnte.

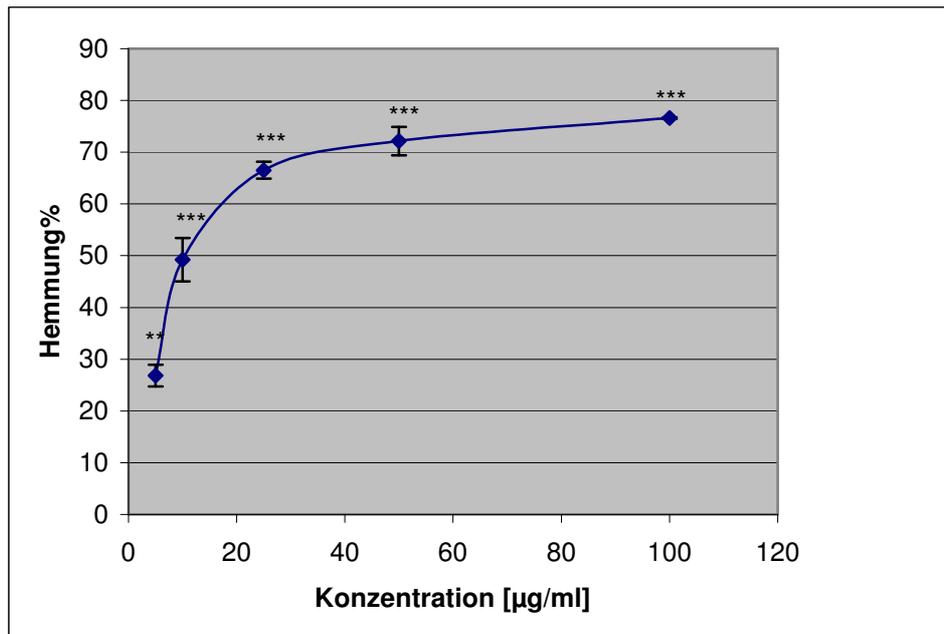


Abb. 3.30: Prozentuale Hemmung der Elastaseaktivität bei unterschiedlichen Konzentrationen des ethanolen Extrakts aus *Lippia dulcis*. Mitterwert \pm SD, $n=8$, ** $P<0,01$, *** $P<0,001$. Der Et-Extrakt zeigt eine konzentrationsabhängige Hemmung der Elastase-Aktivität. Die berechnete IC_{50} ist $10,7 \mu\text{g/ml}$.

3.12.2 Die spasmolytische Wirkung des ätherischen Öls

Zur Ermittlung der spasmolytischen Eigenschaften des ätherischen Öls von *Lippia dulcis* wurden in dieser Arbeit Bronchialsegmente aus Schweinelungen verwendet, die über M_3 -Muskarinrezeptoren und H_1 -Histaminrezeptoren verfügen. Es wurde hierbei ermittelt, ob das ätherische Öl eine spasmolytische Wirkung gegen die Carbachol- bzw. Histamin-induzierten Kontraktionen besitzt. Alle Experimente wurden nach dem Protokoll 2.3.11.2 durchgeführt. Glatte Muskeln der Bronchialsegmente zeigten konzentrationsabhängig Kontraktionen durch Carbachol bzw. Histamin. 10 nM Atropin bzw. 30 nM Mepyramin antagonisierten die Kontraktion des entsprechenden Agonisten und verursachten eine Rechtsverschiebung der Konzentrations-Wirkungskurve ohne Verminderung der maximalen Reaktion (siehe Abb. 3.31 und 3.32). Somit war es sicher, dass die M_3 -Muskarinrezeptoren und H_1 -Histaminrezeptoren in die Agonist-induzierten Kontraktionen involviert sind. Den pA_2 -Wert (siehe Anhang B) wurde für Atropin und Mepyramin berechnet: $9,01\pm 0,1$ ($n=4$) und $8,3\pm 0,1$ ($n=4$).

Im Gegensatz zu Atropin verursachte das ätherische Öl aus Mexiko ($100 \mu\text{g/ml}$) keine Rechtsverschiebung der Carbachol-Wirkungskurve. Das ätherische Öl reduzierte aber die Carbachol-induzierte maximale Kontraktion von 129 ± 4 auf $94\pm 7\%$ (Abb. 3.31). Außerdem zeigte das ätherische Öl in einer Konzentration von $50 \mu\text{g/ml}$ keine Wirkung auf die Carbachol-induzierte Kontraktion (Ergebnisse sind nicht dargestellt).

50 µg/ml des mexikanischen ätherischen Öls reduzierten leicht die maximale Histamin-induzierte Kontraktion von 119±8 auf 88±3% ($P<0,05$) ohne die Wirkungskurve nach rechts zu verschieben (siehe Abb. 3.32). 100 µg/ml des ätherischen Öls konnten aber die Histamin-Wirkungskurve signifikant nach rechts verschieben ($P<0,05$) und die maximale Kontraktion von 106±6 auf 64±7% reduzieren.

Eine Negativkontrolle wurde mit DMSO (das Lösemittel) gemacht um die Beeinflussung der Ergebnisse dadurch auszuschließen. DMSO zeigt keine Wirkung auf die Carbachol- bzw. Histamin-induzierten Kontraktionen.

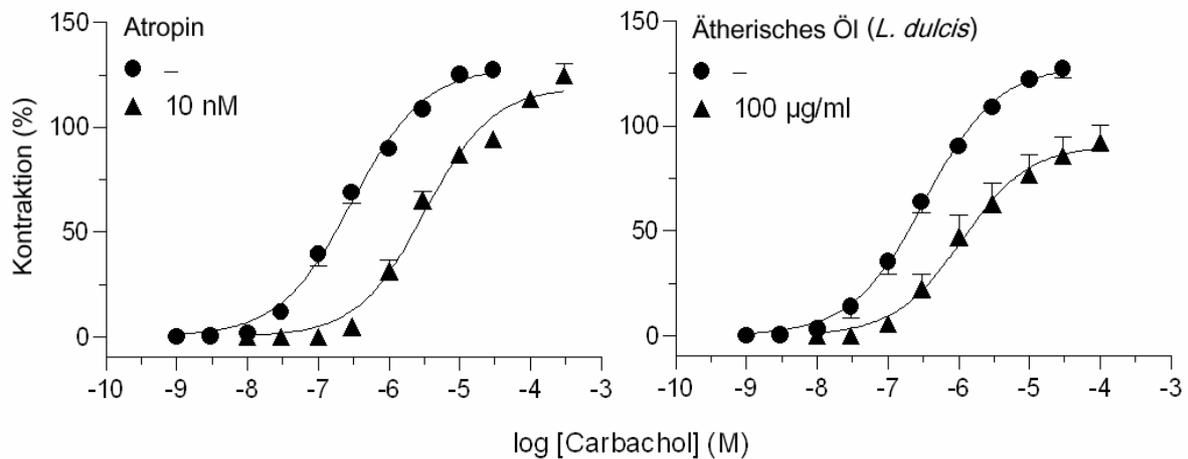


Abb. 3.31: Carbachol-induzierte Kontraktion in Schweinebronchien in An- und Abwesenheit des Antagonisten: Atropin (links) und ätherisches Öl (rechts). Alle Kontraktionen sind als Prozentsatz der Kontraktion bei 3 µM Carbachol gezeigt. Mittelwert±SEM, n=4.

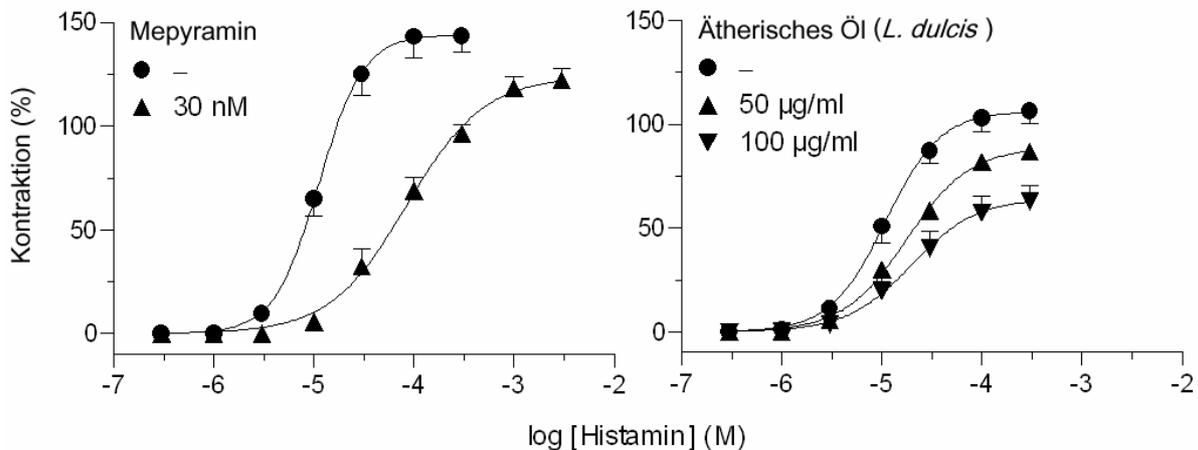


Abb. 3.32: Histamin-induzierte Kontraktion in Schweinebronchien in An- und Abwesenheit des Antagonisten: Mepyramin (links) und ätherisches Öl (rechts). Kontraktionen sind als Prozentsatz der Kontraktion bei 100 µM Histamin gezeigt. Mittelwert±SEM, n=4.

3.12.3 Die antispasmodische Aktivität des ätherischen Öls an der Rattentrachea

Die antispasmodischen Effekte der ätherischen Öle (aus Mexiko und Nicaragua) an den oberen Atemwegen wurden auf Ba^{2+} -induzierter Kontraktion der Rattentrachea untersucht. Die Öle wurden in einer Konzentration von 50 nl/ml eingesetzt. Die Untersuchung wurde, wie in Abschnitt 2.3.11.3 beschrieben, durchgeführt. Es wurden Konzentrations-Wirkungskurven für $BaCl_2$ (Agonist) in An- und Abwesenheit des getesteten Öls erstellt (siehe Abb. 3.33).

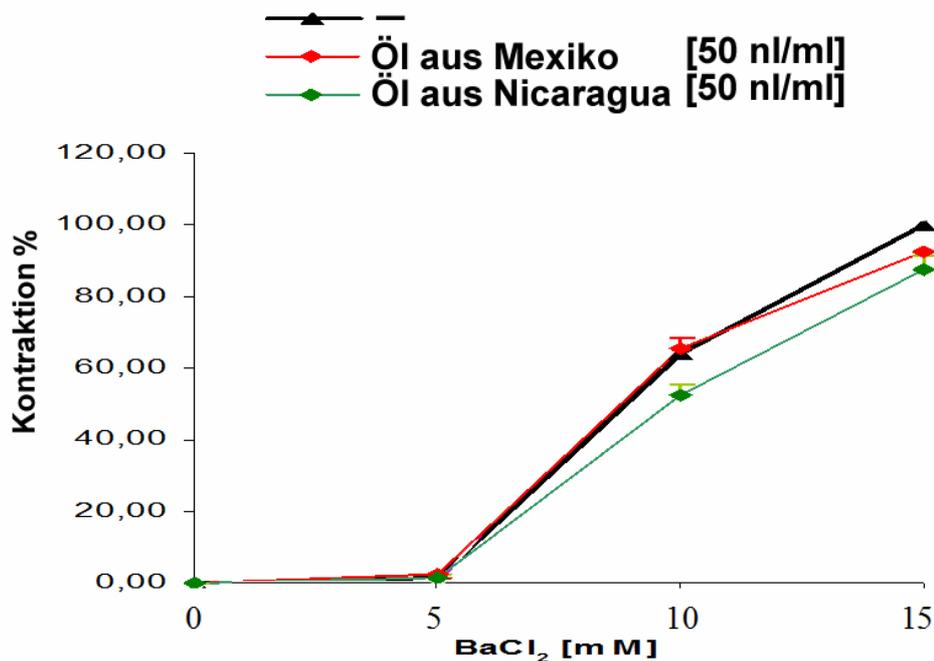


Abb. 3.33: Einfluss der ätherischen Öle auf die Ba^{2+} -induzierten Kontraktion in isolierten Rattentrachea. Data sind als Prozentsatz der maximalen Kontraktion (bei 15 mM $BaCl_2$) gezeigt. Mittelwert \pm SEM.

Wie von der Abb. 3.33 deutlich zu erkennen gab es für das mexikanische Öl (50 nl/ml) keine Wirkung auf die Ba^{2+} -induzierte Kontraktion der Rattentrachea. Im Gegensatz dazu zeigte das Öl aus Nicaragua eine spasmolytische Aktivität auf die Kontraktion der Rattentrachea.

3.12.3.1 Der Effekt des ätherischen Öls auf die mukoziliäre Clearance

Die mukoziliäre Clearance des respiratorischen Epithels ist der wichtigste Reinigungsmechanismus der Atemwege (Trachea, Bronchien, Bronchioli).

Der Effekt des ätherischen Öls (aus Mexiko) auf die mukoziliäre Clearance wurde *in vivo* auf den Transport eines Rhodamin 123 Tropfchens in der Rattentrachea mittels der Mikrodialysetechnik untersucht (siehe Abschnitt 2.3.11.4). Die Versuchstiere wurden 3-mal mit [50 μ l/kg] des ätherischen Öls bzw. 10% DMSO (das Lösemittel) behandelt. Anschließend wurde die Geschwindigkeit der mukoziliären Clearance gemessen. Die Studie

zeigte eine leichte Zunahme der mukoziliären Clearance in Ratten, die mit dem Öl behandelt wurden. Die nötige Zeit zur Wanderung des Rhodamin-Tröpfchens über den 12 mm langen Tracheaabschnitt ist von 505 auf 310 Sekunden gesunken. DMSO in der verwendeten Konzentration zeigte keinen Einfluss auf die mukoziliäre Clearance.

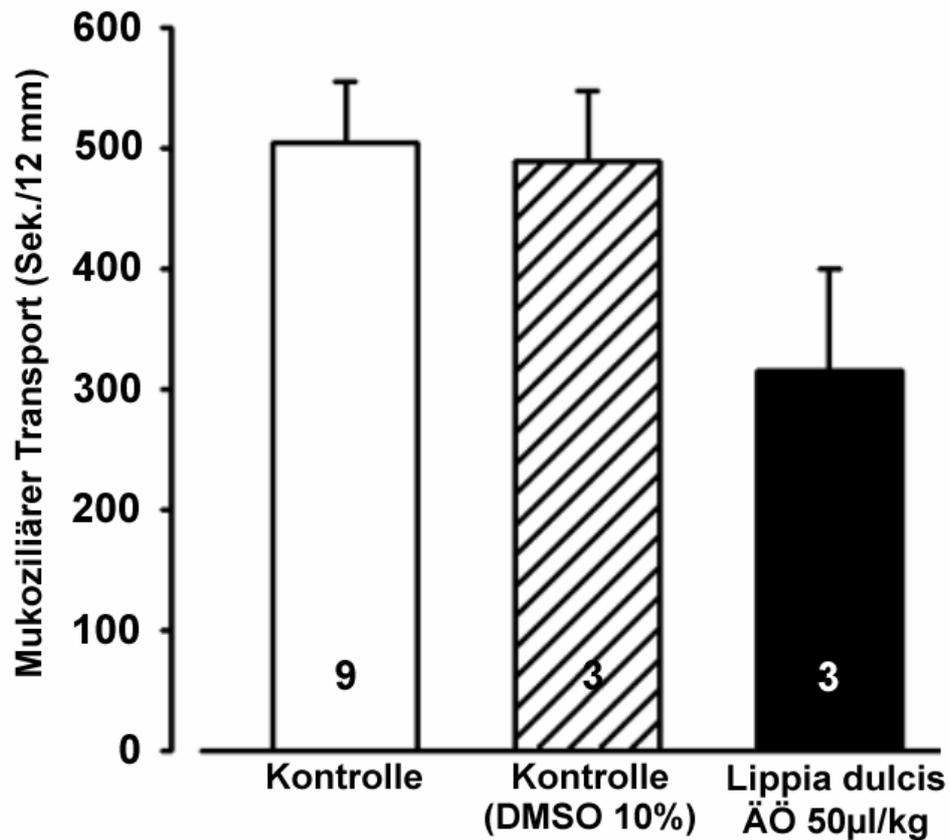


Abb. 3.34: Effekt des ätherischen Öls (aus Mexiko) auf die *in vivo* mukoziliäre Clearance. Die Säulen zeigen die Zeit zur Wanderung des Rhodamin entlang des 12 mm langen Tracheaabschnitts. Mittelwert \pm SEM, $n=3-9$.

4. DISKUSSION

Lippia Spezies fanden aufgrund ihrer aromatischen Eigenschaften weltweit (sie enthalten ätherische Öle) große Aufmerksamkeit (Pascual *et al.*, 2001). Ätherische Öle sind als Arzneimittel, Geschmackszusätze und Parfüme bereits seit Jahrtausenden genutzt worden. Heutzutage finden sie in pharmazeutischen Produkten, Kosmetika und in der Lebensmittelindustrie viel Verwendung (Luque de Castro *et al.*, 1999; Mangena and Muyima, 1999). Die meisten *Lippia*-Arten werden traditionell zur Abkochung, als Magendarm- und respiratorische Heilmittel genutzt (Pascual *et al.*, 2001).

Einige *Lippia*-Spezies haben antimalaria (Gasquet *et al.*, 1993), antivirale (Abad *et al.*, 1995) und zytostatische Wirkungen (López *et al.*, 1979; Slowing Barillas, 1992; Klueger *et al.*, 1997) gezeigt.

Viele von ihnen werden als spasmolytischer Tee genutzt, einige werden als analgetische, antiinflammatorische und/oder fiebermildernde Arzneien eingesetzt (Morton, 1981; Pascual *et al.*, 2001). Die ätherischen Öle dieser *Lippia*-Arten könnten für die o.g. Wirkungen verantwortlich sein. Zusätzlich zu ihrer medizinischen Verwendung werden ätherische Öle wirksam in der Aromatherapie genutzt (Olleveant *et al.*, 1999).

Mehrere mexikanische Arten wurden als Abortivum und Emmenagogum angewendet, die meisten Autoren assoziierten diese Wirkungen mit dem relativ hohen Gehalt an giftigen Monoterpenen wie Campher, *p*-Cymol und Bornylacetat (Compadre *et al.*, 1986 & 1987; Domínguez *et al.*, 1989).

Lippia dulcis ist ein aromatisches Kraut, welches von den Azteken für lange Zeit medizinisch verwendet wurde. In Europa sind *Lippia*-Arten seit den Kolonialzeiten bekannt (Compadre *et al.*, 1986).

Forscher fingen erst Ende des 19. Jahrhunderts an, *Lippia dulcis* phytochemisch zu untersuchen. Die Arzneipflanze besitzt eine lange therapeutische Geschichte und wurde zur Behandlung von Erkältungen, Bronchitis, Husten, Asthma und Koliken eingesetzt.

Die Entdeckung von Hernandulcin, ein Sesquiterpen welches 1000 mal süßer als Saccharose ist, hat es möglich gemacht, diesen Stoff als Prototyp einer neuen Generation von Süßungsmitteln zu benutzen (Compadre *et al.*, 1986; Catalan and de Lampasona, 2002).

4.1 Morphologische Merkmale der Pflanze

Schon zu Beginn dieser Arbeit war es nach intensiver Literaturrecherche offensichtlich, dass die Morphologie von *Lippia dulcis* nicht genügend untersucht wurde. Im Gegensatz dazu war die Zusammensetzung des ätherischen Öls gut untersucht worden.

In dieser Arbeit präsentieren wir die erste Beschreibung der Morphologie von *Lippia dulcis* mit Hilfe der Lichtmikroskopie und der Phloroglucin/HCl-Färbungsmethode (siehe 2.3.1). Die morphologische Untersuchung wurde durchgeführt um die ölproduzierenden Organe zu beschreiben.

Die Sekretionsstrukturen dieser aromatischen Pflanze bestehen aus Drüenschuppen und Drüsenhaaren, die aus Epidermzellen stammen. In diesen Strukturen finden die Biosynthese, die Sekretion und die Lagerung der sekundären Metabolite der Pflanze statt (Combrinck *et al.*, 2007; Weiss, 1997; Gersbach, 2002). Dieses Sekret besteht aus Mono-, Di-, Tri- und Sesquiterpenen sowie Flavonoidaglyka. Es könnte als Wachstumsregulator fungieren, Schutz gegen Schädlinge bieten oder auch Insekten für die Bestäubung anlocken (Bisio *et al.*, 1999; Weiss, 1997; Bosabalidis, 2002).

Mikroskopisch kommen die Sekretionsstrukturen vor allem in den Blüten, weniger in den Blättern und nur sehr wenig auf den Stängeloberflächen vor. Dieses Ergebnis wurde durch die Destillation bestätigt. Mittels Destillation wurde mehr Öl aus den Blüten gewonnen als aus den Blättern (siehe 3.2.3). Die Ölausbeute ist in direkter Verbindung mit der Verteilung und der Dichte der Terpenoid- haltigen Drüsen zu sehen (Bosabalidis and Kokkini, 1997).

Die Drüsenhaare könnten auch an der Biosynthese von Terpenen, Gummi, Schleimstoffen, Resinen und salzhaltigen Lösungen beteiligt sein (Bosabalidis, 2002).

Die oberirdischen Teile vieler Pflanzen sind von Trichomen (Haare und Drüsenhaare) bedeckt, welche in Größe, Form, Anatomie, Ultrastruktur, Funktion, Ursprung und Entwicklungsmuster sehr stark variieren können. Diese Merkmale, insbesondere die Haarform, wurden von Wissenschaftlern zur Klassifizierung der Pflanzen benutzt (Bosabalidis, 2002). Trichome, die über keine Sekretionsfunktion verfügen, können eine Rolle bei der Temperaturverteilung und Transpiration auf den Oberflächen, die sie besiedeln, spielen (Bosabalidis, 2002).

4.2 Faktoren, die Zusammensetzung und Ausbeute des ätherischen Öls beeinflussen

Obwohl die in dieser Arbeit verwendeten *L. dulcis* Populationen aus verschiedenen Regionen stammten (Mexiko, Panama und Nicaragua), schienen sie morphologisch einheitlich zu sein.

Im Gegensatz dazu konnten signifikante Unterschiede in der Ölzusammensetzung mittels GC festgestellt werden.

Das ätherische Öl der Pflanzen aus Panama und Nicaragua enthält so gut wie keinen Campher. Das Öl aus Panama enthält nur $(0,01 \pm 0,009\%)$ Campher und mehr Hernandulcin $(14,5 \pm 2,2\%)$ im Vergleich zu dem ätherischen Öl der Pflanzen aus Mexiko $(32,6 \pm 0,2\%$ Campher und $10,1 \pm 0,8\%$ Hernandulcin) (siehe 3.2.7).

Ähnliche Ergebnisse wurden von Kaneda *et al.* (1992) und Souto-Bachiller *et al.* (1997) erwähnt. In der letztgenannten Arbeit wurde berichtet, dass das ätherische Öl der Pflanzen aus Puerto Rico 36% (+)-Hernandulcin enthält, während Campher nicht nachweisbar ist ($\ll 0,01\%$). Im ätherischen Öl der Pflanzen aus Mexiko wurden hingegen 53% Campher und nur Spuren von Hernandulcin (40 ppm w/w) nachgewiesen. Die *L. dulcis* Varietäten unterscheiden sich nicht nur in der Zusammensetzung ihres ätherischen Öls sondern auch in ihren medizinischen Anwendungen. Die Pflanze aus Puerto Rico wird benutzt, um Bronchitis zu behandeln oder als Beruhigungsmittel zur Milderung von Husten und Magendarmkoliken. Dagegen werden die mexikanischen Pflanzen als Abtreibungsmittel oder Emmenagogum verwendet.

Es ist bekannt, dass Öle von verschiedenen Populationen der gleichen Art sich weit in der Zusammensetzung unterscheiden können. Die unterschiedlichen Zusammensetzungen der *L. dulcis* Pflanzen könnten durch spontane Mutationen als Anpassung an bestimmte Umweltfaktoren entstanden sein (Souto-Bachiller *et al.*, 1997). Mit anderen Worten der Umweltstress könnte bei gleichen *Lippia*-Spezies zur Bildung von neuen unterschiedlichen chemischen Substanzen ohne Änderung der Pflanzenmorphologie führen. Es ist auch nicht auszuschließen, dass eine Hybridisierung mit anderen Spezies zur selektiven Beseitigung des Campher-Chemotyps in den Panama-Spezies führen könnte. In allen Fällen deutete das auf eine hohe Anpassungsfähigkeit dieser Pflanze gegenüber Änderungen der Umweltbedingungen hin.

Lippia-Spezies schienen genetisch stabil zu sein, als sie von der Wildnis übertragen und anschließend unter kontrollierten Bedingungen kultiviert wurden (Juliani *et al.*, 2002; Catalan and de Lampasona, 2002).

Zusätzlich zur chemischen Zusammensetzung unterschied sich auch die Ölausbeute je nach Herkunft. Pflanzen aus Panama und Nicaragua enthalten weniger ätherisches Öl (1,2% und 1,3% v/w) als die mexikanischen Pflanzen (1,5% v/w). Für alle drei Pflanzenpopulationen gilt, dass während der Zeit der Blüte (von März bis Oktober) mehr ätherisches Öl produziert wird.

4.2.1 Hinweise zur industriellen Gewinnung des ätherischen Öls aus *L. dulcis*

Unterschiede in den Ölprofilen der verschiedenen Pflanzenpopulationen ermöglichen eine Kultivierung selektiver Stämme zur Gewinnung von bestimmten Ölprofilen. Ölprofile können nicht als typische Fingerabdrücke benutzt werden. Der richtige Zeitpunkt (Blühsaison) der Pflanzen-Ernte ist ein wichtiger Aspekt in der industriellen Produktion des Öls, da hier ein kleineres Pflanzenvolumen destilliert werden kann, um die gleiche Menge des Öls zu produzieren.

Betrachtet man die Ausbeute, ist es sehr sinnvoll die Pflanzen nach einer Lufttrocknung zu destillieren. Die Nacherntentrocknung ist ein angenommnes Verfahren in der Produktion ätherischer Öle (Whish and Williams, 1996). Das Trocknen der Pflanzen vor der Destillation verbessert später die Wärmeverteilung und führt zu größeren Ölausbeuten. Weitere Vorteile der Pflanzentrocknung sind die Reduzierung des bakteriellen Wachstums und die Hemmung unerwünschter biochemischer Reaktionen (Baritiaux *et al.*, 1992; Soysal and Öztekin, 2001).

Allgemein werden in der Literatur zur Gewinnung der ätherischen Öle entweder Blätter und Blüten (Souto-Bachiller *et al.*, 1997) oder die gesamten oberirdischen Teile der Pflanze (Compadre *et al.*, 1986) verwendet. Industriell gesehen ist eine Trennung der Blätter bzw. Blüten von den Stängeln sehr aufwendig, deswegen empfiehlt es sich das Öl aus der gesamten Pflanze zu destillieren.

4.3 Quantitative Untersuchungen zu den Hauptbestandteilen des ätherischen Öls mittels GC und HPLC

Beim GC-Verfahren wurden in dieser Arbeit die Hauptbestandteile des ätherischen Öls (Hernandulcin und Campher) auf einer unpolaren Kapillarsäule HP-5 mittels Flammenionisationsdetektor (FID) detektiert. Diese Methode gilt als Standardverfahren zur quantitativen Analyse von ätherischen Ölen.

Die Probe wurde hier *splitless* direkt injiziert, die Flashverdampfungstechnik ermöglicht die Nutzung der höheren Injektionstemperaturen zur vollständigen Verdampfung der Probe selbst bei hitzeempfindlichen Substanzen. Ein zweiter Vorteil dieser Methode ist es, das eine sehr schnelle Wanderung der Probe auf der Säule erreicht werden kann, das wiederum reduziert die Gefahr eines Probenabbaus durch die Hitze (Souto-Bachiller *et al.*, 1997).

Beim HPLC-Verfahren wurde als stationäre Phase eine mit Octadecansäure veresterte Kieselgel Eurospher-Säule (modifizierte Kieselgel-Säule) verwendet. Zur Detektion wurde ein UV-Detektor verwendet.

Die Analyse mittels HPLC zeigte, dass der bestimmte Campher-Gehalt des Öls deutlich von den Ergebnissen der GC-Bestimmung abwich (siehe 3.2.7 & 3.2.8). Die HPLC-Analyse ergab im Vergleich zu den GC-Ergebnissen deutlich höhere Campher-Konzentrationen. Für Hernandulcin waren die HPLC-Ergebnisse ebenfalls signifikant höher als die Ergebnisse der GC ($P < 0,05$). Vielleicht war die Trennung der Einzelkomponenten des ätherischen Öls unter diesen Bedingungen nicht optimal trotz ihrer Reproduzierbarkeit.

In dieser Arbeit erwies sich die HPLC im Vergleich zur GC als weniger effizient zur Quantifizierung flüchtiger Verbindungen.

Eine GC-Analyse der verschiedenen Pflanzenextrakte, hergestellt mit Lösungsmitteln unterschiedlicher Polarität (CH_2Cl_2 , CHCl_3 , Hexan, Aceton, EtOH, MeOH), war aufgrund der Verstopfungsgefahr der GC-Säulen durch das Chlorophyll unmöglich.

4.4 Bewertung von Hernandulcin als potenziellen Süßstoff

Bedingt durch den hohen Kaloriengehalt und den kariogenen Eigenschaften von Saccharose, wurden ständig alternative Mittel gesucht um den menschlichen Bedarf an „Süße“ zu decken. Der Verbrauch von kalorienarmen bzw. zuckerfreien Produkten hat sich in den letzten 20 Jahren des 20. Jahrhunderts verdreifacht. Allein in den Vereinigten Staaten benutzen mehr als 150 Millionen Menschen regelmäßig diese Produkte (O'Brien Nabors, 2001). Dort werden synthetische Verbindungen wie Saccharin, Cyclamat, Aspartam, Acesulfam-Kalium und Sucralose für diesen Zweck verwendet.

In Japan werden Natursüßstoffe wie Phyllo dulcin, Steviosid und Glycyrrhizin verwendet, wobei keiner von diesen Stoffen ideal ist, da entweder der Geschmack nicht ganz angenehm, die Verwendung bedenklich, die chemische Struktur instabil oder die Produktionskosten sehr hoch sind (Compadre *et al.*, 1985).

Ideale Süßmittel müssen bestimmte Voraussetzungen erfüllen u.a. hohe Süßkraft, Farblosigkeit, Geruchlosigkeit, zuckerähnliche Geschmacksqualität, ausreichende Löslichkeit in Wasser, Stabilität unter basischen und sauren Bedingungen, Hitzeunempfindlichkeit, erwiesene Sicherheit für den menschlichen Verzehr und untoxische Verstoffwechslung bzw. unveränderte Ausscheidung. Zusätzlich müssen ideale Süßmittel leicht herstellbar, lagerbar und transportfähig sein (Crosby and Wingard, 1979 ; O'Brien Nabors, 2001).

In einem Patent des racemischen synthetischen Hernandulcins als nicht kariogenen Süßstoff wurden folgende Eigenschaften erwähnt (Kinghorn *et al.*, 1989):

- Hernandulcin ist bis zu 0,5 g/l wasserlöslich.
- Hernandulcin ist hydrolysestabil bei pH-Werten von 2-12 in einer Konzentration von ca. 0,2% (w/w) bei Temperaturen bis 60°C. Seine Hauptabbauprodukte sind 3-Methyl-2-cyclohexen-1-on und 6-Methyl-5-hepten-2-on. Diese Abbauprodukte insbesondere der letzte sind grundsätzlich nicht toxisch für Mäuse.
- Zur Abschätzung der Thermostabilität von Hernandulcin wurde es bei 100°C für 24 Stunden gelagert, anschließend wurden erhitzte und nicht erhitzte Proben von Hernandulcin auf einer DC-Platte analysiert und verglichen. Ca. 60% des Hernandulcins hat die Hitzebehandlung unverändert überstanden und ca. 10% wurde in 3-Methyl-2-cyclohexen-1-on und 6-Methyl-5-hepten-2-on umgewandelt.
- Bei seinem Einsatz auf den *Salmonella typhimurium* Stamm TM677 zeigte Hernandulcin keinerlei Mutagenität. Untersuchungen auf akute Toxizität bei Mäusen durch orale Aufnahme von Hernandulcin wiesen nach, das Hernandulcin nicht toxisch ist (Compadre *et al.*, 1987).
- Seine minimale Kariogenizität ermöglicht seine Verwendung in vielen Mundpflege- und Mundreinigungsprodukten wie Mundwasser und Zahnpasten. In sehr geringer Konzentrationen kann es geschmackseffektiv sein.

Allerdings wurde Hernandulcin von den Probanden als weniger angenehm als Saccharose (besitzt Nachgeschmack) und mildbitter beurteilt (Compadre *et al.*, 1985). Racemisches (\pm)-Hernandulcin könnte in einer großen Auswahl von Getränken, Nahrungsmitteln, Pharmarezepturen und ähnlichen Produkten für Menschen und Tiere eingesetzt werden. Bei einer Verwendung von Hernandulcin für Nahrungsmittel sollte seine Konzentration im geschmackseffektiven Bereich sein (mit Rücksicht auf die Wechselwirkungen aller Zutaten der Rezeptur). Generell wird eine Konzentration im Bereich von 0,005-0,5% (w/w) effektiv sein, wobei bevorzugte Konzentrationen zwischen 0,01 und 0,1% (w/w) liegen.

Allerdings könnte die chemische Struktur von Hernandulcin modifiziert werden um seine Löslichkeit in Wasser zu verbessern oder seinen Geschmack angenehmer zu machen.

In der vorliegenden Arbeit haben wir versucht die Süßkraft des Hernandulcins im Vergleich zu Saccharose abzuschätzen. Die Ergebnisse sind abhängig von der Empfindlichkeit der Probanden.

Hernandulcin hat nichtpolare Eigenschaften, die Süßkraft war von dem verwendeten Lösungsmittel abhängig. Hexan-, Aceton- und 40-60%ige Ethanol-extrakte waren süß, während die 20%igen Ethanol-extrakte keinen Süßgeschmack aufwiesen.

Es konnten keine glykosidischen Verbindungen von Hernandulcin im methanolischen Extrakt von *L. dulcis* nachgewiesen werden (Kaneda *et al.*, 1992).

Für bestimmte Süßpflanzen wie *Stevia rebaudiana* Bertoni und *Glycyrrhiza glabra* L. besitzen die Süßhauptbestandteile in ihren reinen Formen (Steviosid und Glycyrrhizin) kommerziell hohe Werte als Zuckerersatzmittel, sogar ihre teilgereinigten Extrakte sind sehr wertvoll (Inglett, 1981; Tanaka, 1982). Dagegen wird die Verwendung des ätherischen Öls aus *L. dulcis* als Süßmittel durch eine Vielzahl von Faktoren beschränkt:

- Das mexikanische Öl enthält einen hohen Camphergehalt, welcher in der Literatur als toxisch eingeordnet ist und einen sehr unangenehmen Geschmack hat. Die Herstellung Campher-freier Öle ist aufwändig.
- Die Öle aus Panama und Nicaragua enthalten zwar so gut wie keinen Campher, besitzen aber einen aromatischen, nicht erfreulichen Geschmack (wir haben diese Öle zum Süßen von bitterer Schokolade ausprobiert). Dieser aromatische Geschmack könnte auf die anderen Bestandteile des Öls zurückgeführt werden, die nicht unbedingt harmlos sein müssen.

4.5 Beurteilung der Hepatotoxizität von *Lippia dulcis*

Der heutzutage weltweit beobachtete ansteigende Konsum von pflanzlichen Arzneimitteln wurde durch mehrere Faktoren verstärkt, u.a. den Gedanken, dass Kräuterprodukte sicher und wirksam sind (Mahady, 2001; Soejarto and Farnsworth, 1989; Farnsworth and Soejarto, 1985). Allerdings gab es im Laufe des vergangenen Jahrzehnts immer wieder Berichte über Gesundheitsprobleme (zum Teil lebensgefährlich) in entwickelten Gesellschaften, die angeblich als Folge der Anwendung traditioneller Arzneimittel entstanden (Chan, 2003; Elvin-Lewis, 2001).

Die meisten Berichte über toxische Wirkungen aufgrund der Verwendung von Phytopharmaka sind mit Hepatotoxizität assoziiert, obwohl Berichte über andere toxische Effekte u.a. Nieren-, Nervensystem-, Blut-, Kreislaufsystem- und Hauterkrankungen, Mutagenität und Karzinogenität auch in medizinischer Literatur veröffentlicht worden sind (Saad *et al.*, 2006).

Wegen ihres einmaligen Stoffwechsels und ihrer Verbindung zu dem Verdauungssystem ist die Leber ein wichtiges Ziel der Arzneimittels- und Xenobiotika-Toxizität (Jaeschke *et al.*,

2002). Humane Leberzellen dienen als menschlich relevante *in vitro* Modellsysteme und sind zum Goldstandard zur Einschätzung des Leberstoffwechsels und der Zytotoxizität von Xenobiotika geworden (LeCluyse *et al.*, 2005). Außerdem bieten Leberzellen eine gute Alternative zu Untersuchungen mit Versuchstieren (Ohno *et al.*, 1998). Die Vorteile der *in vitro* Zellkulturmethoden gegenüber klassischen Methoden (wie langfristige Tierversuche zur Bestimmung der akuten Toxizität eines Medikaments) sind u.a. gut kontrollierbare Variablen, günstige Kosten, Reduktion der Versuchsdauer und eine geringere Anzahl von Tieren zur Vollendung der Experimente (Saad *et al.*, 2006).

Die *in vitro* Zellkulturmethoden sind zur Beurteilung der biologischen Sicherheit pflanzlicher Extrakte als sehr wirksam angenommen worden. Ihre Empfindlichkeit ist gleich oder größer als die von *in vivo* Untersuchungen (Saad *et al.*, 2006). Als Vertreter humaner Leberzellen werden meistens HepG2-Zellen benutzt (Lah *et al.*, 2005; Liguori *et al.*, 2008). HepG2-Zellen zeigen leberspezifische differenzierte Phänotypen in ihren Kulturen (Ding *et al.*, 1994; Lea, 1993), sie behalten einige Enzymfunktionen bei, die an Phase I und II des Stoffwechsels von Xenobiotika beteiligt sind (Tuschl and Schwab, 2004). Aus diesen Gründen wurden in dieser Arbeit HepG2-Zellen zur Untersuchung der *Lippia*-Zytotoxizität gewählt.

Zuerst wurden die HepG2-Zellen mit Ölen, Hernandulcin, ethanolischem Extrakt oder Campher behandelt, anschließend wurde ein MTT-Test durchgeführt. Der MTT-Assay wird benutzt, um die Proliferation und/oder den metabolischen Stand der Zellen nach der Behandlung mit toxischen Substanzen zu bewerten und dient der *in vitro* Auswertung der Biosicherheit der Pflanzenextrakte (Saad *et al.*, 2003 & 2006). Der MTT-Assay schien eine empfindliche Methode zu sein, die eine Linearität über einen breiten Bereich von Zelldichten zeigt (Mosmann, 1983; Edmondson *et al.*, 1988). Mittels dieses modernen Tests können viele Proben schnell und gleichzeitig auf einer 96 Well Mikrotiterplatte bearbeitet und anschließend mit einem Mikrotiterplattenreader gemessen werden (Weyermann *et al.*, 2005).

Es wurde vermutet, dass das Tetrazoliumsalz durch mitochondriale Prozesse in zwei Stellen der Atmungskette reduziert wird (Slater *et al.*, 1963). Später wurde jedoch festgestellt, dass auch mikrosomale und zytosolische Fraktionen an der Entstehung von Formazan beteiligt sind (Berridge and Tan, 1993; Gonzalez and Tarloff, 2001).

In der vorliegenden Arbeit reduzierten die ätherischen Öle und Hernandulcin die Zellviabilität signifikant und konzentrationsabhängig. Die Hemmung der Zellproliferation könnte eventuell auf eine Induktion des Zelltodes zurückgeführt werden (Sivalokanathan *et al.*, 2006). Die Hemmaktivität des *Lippia*-Öls lieferte einen wichtigen Beweis für seine *in vitro* Zytotoxizität.

Campher und der Ethanol-Extrakt zeigten keine negativen Wirkungen auf die Zellproliferation bei allen getesteten Konzentrationen.

Die negativen Werte der Hemmung bei kleinen Konzentrationen können folgendermaßen begründet werden: Chemikalien können in niedrigen Konzentrationen eine Zellproliferation induzieren, dagegen in hohen Dosierungen die DNA-Synthese hemmen und anschließend zu einer Zellbeschädigung durch Nekrose oder Apoptose führen (Tuschl and Schwab, 2004).

Die ätherischen Öle und Hernandulcin induzierten den Zelltod bei HepG2-Zellen auf eine konzentrations- und zeitabhängige Weise. Die Hemmung der Mitochondrienaktivität konnte nach einer 72-stündigen Inkubation ab Konzentrationen von 100 µg/ml für das Öl aus Mexiko, 12,5 µg/ml für Hernandulcin und 25 µg/ml für das Öl aus Panama beobachtet werden.

Wir haben in HepG2-Zellen keine zytotoxischen Wirkungen des Camphers festgestellt, obwohl Campher in der Literatur als toxisch klassifiziert ist. Der Grund dafür: Campher wirkt toxisch auf das Nervensystem (Steinmetz *et al.*, 1980; Gouin and Patel, 1996; Ragucci *et al.*, 2007), was mit dem in dieser Studie verwendeten Lebersystem nicht beurteilt werden kann.

Die maximale therapeutische Dosierung für Campher beträgt 1,43 mg/kg täglich (Leuschner, 1997).

4.5.1 Zytotoxizität und morphologische Änderungen der HepG2-Zelllinien

Morphologie und Zellfunktion sind eng verbundene Zellmerkmale (Wilkening *et al.*, 2003).

Um die morphologischen Änderungen zwischen behandelten und nicht behandelten HepG2-Zellen herauszufinden, wurden mikroskopische Aufnahmen der Zellen gemacht. Lichtmikroskopische Aufnahmen behandelter HepG2-Zellen (Hernandulcin bzw. mexikanisches Öl bei IC₅₀ und 72 Stunden Inkubationsdauer) zeigten morphologische Änderungen, u.a. Strukturänderungen, absinkende Zellzahlen und Zerstörung der Monolayer, welche bei nicht behandelten HepG2-Zellen nicht beobachtet werden konnten.

HepG2-Zellen verloren ihre Kontakte mit den benachbarten Zellen (traten in die frühen Phasen ihres Todesprogramms ein). Die Behandlung mit *Lippia dulcis*-Zubereitungen führte zur Kondensierung des Chromatins.

Fluoreszenz-Mikroskopie zeigte signifikante Form- und Größenänderungen, einige Zellen sind nach der Behandlung von der Kulturplatte abgetrennt worden. HepG2-Zellen zeigten nach der Behandlung die typisch morphologischen Merkmale der Apoptose. Die beobachteten Änderungen waren, u.a. reduziertes Zellvolumen, Kondensierung und Fragmentierung des Chromatins.

Mittels AO/EB-Methode färbten sich die meisten apoptotischen Zellen aufgrund ihrer Membranintegrität grün. Ein Teil der apoptotischen Zellen zeigte unter dem Mikroskop eine hellorange Farbe, was auf einen Verlust der Membranintegrität in den Spätphasen der Apoptose hinwies.

Zur Ermittlung ob die Apoptose an dem Zelltod beteiligt war, wurde ein *DNA-Ladder*-Assay durchgeführt. Dieser Test gilt als Kennzeichen der Zellapoptose (Nagata *et al.*, 2003). Bei diesem Test wird ein apoptotischer Zelltod durch die Entstehung von oligonukleosomalen DNA-Fragmenten (sogenanntes *DNA-Ladder*) bestätigt. Als Positivkontrolle diente Staurosporin, ein mikrobielles antifungal-Alkaloid aus *Streptomyces staurospores* (Ōmura *et al.*, 1977), welches ein großes Interesse aufgrund seiner starken Hemmaktivität gegenüber mehreren Serin/Threonin Proteinkinasen erregte.

In der vorliegenden Studie verursachten die ätherischen Öle und Hernandulcin dosis- und zeitabhängig DNA-Fragmentierung. Das sogenannte *DNA-Ladder* erschien bei den HepG2-Zellen nach einer Behandlung mit hohen Konzentrationen der Öle bzw. des Hernandulcins für 4-72 Stunden (168 und 250 µg/ml Öl aus Mexiko, 79 und 150 µg/ml Öl aus Panama, 50, 67 und 150 µg/ml Hernandulcin). Bei hohen Konzentrationen konnte die Apoptose schon nach 4 Stunden beobachtet werden, dies wies auf eine hohe Empfindlichkeit der Zellen gegenüber den Testsubstanzen hin. In allen Versuchen zeigten die Kontrollzellen keine DNA-Fragmentierung.

Wir schlussfolgerten, dass Hernandulcin und die ätherischen Öle einen apoptotischen Zelltod in den HepG2-Zellen induzierten. Dieses Ergebnis könnte als Grundlage für weitere *in vivo* Untersuchungen dienen.

4.5.2 Identifizierung der Toxizitätsmechanismen der Testsubstanzen auf HepG2-Zellen

Es wurden weitere Experimente durchgeführt, um herauszufinden wie die ätherischen Öle und Hernandulcin auf die HepG2-Zellen toxisch wirken (im Sinne von Apoptose bzw. Nekrose). Für diesen Zweck wurden 3 Parameter gemessen:

- Messung der aus den nekrotischen Zellen ins Medium freigesetzten Laktat-Dehydrogenase.
- Ermittlung der Mitochondrienaktivität durch Spaltung des Tetrazolinrings (MTT-Test).
- Bestimmung der DNA-Fragmentierung (*DNA-Ladder*) auf Agarosegel.

4.5.2.1 LDH-Test

Da die Apoptose bereits nach einer Inkubationszeit von 4 Stunden erkennbar war, wurde diese Dauer für weitere Untersuchungen festgelegt. In dieser Arbeit wurde die LDH-Freisetzung aus den nekrotischen Zellen, nach einer 4-stündigen Inkubation (Weyermann *et al.*, 2005) mit den Testsubstanzen, mit Hilfe des kommerziell verfügbaren *Cytotoxicity Detection Kits* (Roche) bestimmt. Zuverlässigkeit, schnelle Durchführung und die leichte Auswertung sind die wichtigsten Vorteile dieses Tests (Decker and Lohmann-Matthes, 1988).

Da LDH nur aus lysierten Zellen gemessen werden kann, müssten HepG2-Zellen für die Positivkontrolle komplett zerstört werden. Für dieses Ziel wurden die Positivkontroll-Zellen mit 1% Triton X-100 (t-octylphenoxypolyethoxyethanol) behandelt, das sollte die Zellen, nach Angaben des Herstellers, komplett auflösen (entspricht 100% Zytotoxizität).

Triton X-100 ist ein bekanntes nichtionisches Tensid, welches zur Solubilisierung der Membran unter nicht-denaturierenden Bedingungen verwendet wird. Zellmembran-Permeabilität führt zum schnellen Zelltod durch Nekrose (Borenfreund and Puerner, 1985; Jones, 1999).

Unsere *in vitro* Studien zeigten, dass es zu keinen signifikanten Erhöhungen des LDH-Spiegels nach einer 4-stündigen Behandlung der Zellen mit Hernandulcin bzw. den ätherischen Ölen kam. Nur das Öl aus Mexiko konnte in einer Konzentration von 250 µg/ml die extrazelluläre LDH-Konzentration signifikant erhöhen. Das könnte mit einer sekundären Nekrose, aufgrund fehlender Phagozytose *in vitro* begründet werden (Wickenden *et al.*, 2003).

Ein wichtiges Merkmal der apoptotischen Zellen ist die Rigidität ihrer Membran, verursacht durch Ca²⁺-abhängige Transglutaminasen, die vor dem Verlust schädlicher Innenbestandteile der Zelle schützen (Piacentini *et al.*, 1991). Der Verlust der Membranintegrität könnte eventuell in sehr späten Phasen der Apoptose auftreten. Die Beibehaltung der Membranfunktion in den frühen Phasen ist ein charakteristisches Merkmal des apoptotischen Zelltods (Poot *et al.*, 2002).

4.5.2.2 Mitochondrienaktivität

Allgemein kann ein Wirkstoff die Leberfunktion durch drei Mechanismen stören (Pessayre *et al.*, 2007). Eine davon ist die Beeinträchtigung der Mitochondrienfunktion durch Substanzen, die Zellfunktionsstörungen oder den Zelltod verursachen (Pessayre *et al.*, 1999 & 2001).

Beeinträchtigung der Mitochondrienfunktion spielt eine bedeutende Rolle in den späten Phasen des Zelltodes (Pessayre *et al.*, 1999 & 2000). Die Entscheidung, ob Zellen durch

Apoptose oder Nekrose sterben, hängt davon ab, wie schwer die Mitochondrien beschädigt sind, vom ATP-Status und vom Ausmaß der Caspasen-Hemmung. Unter Umständen könnte der Mitochondrienschaden nur zu einer Apoptose führen oder er könnte so schwer sein, dass es zu einer schnellen Nekrose der Zellen kommt (Kaplowitz, 2007).

Der MTT-Test wurde dafür genutzt, die Zytotoxizität der Drogen und ihre Wirkung auf die Mitochondrienaktivität zu untersuchen (Ni *et al.*, 2001).

Bei dem MTT-Test scheint Triton X-100 (1%) einen kompletten Zelltod durch Hemmung der Mitochondrienaktivität zu verursachen (siehe Abb. 3.26).

Die vergleichbaren Ergebnisse beider Untersuchungen (LDH und MTT) im Falle von Triton X-100 können mit seinem Wirkungsmechanismus begründet werden, wobei die Zellmembran-Permeabilisierung zu einem schnellen Zelltod durch Nekrose führen kann (Weyermann *et al.*, 2005).

Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit zeigten, dass die Versuchsubstanzen die Aktivität der Mitochondrien bei den humanen Lebertumorzellen (HepG2) in einer dosisabhängigen Weise reduzierten (Hernandulcin ab 50 µg/ml, Öl aus Panama ab 100 µg/ml, Öl aus Mexiko ab 150 µg/ml).

Die Behandlung der Zellen mit niedrigen Konzentrationen der Testsubstanzen für nur 4 Stunden beeinflusste weder die Mitochondrienfunktionen noch änderte sich die Membrintegrität der Zellen. Bei niedrigen Konzentrationen konnten die toxischen Wirkungen der Testsubstanzen erst nach 72 Stunden Inkubationsdauer beobachtet werden. Da die meisten Zellmembranen nach einer 4-stündigen Behandlung mit hohen Konzentrationen der Testsubstanz intakt blieben, könnte Apoptose als Hauptgrund des Zelltodes benannt werden.

4.6 Beurteilung der Mutagenität der *L. dulcis*-Zubereitungen bzw. -Wirkstoffe

Zur Abschätzung der genotoxischen Eigenschaften von Xenobiotika wurden in den letzten Jahrzehnten als Alternative zu Tierversuchen viele *in vitro* Methoden verwendet (Hasspieler *et al.*, 2006), u.a. bakterielle Systeme (Ames *et al.*, 1973) und isolierte perfundierte Testorgane (wie z.B. Leber, Nieren, Lungen, Gehirn, etc.) (Spielmann *et al.*, 1998). Primäre Zellkulturen der Organe können auch verwendet werden. Ihre Benutzung erlaubt langfristige Studien die wenige Tage und/oder wenige Passagen umfassen. Auch einige Differenzierungsfunktionen können erhalten werden. Eine Kokultivierung mit anderen Zellarten ist auch möglich. Die Verwendung immortalisierter kontinuierlicher Zelllinien bietet

eine leichte Vermehrung und unbegrenztes Teilungsvermögen für die Untersuchung (Pfaller and Gstraunthaler, 1998; Costa, 1998). Verschiedene Säugetierzellen wurden zur Untersuchung der Mechanismen der chemischen Karzinogenität und als Bioassaysysteme zur Beobachtung der Umweltgenotoxine benutzt (Maurici *et al.*, 2005; Ohno *et al.*, 2005; Fernandes *et al.*, 2005; Lambert *et al.*, 2005).

Die Leber ist das am meisten genutzte Organ in den Karzinogenitätsstudien. Die Verwendung der *in vitro* Lebersysteme für die Mutagenitätsstudien ist in den letzten Jahren immer interessanter geworden (Hasspieler *et al.*, 1996; Andreoli *et al.*, 2003; Tähti *et al.*, 2003; O'Brien *et al.*, 2004; Bhogal *et al.*, 2005; Dambach *et al.*, 2005; Farkas and Tannenbaum, 2005; Hayashi, 2005).

Die humane Leberzelllinie HepG2 gilt als effektives und empfindliches Instrument zum schnellen Screening von Umweltproben auf ihre gentoxischen Eigenschaften durch Messung der DNA-Reparaturaktivität (Hasspieler *et al.*, 1995).

Die HepG2-Zellen gelten als reproduzierbares humanes System und behalten viele der morphologischen Eigenschaften der Leberparenchymal-Zellen und einige Funktionen der normalen Leberzellen, u.a. die Synthese und die Sekretion von spezifischen Leberproteinen (Adeli and Sinkevitch, 1990) und die Expression von einigen Xenobiotika-metabolisierenden Enzymen (Dufresne *et al.*, 1993; Valentin-Severin *et al.*, 2003).

Bei der Untersuchung der Chemikalien-Gentoxizität scheinen diese Zellen eine praktische Alternative zur Abschätzung der Gentoxizität zu sein, weil die meisten gentoxischen Verbindungen indirekt mutagen sind (Knasmüller *et al.*, 1998). HepG2-Zellen wurden erfolgreich für die Detektion gentoxischer Karzinogene benutzt, einschließlich solcher Verbindungen, die falsch negative Ergebnisse in den konventionellen *in vitro* Verfahren wie in den bakteriellen Systemen ergaben (Knasmüller *et al.*, 1998; Uhl *et al.*, 2000).

Gentoxischen Substanzen können verschiedenen DNA-Schädigungen verursachen u.a. Mutationen, chromosomale Aberrationen, DNA-Brüche und DNA-Addukte. Von allen bekannten DNA-Läsionen stellen die DNA-Doppelstrangbrüche (DSBs) die fatalsten Fehler dar, weil sie die DNA-Kontinuität stören. DNA-Doppelstrangbrüche können zum Zelltod oder Tumorinduktion führen, wenn sie nicht rechtzeitig erkannt und repariert werden (Pfeiffer, 1998). Bei Erkennung- und Reparatur-Prozessen der DSBs spielen die so genannten Ku-Proteine eine sehr wichtige Rolle, sie wirken als Erkennungssensor der DNA-Läsion (siehe Abschnitt 1.6). Immunologische Assays (wie Western Blot und ELISA), die auf der Messung der Expression der Ku-Proteine basieren, können genaue Informationen über die gentoxischen Eigenschaften der Testsubstanzen liefern. In dieser Arbeit haben wir Western Blot und

ELISA Verfahren verwendet um die Expression der Ku70/86 Proteine in den Kernen behandelter HepG2-Zellen messen zu können.

4.6.1 Bestimmung der Mutagenität mittels ELISA und Western Blot

Das ELISA-Verfahren ist eine empfindliche und schnelle Methode zur Bestimmung der Mutagenität. Mit Western Blot wurden die Ergebnisse der ELISA-Studien verifiziert (wurden die Ku70/86 Proteine als einzelne Banden immunologisch detektiert). Allerdings ist die Western Blot Methode aufwendig, langsam und hat eine größere Fehlerrate als das ELISA-Verfahren. Sowohl ELISA als auch Western Blot zeigten für die IC₅₀-Konzentrationen (wo die Apoptose auf dem Agarosegel sichtbar war) eine Abnahme in der Expression der Ku-Proteine im Vergleich zur Negativkontrolle. Die Expression des Ku86-Proteins nahm nach 16 Stunden und sehr deutlich nach 48 Stunden ab. Die statistische Studie bestätigte die signifikante Abnahme der Ku70/86 Proteine. In Kim *et al.*, 2001 wurde vermutet, dass die Caspase-Kaskade während der Apoptose eine selektive Degradierung der Ku-Proteine induzieren könnte. Es wurde berichtet, dass die Caspase-3 für die Proteolyse der 470-kDa Untereinheit des DNA-PK Komplexes verantwortlich ist (Han *et al.*, 1996) und dass die Abnahme der Ku-Expression in den apoptotischen Zellen mittels Caspase-3-Inhibitoren blockiert werden konnte (Kim *et al.*, 2001).

Bei HepG2-Zellen, die mit niedrigen Konzentrationen der Testsubstanzen (Öle und Hernandulcin) behandelt wurden, wurde eine leichte Zunahme in der Ku86-Expression gemessen (ca. 1,5-fach im Vergleich zu nicht behandelten Zellen). Diese leichte Zunahme der Ku70/86 Expression wurde nach 16 Stunden beobachtet und hielt bis zu 48 Stunden an.

Bei normalen peripheren Blutlymphozyten und Leukämiezelllinien verursachten γ -Strahlen scheinbar eine 3-4-fache Erhöhung der Ku70-Expression (Kumaravel *et al.*, 1998). In unserer Studie war die Zunahme in der Ku-Expression statistisch signifikant, aber sie hatte keine biologische Bedeutung.

Es wurde kein signifikanter Unterschied in der Ku70/86-Expression zwischen den 16 und 48 Stunden Inkubationszeit festgestellt.

Eine tschechische Forschungsgruppe hat zur Untersuchung indirekter Mutagenese auf verschiedene Zelllinienarten (HepG2, V97 und VH10) eine Inkubationsdauer von 30 Minuten verwendet. Sie fanden heraus, dass HepG2 die empfindlichsten Zellen sind, weil sie Breitband-Metabolismusaktivitäten besitzen (Robichová *et al.*, 2004; Rueff *et al.*, 1996; Glatt *et al.*, 1990).

Mutagenesestudien mittels bakterieller Systeme (*Salmonella typhimurium* Stamm TM677) in An- und Abwesenheit des metabolischen Aktivierungssystems S9, isoliert aus Aroclor 1254-induzierter Rattenleber, zeigten keine Mutagenität für das synthetische Hernandulcin (Compadre *et al.*, 1987). Im Rahmen der Sicherheitsvorprüfungen wurde festgestellt, dass das 3-Desmethyl-Derivat von Hernandulcin Mutationen beim *Salmonella typhimurium* Stamm TM677 auslöst (Compadre *et al.*, 1988).

Allerdings wissen wir nicht, ob die nicht gentoxischen Eigenschaften des Hernandulcins auch für seine Metaboliten gelten.

Der Ames-Test auf Salmonellen/Mikrosomen (Stämme TA97a, TA98, TA100 und TA102) ohne und mit Zugabe des extrinsischen metabolischen Aktivierungssystem (S9) zeigte, dass (+/-)-Campher nicht mutagen ist.

Im Gegensatz zu den mexikanischen *Lippia*-Pflanzen enthalten die Varietäten aus Puerto Rico kein Limonen, für das eine krebserregende Wirkung bei den männlichen Ratten beobachtet wurde (De Vincenzi and Mancini, 1997). Die gentoxische Wirkung auf Ratten kann man aber nicht auf Menschen übertragen, ein bekanntes Beispiel dafür ist das Saccharin: nach mehr als 100 Jahren Verwendung, bestätigen Wissenschaftler der ganzen Welt, dass Saccharin für die Menschen sicher ist, obwohl es Krebs bei Ratten verursachen kann (Rice *et al.*, 1999).

Im Allgemeinen aber nicht immer stimmen die Ergebnisse der Säugetierzellen-Untersuchungen mit denen von den bakteriellen Systemen überein (Lah *et al.*, 2005). Die mittels DNA-Repair-Assay und Ames-Assay gewonnenen negativen Daten unterstützen die Ansicht, das Hernandulcin keine Gefahr für die menschliche Gesundheit darstellt.

4.7 Die pharmakologischen Eigenschaften der Pflanze

Das zunehmende Bewusstsein für die Gesundheit und die Umwelt führten dazu, dass die Menschen die pflanzlichen Arzneistoffe nicht vergaßen. Ein global steigender Bedarf an pflanzlichen Arzneimitteln wird beobachtet. Dieser Trend wurde auch von der konventionellen Medizin akzeptiert, weil man die Vorteile der traditionellen Medizin vieler Jahrhunderte nicht ignorieren konnte. Allerdings kann man sich in der modernen Medizin nicht auf traditionelle Anwendungen verlassen. Um den pflanzlichen Arzneimitteln einen „*real-drug*“ Status zu geben, müssen viele wissenschaftliche Bemühungen unternommen werden. Nur so kann sich die Phytotherapie zu einer rationalen Phytotherapie, als Teil einer naturwissenschaftlich orientierten Medizin, entwickeln (Zaruelo and Crespo, 2002).

In der vorliegenden Arbeit wurden die pharmakologischen Merkmale von *Lippia dulcis* untersucht, um die Verwendung der Pflanze in der Volksmedizin auf eine wissenschaftliche Basis zu stellen bzw. deren ethnopharmakologische Anwendung zu überprüfen.

4.7.1 Der ethanolische Extrakt von *L. dulcis* wirkt antientzündlich

Die antiinflammatorischen Wirkungen der Versuchsubstanzen wurden an Hand der Verminderung der Elastase-Aktivität (EC 3.4.21.37) untersucht.

Die leukozytäre Elastase ist eine Endopeptidase und gehört zur Familie der Serinproteasen. Elastase wird von aktivierten humanen neutrophilen Granulozyten freigesetzt und kann viele Biomakromoleküle, u.a. Kollagen und das Elastin abbauen. Sie wird als Größenstandard für entzündliche Krankheiten betrachtet (Braga *et al.*, 2006).

Die Elastase ist am Krankheitsgeschehen verschiedener entzündlicher Krankheiten beteiligt, u.a. Lungenemphysem, zystische Fibrose, Chronisch obstruktive Lungenerkrankung (COPD), entzündliche Gelenkerkrankungen und rheumatoide Arthritis (Werner *et al.*, 1993).

In dieser Arbeit wurden das ätherische Öl, Hernandulcin und der ethanolische Extrakt von *L. dulcis* getestet. Für den ethanolischen Extrakt konnte eine Hemmung mit einem relevanten IC₅₀-Wert von 10,7 µg/ml ermittelt werden. Dagegen weisen das Öl und Hernandulcin keine Aktivität auf. Das deutet darauf hin, dass die Hemmung der Elastase durch den ethanolischen Extrakt nicht auf die Terpene im ätherischen Öl zurückzuführen ist, sondern durch andere Naturstoffe (z.B. Flavonoide) hervorgerufen wird.

4.7.1.1 Verbindungen, die die Elastaseaktivität beeinflussen könnten:

- Phenolverbindungen: in der Literatur wurden 40 verschiedene Phenolverbindungen auf ihre Wirkung auf die Elastase-Aktivität untersucht, dabei wurde festgestellt, dass eine spezifische Catechol-Struktur für die Elastase-hemmende Aktivität erforderlich ist (Melzig *et al.*, 2001). In Ono *et al.* (2006) wurde erwähnt, dass die Pflanze das Flavonoid Sakuranetin enthält, welches in einer Konzentration von 100 µM die Freisetzung der Elastase hemmt (Hernández *et al.*, 2007).

L. dulcis verfügt über Phenylethanoid-Glykoside: Acteosid und Isoacteosid (Kaneda *et al.*, 1992; Abe *et al.*, 2002). In der Arbeit von Boje wurde erwähnt, dass das Isoacteosid im Gegensatz zu Acteosid eine hemmende Wirkung auf die Elastase-Aktivität bei einer Konzentration von 179 µg/ml (286 µM) zeigt (Boje *et al.*, 2003).

- Iridoide Verbindungen, die auch in *L. dulcis* anwesend sind, wurden bisher nicht untersucht.

In tierexperimentellen Studien (an männlichen Wistar-Ratten und männlichen BALB Mäusen) konnte für den ethanolischen Extrakt (400 mg/kg), aber nicht für den Hexanextrakt, eine hemmende Wirkung auf den akuten inflammatorischen Prozess (Carrageen-induzierte Ödeme in Rattenpfoten) nachgewiesen werden (Pérez *et al.*, 2005). Die antientzündliche Wirkung des ethanolischen Extrakts von *L. dulcis* war signifikant und ähnlich zur Wirkung von 8 mg/kg Indometacin. Allerdings wurde nicht geklärt, welche Bestandteile des ethanolischen Extrakts für die antientzündliche Aktivität verantwortlich sind.

Die Metabolismusreaktionen werden auch hier außer Acht gelassen, deshalb ist es auch nicht klar, ob bei Menschen die Metabolismusprodukte der Inhaltsstoffe der Extrakte einen Einfluss auf die Elastase haben.

Die Hemmung der Elastaseaktivität mittels ethanolischem Extrakt von *L. dulcis* könnte erklären, warum diese Pflanze als Antiphlogistikum in der traditionellen Medizin verwendet wurde.

4.7.2 Die spasmolytische Wirkung der ätherischen Öle

Zum Beginn dieser Arbeit gab es in der Literatur keine verfügbaren pharmakologischen Daten über die ätherischen Öle, deswegen ermittelten wir die putativen antispasmodischen Wirkungen der Öle zur Behandlung von Bronchitis und Husten. Die spasmolytischen Effekte der ätherischen Öle auf die glatten Muskeln (Schweinebronchien und Rattentrachea) wurden untersucht.

Die Verwendung von verschiedenen Spasmogenen, die die Muskelkontraktion durch verschiedene Mechanismen verursachen bietet pharmakologisch-basierte Informationen zu spasmolytischen Eigenschaften.

I. Das ätherische Öl aus Mexiko zeigt eine spasmolytische Wirkung auf Bronchialsegmente vom Schwein

Bronchialsegmente vom Schwein wurden mittels verschiedener Agonisten (Carbachol und Histamin) kontrahiert. Unter Verwendung von Atropin (blockiert die Carbachol-induzierten Kontraktionen) und Mepyramin (blockiert die Histamin-induzierten Kontraktionen) haben wir festgestellt, dass M3-Muskarinrezeptoren und H1-Histaminrezeptoren in dem Kontraktionsverhalten dieser Gewebe involviert sind. Die in dieser Arbeit nachgewiesene Affinität des Atropins gegen Carbachol entspricht den antagonistischen Eigenschaften gegen Carbachol in Kaninchenbronchien (Fleisch and Calkins, 1976) und gegen Acetylcholin in

Schweinemymetrium (Kitazawa *et al.*, 1999). Die Affinität des Mepyramins stimmt mit dem Antagonist gegen Histamin in der Schweine-Trachea überein (Driver and Mustafa, 1987).

Die Ergebnisse (siehe Abb. 3.31 & 3.32) zeigten, dass das Öl aus Mexiko die maximale Kontraktion von Carbachol und Histamin mit nur leichter oder ohne Rechtsverschiebung der Wirkungskurven reduzierte. Das Öl wirkte als nicht kompetitiver Antagonist im Kontraktionsverhalten von Carbachol und Histamin. Es ist schwer zu sagen, ob die Blockierungsaktivitäten des ätherischen Öls durch allosterische oder orthosterische Inhibition verursacht worden sind (Kenakin, 2006).

Interessanterweise war die Histamin-hemmende Wirkung nicht nur mit Abnahme des akuten Bronchospasmus verbunden, sondern auch mit einer Hemmung des Hustens (Kreutner *et al.*, 2000).

Im Allgemeinen vermitteln die H₁-Rezeptoren, die in den Atemwegen der meisten Spezies vorkommen, eine Bronchokontraktion. Antagonisten der H₁-Rezeptoren erleichtern den bronchialen Tonus und verhindern einen Histamin-induzierten Bronchospasmus (Eiser, 1983). Die Kombination von anticholinergen und antihistaminergen Aktivitäten des ätherischen Öls von *L. dulcis* könnte der Grund für die Jahrhunderte lange traditionelle Verwendung der Pflanze in Mittelamerika sein. Wegen seines Süßgeschmacks sollte das ätherische Öl bei Kindern und Tieren eine gute Compliance aufweist, die eher von bitterem Geschmack abgestoßen werden.

Andere chemische Verbindungen, die in den ätherischen Ölen verschiedener *Lippia*-Arten identifiziert wurden, zeigten signifikante spasmolytische Aktivitäten: *Lippia chamissonis* D. Dietr., *L. grata* Schau., *L. javanica* (N.L. Burm.) Spreng. und *L. sidoides* Cham. (Souza Brito and Souza Brito, 1993; Hutchings and van Staden, 1994). *L. alba* (Mill.) N.E. Brown zeigte eine Abnahme des Darmtonus (Klueger *et al.*, 1997).

Die gewonnenen pharmakologischen Ergebnisse unterstützen die Verwendung von *Lippia dulcis* als traditionelle Arznei für Krankheiten, die mit Bronchospasmus bei Husten und Bronchitis einhergehen.

II. Das ätherische Öl aus Nicaragua zeigte eine leichte spasmolytische Wirkung auf Rattentrachea

Die spasmolytische Aktivität des ätherischen Öls (aus Mexiko und Nicaragua) wurde an isolierten Tracheaglattmuskeln untersucht. Alternative Präparate, die den Einfluss der Knorpelgewebe minimieren, sind bei Reiter und Brandt (1985) bevorzugt. Die Trachea wurde mit BaCl₂ als Agonist kontrahiert, BaCl₂ wirkte durch Blockierung der K⁺-Kanäle in den

glatten Muskelzellen (Emine *et al.*, 1998; Thirstrup *et al.*, 1997). Das Blockieren der Kaliumleitfähigkeit erhöhte den transmembranen Ca^{2+} -Einstrom als Folge der Zellmembrandepolarisation (Corompt *et al.*, 1998), das führt zu einer Kontraktion in den glatten Muskelzellen (Huang, 1995). Die Anwesenheit von spannungsabhängigen K^+ -Kanälen, Ca^{2+} -abhängigen K^+ -Kanälen und ATP-abhängigen K^+ -Kanälen in den glatten Muskeln der Trachea wurde von Kotlikoff *et al.* (1990), Marthan *et al.* (1989) und Black *et al.* (1990) berichtet. Ba^{2+} ist ein relativ unselektives *Blocking Agent*, effektiv für die ATP-abhängigen K^+ -Kanäle in submillimolaren Konzentrationen (Standen *et al.*, 1989; Quast, 1993) und in höheren Konzentrationen für die spannungs- bzw. Ca^{2+} -abhängigen K^+ -Kanäle in einigen Zellarten (Rudy, 1988).

In dieser Studie verursachte BaCl_2 eine konzentrationsabhängige Kontraktion in der Rattentrachea. Die spasmolytischen Wirkungen der ätherischen Öle wurden durch Modifizierung der Konzentrations-Wirkungskurve (erstellt mit BaCl_2) ermittelt. Das Öl aus Mexiko zeigte keine Wirkung auf die Konzentrations-Wirkungskurve des BaCl_2 , d.h. es wurde nach Zugabe des ätherischen Öls keine Verminderung der durch Bariumchlorid ausgelösten Kontraktionen beobachtet.

Im Gegensatz dazu zeigte das Öl aus Nicaragua in den Untersuchungen eine leichte spasmolytische Aktivität. Das Öl aus Nicaragua verursachte auch eine leichte Rechtsverschiebung der Konzentrations-Wirkungskurve.

Der Unterschied in der Wirkung zwischen den beiden Ölen könnte teilweise durch die verschiedenen chemischen Zusammensetzungen erklärt werden.

Eine Studie über die spasmolytischen Effekte von Campher, Myrcen und Caryophyllen auf die Acetylcholin- bzw. BaCl_2 -induzierten Kontraktionen in einem isolierten Rattenduodenum zeigte, das Campher keinen Einfluss auf die Wirkung des Agonisten (Acetylcholin oder BaCl_2) hat. Dagegen zeigte Caryophyllen eine spasmolytische Aktivität in beiden Fällen ($\text{IC}_{50}=9\pm 2,14 \mu\text{M}$ gegen ACh, $\text{IC}_{50}=1,3\pm 0,25 \mu\text{M}$ gegen BaCl_2). Myrcen hatte nur auf die Acetylcholin induzierte Kontraktion eine Aktivität mit einer IC_{50} von $5,48\pm 1,08 \mu\text{M}$ (Zaruelo and Crespo, 2002).

Laut Souto-Bachiller *et al.* (1997) enthielt das Öl aus Mexico 1,45% Myrcen, 3% β -trans-Caryophyllen und 53% Campher, während das Öl aus Puerto Rico keine Myrcen, Campher und nur 0,75% trans-Caryophyllen aufwies.

III. Das ätherische Öl aus Mexiko erhöhte leicht die mukoziliäre Clearance

Die mukoziliäre Clearance (MCC) ist eine der wichtigsten Abwehrmechanismen des Respirationstrakts (Wanner *et al.*, 1996). Ihre Beeinträchtigung ist ein charakteristisches Merkmal der chronischen Atemwegserkrankungen wie z.B. Asthma (Del Donno *et al.*, 2000). Der mukoziliäre Apparat beseitigt die potentiell aggressiven Partikel und Substanzen aus den Atemwegen mittels ziliaren Transports oder mittels Husten und Niesen in Fällen von Schleimüberproduktion wie z.B. allergische Rhinitis, chronische Bronchitis, zystische Fibrose und Asthma bronchiale (Macchione *et al.*, 1995).

Bei vielen Atemwegserkrankungen sind die ziliare Aktivität und die Trachealkontraktion wichtig. Deshalb wurde in dieser Arbeit die MCC der Trachea *in vivo* untersucht.

Das ätherische Öl aus Mexiko verursachte eine leichte Erhöhung der MCC.

Diese Studie zeigte, dass das Öl aus Mexiko (enthält Campher) die Agonist-Antwort hemmt, die bestimmte Rezeptoren (M3 und H1) stimulieren. Dieses Öl ist aber inaktiv gegen Agonisten, die durch nicht-spezifische Rezeptoren wirken.

Darüber hinaus bieten diese Untersuchungen eine wissenschaftliche Basis für die ethnobotanische Verwendung von *L. dulcis* Trevir bei respiratorischen Erkrankungen. Das Vorkommen von Campher, welches als Expektorans dient (Inoue and Takeuchi, 1969), unterstützt die antispasmodische Aktivität.

5. AUSBLICK

Anhand der gewonnenen Ergebnisse und der Probleme, denen wir begegneten, schlagen wir für die Zukunft folgende Arbeiten vor:

- Durch Hybridisierung von verschiedenen Lippiastämmen könnten neue Lippiaarten entstehen, die verbesserte Öleigenschaften besitzen, wie z.B. größere Ölausbeute oder erhöhte Hernandulcin-Konzentrationen etc. Solche Einkreuzungsstudien könnten auch für die Beseitigung von unerwünschten Chemotypen eingesetzt werden.
- Mit Hilfe der chemischen Synthese könnte die Struktur von Hernandulcin modifiziert werden um seine Löslichkeit in Wasser zu verbessern, seine Thermostabilität zu erhöhen oder seinen Geschmack angenehmer zu machen.
- In dieser Arbeit haben wir die Zytotoxizität der Testsubstanzen (ätherische Öle, Extrakte und Hernandulcin) *in vitro* mittels humaner Zellsysteme untersucht. Die *in vitro* Biosysteme stellen nur den ersten Schritt des Evaluierungsverfahrens dar und können nicht vollständig den Effekt *in vivo* reflektieren. Außerdem sind die *in vitro* Systeme nur zur Ermittlung der kurzfristigen Effekte geeignet (Laut USEPA *United States Environmental Protection Agency*, 2005). Die toxischen Konzentrationen einer Substanz *in vivo* können massiv von denen *in vitro* abweichen. In der Regel sind die *in vivo* Daten anerkannter unter den Wissenschaftlern als die aus *in vitro* Versuchen stammenden. Deswegen empfehlen wir die Durchführung weiterer *in vivo* Untersuchungen um die Wirkung der Pflanze auf die menschliche Gesundheit genau zu bestimmen.
- Die negativen Ergebnisse für Hernandulcin mittels DNA-Repair-Assay und Ames-Test liefern eine kräftige Vorhersage für die sichere Verwendung von Hernandulcin am Menschen. Gesundheitsschädliche oder krebserregende Wirkungen sind für Hernandulcin eher unwahrscheinlich. Um das aber zu bestätigen muss Hernandulcin am Menschen getestet werden. Erst dann kann Hernandulcin in der Lebensmittel- oder Pharmaindustrie verwendet werden.
- In der Literatur gibt es keine pharmakokinetischen Studien (Serumspiegel, Konzentration in den Geweben, Bioverfügbarkeit etc.) über Hernandulcin oder die ätherischen Öle aus den verschiedenen Lippiaarten. Die Durchführung solcher Studien

an verschiedenen Versuchstieren und an Menschen ist für die therapeutische Anwendung eine absolute Voraussetzung.

- Es gibt bisher keine pharmakologischen Studien, die eine wissenschaftliche Erklärung für die volksmedizinische Nutzung von *L. dulcis* zur Behandlung von gastrointestinalen Erkrankungen (Kolik) liefert. Die spasmolytischen Eigenschaften der Pflanze sollten an der glatten Darmmuskulatur in Anwesenheit von Spasmogenen wie z.B. Acetylcholin, Histamin, Serotonin, BaCl₂ oder Nicotin untersucht werden.

6. ZUSAMMENFASSUNG

Die Gattung *Lippia* (Verbenaceae) umfasst ca. 200 Arten von Kräutern und Sträuchern, die in Süd- und Mittelamerika beheimatet sind. Die meisten Pflanzen dieser Gattung sind aromatisch, enthalten ätherische Öle und werden traditionell als gastrointestinale und respiratorische Heilmittel genutzt. *Lippia dulcis* Trev. ist ein Mitglied dieser Gattung und enthält das süß schmeckende Sesquiterpen (Bisabolan-Typ) (+)-Hernandulcin, welches um ein Vielfaches süßer als herkömmlicher Zucker ist. Es könnte der Prototyp einer neuen Generation von Süßungsmitteln sein. In der vorliegenden Arbeit wurden *L. dulcis* Pflanzen aus verschiedenen Regionen (Mexiko, Nicaragua und Panama) morphologisch, phytochemisch und pharmakologisch charakterisiert.

Die morphologischen Merkmale der Pflanze wurden mit Hilfe der Lichtmikroskopie untersucht. Die meisten Sekretionsstrukturen (Drüsenschuppen und Drüsenhaare) dieser Pflanze befinden sich auf den Blüten und Blättern. Das ätherische Öl wurde aus der Pflanze mittels Wasserdampfdestillation gewonnen. Die Hauptbestandteile des ätherischen Öls (Campher und Hernandulcin) wurden mittels HPLC und GC quantitativ analysiert. Trotz der gleichen morphologischen Eigenschaften der Pflanzen zeigten die Pflanzen Unterschiede in der Öl-Ausbeute und -Zusammensetzung: Während die mexikanischen Pflanzen überwiegend Campher enthalten, weisen die Pflanzen aus Nicaragua und Panama so gut wie keinen Campher auf. Die Zytotoxizität des ethanolischen Extrakts, der ätherischen Öle, des Hernandulcins und des Camphers wurden an den Leberkrebszellen HepG2 getestet. Die IC₅₀-Werte wurden bestimmt. Die ätherischen Öle und Hernandulcin zeigten eine konzentrations- und zeitabhängige Hemmung auf die Proliferation der HepG2-Zellen. Die Reduzierung der Zellzahlen und die Zerstörung der Monolayer der mit o.g. Substanzen (IC₅₀) behandelten Zellen konnte mittels Hämatoxylin-Färbung beobachtet werden.

Der Ethanol-Extrakt und der Campher (bis zu einer Konzentration von 250 µg/ml) zeigten keine Wirkungen auf die Zellproliferation.

Der genaue Mechanismus des Zelltods durch ätherische Öle und Hernandulcin wurde mittels AO/EB-Färbung, DNA-Leiter-Test, LDH-Assay und Messung der mitochondrialen Aktivität ermittelt. Mittels AO/EB Färbung zeigten Zellen, die mit hohen Substanzkonzentrationen behandelt wurden, die typischen morphologischen Merkmale der Apoptose (Kondensierung und Fragmentierung des Chromatins). Die ätherischen Öle und Hernandulcin verursachten eine dosis- und zeitabhängige DNA-Fragmentierung, eine DNA-Leiter konnte man nach der Behandlung mit hohen Konzentrationen beobachten. Beim LDH-Assay kam es zu keiner

signifikanten LDH-Freisetzung aus den nekrotischen Zellen. Die Versuchsubstanzen reduzierten die mitochondriale Aktivität der Zellen in einer dosisabhängigen Weise.

Die Testsubstanzen zeigten in hohen Konzentrationen Zytotoxizität und induzierten hauptsächlich Apoptose in HepG2-Zellen.

Die Mutagenität des Öls und des Hernandulcins wurde *in vitro* auf HepG2-Zellen untersucht. Die Bestimmung der Ku-Protein-Expression nach der Behandlung mit der Testsubstanz wurde immunologisch mittels ELISA und Western Blot durchgeführt (Ku-Proteine spielen eine wichtige Rolle bei der Reparatur der DNA-Läsionen). Unsere Untersuchungen ergaben keinen eindeutigen Hinweis auf Mutagenität durch die Pflanzensubstanzen.

Zur Beurteilung der traditionellen Verwendung von *L. dulcis* gegen Husten, wurden in dieser Arbeit die pharmakologischen Merkmale der Pflanze *in vitro* untersucht. Die antiinflammatorische Wirkung wurde an Hand der Verminderung der Elastase-Aktivität (EC 3.4.21.37) untersucht. Eine deutliche Beeinflussung der Aktivität der humanen neutrophilen Elastase durch den ethanolischen Extrakt von *L. dulcis* konnte festgestellt werden. Die spasmolytischen Effekte der ätherischen Öle wurden an isolierten glatten Muskeln (Schweinebronchien und Rattentrachea) *in vitro* untersucht. Das ätherische Öl aus Mexiko zeigt eine spasmolytische Wirkung auf schweinishche Bronchialsegmente gegen Carbachol und Histamin und verursachte eine leichte Erhöhung in der mukoziliären Clearance MCC in der Rattentrachea. Das Öl wirkte als nicht kompetitiver Antagonist. Dagegen zeigte das Öl aus Mexiko keine Verminderung der BaCl₂-induzierten Kontraktionen.

7. SUMMARY

The genus *Lippia* (Verbenaceae) comprises approximately 200 species of herbs and shrubs indigenous to southern and central America. Most of *Lippia* species are aromatic (contain essential oils) and are traditionally used as gastrointestinal and respiratory remedies.

Lippia dulcis Trev. is a member of this genus and contains the sweet bisabolane-type sesquiterpene (+)-hernandulcin, which was judged to be more than three orders of magnitude sweeter than sucrose. It might be used as a prototype for a new generation of “high-intensity” sweeteners.

In this work, *L. dulcis* plants from different regions (Mexico, Nicaragua and Panama) were characterized morphologically, phytochemically and pharmacologically.

The morphological investigations by light microscope showed that secretory glands and secretory trichomes were more abundant on flowers and leaves of these plants. The essential oil was isolated from the plants by steam distillation and its main components (camphor and hernandulcin) were quantitatively analyzed using HPLC and gas chromatography.

These populations differed in essential oil yield and composition in spite of their similarity in morphology. The Mexican plants contain mainly camphor, whereas the plants from Nicaragua and Panama contain undetectable amounts of camphor.

The cytotoxicity of the ethanolic extract, essential oils, hernandulcin and camphor was examined in human hepatocellular carcinoma cell line (HepG2) and their IC₅₀ values were determined. The essential oils and hernandulcin had antiproliferative activity on HepG2 cells in a concentration- and time-dependent manner. Reduction of HepG2 cell populations and destruction of monolayer were observed in cells stained with hematoxylin after treatment with the above mentioned substances (IC₅₀).

However, the ethanolic extract and camphor (till a concentration of 250 µg/ml) exhibited no significant effects on cell proliferation.

The mechanism of cell death by essential oils and hernandulcin was ascertained using AO/EB double staining, DNA ladder assay, LDH assay and the measurement of mitochondrial activity. After AO/EB staining, cells treated with high concentration of substances showed typical morphologic features of apoptosis (condensed and fragmented chromatin).

Essential oils and hernandulcin induced ladder-like DNA fragmentation in cells in dose- and time-dependent manners. These DNA ladders appeared in cells following exposure to higher concentrations of substances. LDH assay revealed no significant increase in LDH leakage from necrotic cells. The tested substances reduced the mitochondrial activity of treated cells

in dose-dependent manner. These test substances showed cytotoxicity at higher concentrations and induced mainly apoptosis in HepG2 cells.

The mutagenicity of essential oils and hernandulcin was evaluated *in vitro* in HepG2 cells. Expression of Ku proteins in the cells after exposure to test substances was assessed immunologically by ELISA and western Blot analysis (Ku proteins play distinct role in the repair of DNA lesions). The results of this assay indicated no evidence of mutagenicity for the tested substances.

In this work, the pharmacological features of *L. dulcis* were investigated *in vitro* in order to evaluate its traditional uses against respiratory tract disorders.

The anti-inflammatory activity was assessed by the inhibition of human neutrophil elastase (EC 3.4.21.37). Results indicated that the activity of elastase is affected only by the ethanolic extract.

The antispasmodic effects of essential oils were investigated *in vitro* using isolated smooth muscle (porcine bronchia and rat trachea). The mexican essential oil showed antispasmodic activity on bronchial segments of pigs against carbachol and histamine and caused a slight increase in mucociliary clearance MCC in rat trachea. Thus, the mexican oil behaves just like a noncompetitive antagonist. However, the mexican oil don't inhibited the contractions of the trachea that were induced by barium ions.

8. ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

AO/EB	Acridinorange/Ethidiumbromid
APS	Ammoniumpersulfat
Aqua bidest.	bidestilliertes Wasser
ATP	Adenosintriphosphat
BaCl ₂	Bariumchlorid
BCA	2,2'-Bicinchoninsäure
bidest.	bidestilliert
bp	Basenpaar(e)
BSA	Rinderserumalbumin (<i>bovine serum albumin</i>)
CHCl ₃	Chloroform
CH ₂ Cl ₂	Dichlormethan
DC	Dünnschichtchromatographie
dest.	destilliert
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DSB	Doppelstrangbrüchen
DSMZ	Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH
DTT	Dithiothreitol
Elastase	humane neutrophile Elastase (EC 3.4.21.37)
EtOAc	Ethylacetat
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
E_{\max}	Maximaler beobachteter Effekt
ELISA	Enzyme Linked Immunosorbent Assay
EtOH	Ethanol
Et ₂ O	Diethylether
FCS	Fetales Kälberserum
g	Erdbeschleunigung
GC	Gaschromatographie
HPLC	Hochdruckflüssigkeitschromatographie
HRP	<i>horseradish peroxidase</i> (Meerrettich Peroxidase)
IC ₅₀	Konzentration, die 50% Hemmung hervorruft (<i>inhibitory concentration</i>)
ID	Innendurchmesser
IgG	Immunglobulin G
k.A.	keine Angaben
kb	Kilobasenpaare
kDa	Kilo Dalton
KHS	Krebs-Henseleit-solution
Konz.	Konzentration
LDH	Laktatdehydrogenase

MeCN	Acetonitril
MeOH	Methanol
Mio.	Million
MP	Mobile Phase
MTT	3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-Diphenyltetrazoliumbromid
<i>n</i>	Stichprobenumfang (Anzahl der Experimente)
NAD ⁺	Nicotinsäureamid-Adenin-Dinukleotid
NHEJ	<i>Non-homologous end joining</i>
OD	optische Dichte
p.o.	per oral
PAGE	Polyacrylamidgelelektrophorese
PBS	Phosphat-gepufferte Natriumchloridlösung (<i>phosphate buffered saline</i>)
PE	Petrolether
PEG	Polyethylenglykol
<i>R</i>	Spannweite (<i>range</i>)
<i>P</i>	Irrtumswahrscheinlichkeit
RNA	Ribonukleinsäure
Rt	Retentionszeit (Retention Time)
RNase	Ribonuklease
Rpm	Umdrehungen pro Minute (<i>revolutions per minute</i>)
RT	Raumtemperatur
SC	Säulenchromatographie
<i>SD</i>	Standardabweichung (<i>standard deviation</i>)
SDS	Natriumdodecylsulfat
<i>SEM</i>	Standardfehler des Mittelwertes
Std.	Stunden
TAE	Tris / Acetat / EDTA
TBS	Tris <i>buffered saline</i>
TE	Tris / EDTA
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethyldiamin
Tris	Tris-(hydroxymethyl-)aminomethan
U	<i>Unit</i> (μmol/min)
vs.	Versus

9. ABBILDUNGSVERZEICHNIS

- Abb. 1.1 Erste Darstellung von *Lippia dulcis*
- Abb. 1.2 *Lippia dulcis* (Gewächshauskultur der FU-Berlin)
- Abb. 1.3 Landkarte von Mittel- und Südamerika
- Abb. 1.4 Strukturformel von Epihernandulcin und 4 β -Hydroxyhernandulcin
- Abb. 1.5 Chemische Struktur von (6S,1'S) Hernandulcin
- Abb. 1.6 Die morphologischen Unterschiede zwischen Apoptose und Nekrose
- Abb. 1.7 Caspase-Kaskaden
- Abb. 1.8 Reparatur der DNA-Doppelstrangbrüche mittels des NHEJ-Systems
- Abb. 2.1 Prinzip des MTT-Tests
- Abb. 2.2 Prinzip des LDH-Tests
- Abb. 2.3 Quantifizierung der Ku-Proteine mittels ELISA-Platten
- Abb. 2.4 Prinzip der Immunodetektion von Proteinen mittels Western Blot
- Abb. 2.5 Aufbau des Sandwich-Blots (Mini Trans-Blot®)
- Abb. 2.6 Das Quantifizierungsprogramm *EasyWin 32*
- Abb. 2.7 Präparation der Rattentrachea
- Abb. 2.8 Untersuchung der mukoziliären Transportgeschwindigkeit an Versuchsratten
- Abb. 3.1 Unter- und Oberseite eines Blattes
- Abb. 3.2 Mikroskopische Flächenansicht der Blätter
- Abb. 3.3 Kegelhaar von Blättern & Diacytische Spaltöffnungen
- Abb. 3.4 Drüenschuppen der Blätter
- Abb. 3.5 Querschnitt eines Blattes mit dem Leitbündel im Bereich der Mittelrippe und der Blattspreite
- Abb. 3.6 Blütenstände von *L. dulcis*
- Abb. 3.7 Bau der Blütenstände
- Abb. 3.8 Die mikroskopischen Merkmale der Blüten von *L. dulcis*
- Abb. 3.9 Morphologische Merkmale der Sprossachse
- Abb. 3.10 Querschnitt eines verholzten Stängels & eines jungen Stängels
- Abb. 3.11 Querschnitt der Wurzel von *L. dulcis*
- Abb. 3.12 Das Aussehen der Wurzel der *L. dulcis*
- Abb. 3.13 Zunahme des extrahierten Ölvolumens mit der Destillationsdauer
- Abb. 3.14 DC-Analyse des ätherischen Öls und des ethanolischen Extrakts von *L. dulcis*
- Abb. 3.15 GC-Analyse des isolierten Hernandulcins
- Abb. 3.16 Gaschromatogramme von *Lippia dulcis* aus Mexiko, Panama und aus Nicaragua
- Abb. 3.17 HPLC-Kalibriergeraden von Campher und Hernandulcin
- Abb. 3.18 HPLC-Chromatogramme von *L. dulcis* aus Nicaragua und aus Mexiko
- Abb. 3.19 Proliferationshemmung der HepG2-Zellen durch steigende Konzentrationen der Testsubstanz
- Abb. 3.20 Lichtmikroskopische Bilder Hämatoxylin-gefärbter HepG2-Zellen

- Abb. 3.21 Apoptotische DNA-Leiter in HepG2-Zellen
- Abb. 3.22 Fluoreszenzmikroskopische Bilder der AO/EB Zellfärbung
- Abb. 3.23 Ermittlung der optimalen Zahl von HepG2-Zellen für den LDH-Test
- Abb. 3.24 LDH-Freisetzung in behandelten HepG2-Zellen
- Abb. 3.25 Bestimmung der optimalen Zellzahl für einen 4-stündigen MTT-Test
- Abb. 3.26 Zytotoxizität der Öle und des Hernandulcins mittels MTT-Test
- Abb. 3.27 Herstellung einer BSA-Eichgerade mit Hilfe des BCA-Protein-Assay Kits
- Abb. 3.28 Analysieren der Zellkernextrakte mittels SDS-PAGE
- Abb. 3.29 Bestimmung der Ku86-Expression in den behandelten HepG2-Zellen mittels Western Blot
- Abb. 3.30 Prozentuale Hemmung der Elastaseaktivität bei unterschiedlichen Konzentrationen des ethanolischen Extrakts aus *Lippia dulcis*
- Abb. 3.31 Carbachol-induzierte Kontraktion in Schweinebronchien in An- und Abwesenheit des Antagonisten: Atropin und ätherisches Öl
- Abb. 3.32 Histamin-induzierte Kontraktion in Schweinebronchien in An- und Abwesenheit des Antagonisten: Mepyramin und ätherisches Öl
- Abb. 3.33 Einfluss der ätherischen Öle auf der Ba²⁺-induzierten Kontraktion in isolierten Rattentrachea
- Abb. 3.34 Effekt des ätherischen Öls auf die *in vivo* mukoziliäre Clearance

10. TABELLENVERZEICHNIS

Tab. 1.1	Pflanzliche Süßungsmittel
Tab. 2.1	Zusammensetzung der SDS-Polyacrylamidgele
Tab. 3.1	Organoleptische Untersuchung der Pflanzenteile der <i>L. dulcis</i>
Tab. 3.2	Wassergehalt von <i>L. dulcis</i> und seine Pflanzenteile
Tab. 3.3	Prozentsatz des Öls (v/w) in der trockenen Droge und Pflanzenteilen
Tab. 3.4	Prozentsatz des Öls (v/w) in den verschiedenen Teilen der frischen Pflanze
Tab. 3.5	GC-Bestimmung des Gehalts an Campher und Hernandulcin in den ätherischen Ölen von <i>L. dulcis</i>
Tab. 3.6	Einfluss von DMSO auf die HepG2-Zellproliferation
Tab. 3.7	Bestimmung der Ku86-Expression in den behandelten HepG2-Zellen mittels ELISA-Verfahren
Tab. 3.8	Änderung der Ku86-Expression in den behandelten Zellen mittels Western Blot

11. LITERATURVERZEICHNIS

Abad, M.J., Sánchez, S., Bermejo, P., Villar, A., Carrasco, L.: Antiviral activity of some medicinal plants. *Methods and Findings* 1995; 17(Suppl. A): 108.

Abe, F., Nagao, T., Okabe, H.: Antiproliferative constituents in plants 9. Aerial parts of *Lippia dulcis* and *Lippia canescens*. *Biol Pharm Bull.* 2002; 25(7): 920-922.

Adeli, K., Sinkevitch, C.: Secretion of apolipoprotein B in serum-free cultures of human hepatoma cell line, HepG2. *FEBS Lett.* 1990; 263(2): 345-348.

Aden, D.P., Fogel, A., Plotkin, S., Damjanov, I., Knowles, B.B.: Controlled synthesis of HBsAg in a differentiated human liver carcinoma-derived cell line. *Nature* 1979; 282(5739): 615-616.

Adler, E., Hoon, M.A., Mueller, K.L., Chandrashekar, J., Ryba, N.J.P., Zuker, C.S.: A novel family of mammalian taste receptors. *Cell* 2000; 100: 693-702.

Ames, B.N., Lee, F.D., Durston, W.E.: An improved bacterial test system for the detection and classification of mutagens and carcinogens. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1973; 70(3): 782-786.

Andreoli, C., Gigante, D., Nunziata, A.: A review of in vitro methods to assess the biological activity of tobacco smoke with the aim of reducing the toxicity of smoke. *Toxicol In Vitro* 2003; 17: 587-594.

Arends, M.J., Morris, R.G., Wyllie, A.H.: Apoptosis: The role of the endonuclease. *AM J Pathol.* 1990; 136(3): 593-608.

Argueta, V.A.: *Atlas de las Plantas de la Medicina Tradicional Mexicana.* Mexico: Instituto Nacional Indigenista, 1994; Vol. 3.: 801.

Bakand, S., Winder, C., Khalil, C., Hayes, A.: Toxicity assessment of industrial chemicals and airborne contaminants: Transition from in vivo to in vitro test methods: A review. *Inhal Toxicol.* 2005; 17(13): 775-787.

Baritau, O., Richard, H., Touche, J., Derbesy, M.: Effects of drying and storage of herbs and spices on the essential oil. Part 1. Basil, *Ocimum basilicum* L. *Flav Fragr J.* 1992; 7(5): 267-271.

Berridge, M.V., Tan, A.S.: Characterization of the cellular reduction of 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT): Subcellular localization, substrate dependence, and involvement of mitochondrial electron transport in MTT reduction. *Arch Biochem Biophys.* 1993; 303(2): 474-482.

Bhogal, N., Grindon, C., Combes, R., Balls, M.: Toxicity testing: Creating a revolution based on new technologies. *Trends Biotechnol.* 2005; 23(6): 299-307.

Bisio, A., Corallo, A., Gastaldo, P., Romussi, G., Ciarallo, G., Fontana, N., De Tommasi, N., Profumo, P.: Glandular hairs and secreted material in *Salvia blepharophylla* Brandegees ex Epling grown in Italy. *Ann Bot.* 1999; 83(4): 441-452.

Black, J.L., Armour, C.L., Johnson, P.R.A., Alouan, L.A., Barnes, P.J.: The action of a potassium channel activator BRL 38227 (Iemakalim) on human airway smooth muscle. *Am Rev Respiratory Disease* 1990; 142: 1384-1389.

Blasdale, C.: *Lippia Mexicana*. *The Therap Gaz New Ser.* 1881; 2(7): 253-254.

Boje, K., Lechtenberg, M., Nahrstedt, A.: New and known iridoid- and phenylethanoid glycosides from *Harpagophytum procumbens* and their in vitro inhibition of human leukocyte elastase. *Planta Med.* 2003; 69(9): 820-825.

Borenfreund, E., Puerner, J.A.: Toxicity determined in vitro by morphological alterations and neutral red absorption. *Toxicol Lett.* 1985; 24(2-3): 119-124.

Bosabalidis, A.M., Kokkini, S.: Intraspecific variation of leaf anatomy in *Origanum vulgare* grown wild in Greece. *Bot J Linn Soc.* 1997; 123(4): 353-362.

Bosabalidis, A.M.: Structural features of *Origanum* species. In: Kintzios, S.E.: *Oregano: The genera Origanum and Lippia*. London: Taylor & Francis, 2002; 1st edn.: 11-64.

Braga, P.C., Sasso, M.D., Culici, M., Bianchi, T., Bordoni, L., Marabini, L.: Anti-inflammatory activity of thymol: Inhibitory effect on the release of human neutrophil elastase. *Pharmacology* 2006; 77(3): 130-136.

Breitwieser, K.: Untersuchungen über die Verbenaceen des deutschen Drogenhandels. *Pharmazeutische Industrie* 1943; 10: 76-78.

Brown, K.D., Lataxes, T.A., Shangary, S., Mannino, J.L., Giardina, J.F., Chen, J., Baskaran, R.: Ionizing radiation exposure results in up-regulation of Ku70 via a p53/ataxia-telangiectasia-mutated protein-dependent mechanism. *J Biol Chem.* 2000; 275(9): 6651-6656.

Bubnov, Y.N., Gurskii, M.E.: Synthesis of (\pm)-hernandulcin, a sweet substance of *Lippia dulcis*, using boron and silicon enolates. *Izv Akad Nauk SSSR, Ser Khim.* 1986; 6: 1448.

Bustillos, F.: Algunos datos sobre la importancia del consumo de plantas y productos Mexicanos. *La Farmacia (Mexico)* 1898; 7: 224-225.

Cáceres, A., Alvarez, A.V., Ovando, A.E., Samayoa, B.E.: Plants used in Guatemala for the treatment of respiratory diseases. 1. Screening of 68 plants against gram-positive bacteria. *J Ethnopharmacol.* 1991; 31(2): 193-208.

Cáceres, A., Fletes, L., Aguilar, L., Ramirez, O., Figueroa, L., Taracena, A.M., Samayoa, B.: Plants used in Guatemala for the treatment of gastrointestinal disorders. 3. Confirmation of activity against enterobacteria of 16 plants. *J Ethnopharmacol.* 1993; 38(1): 31-38.

Cary, R.B., Peterson, S.R., Wang, J., Bear, D.G., Bradbury, E.M., Chen, D.J.: DNA looping by Ku and the DNA-dependent protein kinase. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1997; 94: 4267-4272.

Catalan, C.A.N., de Lampasona, M.E.P.: The chemistry of the genus *Lippia* (Verbenaceae). In: Kintzios, S.E.: *Oregano: The genera Origanum and Lippia*. London: Taylor & Francis, 2002; 1st edn.: 127-149.

Chan, K.: Some aspects of toxic contaminants in herbal remedies. A review. *Chemosphere*. 2003; 52(9): 1361-1371.

Clemedson, C., Barile, F.A., Chesne, C., Cottin, M., Curren, R., Ekwall, B., Ferro, M., Gomez-Lechon, M.J., Imai, K., Janus, J., Kemp, R.B., Kerszman, G., Kjellstrand, P., Lavrijsen, K., Logemann, P., Mcfarlane-Abdullae, E., Roguet, R., Segner, H., Thuvander, A., Walum, E., Ekwall, B.: MEIC evaluation of acute systemic toxicity. Part VII. Prediction of human toxicity by results from testing of the first 30 reference chemicals with 27 further in vitro assays. *Altern Lab Anim*. 2000; 28(Suppl. 1): 161-200.

Combrinck, S., Du Plooy, G.W., McCrindle, R.I., Botha, B.M.: Morphology and histochemistry of the glandular trichomes of *Lippia scaberrima* (Verbenaceae). *Ann Bot*. 2007; 99(6): 1111-1119.

Compadre, C.M., Pezzuto, J.M., Kinghorn, A.D., Kamath, S.K.: Hernandulcin: An intensely sweet compound discovered by review of ancient literature. *Science* 1985; 227(4685): 417-419.

Compadre, C.M., Robbins, E.F., Kinghorn, A.D.: The intensely sweet herb *Lippia dulcis* Trev.: Historical uses, field inquires and constituents. *J Ethnopharmacol*. 1986; 15(1): 89-106.

Compadre, C.M., Hussain, R.A., de Compadre, R.L.L., Pezzuto, J.M., Kinghorn, A.D.: The intensely sweet sesquiterpene hernandulcin: Isolation, synthesis, characterization and preliminary safety evaluation. *J Agric Food Chem*. 1987; 35: 273-279.

Compadre, C.M., Hussain, R.A., de Compadre, R.L.L., Pezzuto, J.M., Kinghorn, A.D.: Analysis of structural features responsible for the sweetness of the sesquiterpene, hernandulcin. *Experientia* 1988; 44: 447-449.

Corompt, E., Bessard, G., Lantuejoul, S., Naline, E., Advenier, C., Devillier, P.: Inhibitory effects of large Ca^{2+} -activated K^{+} channel blockers on beta-adrenergic- and NO- donor-mediated relaxations of human and guinea pig airway smooth muscles. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol*. 1998; 357(1): 77-86.

Costa, L.G.: Neurotoxicity testing: A discussion of in vitro alternatives. *Environ Health Perspect*. 1998; 106(Suppl. 2): 505-510.

Cotran, R.S., Kumar, V., Collins, T., Robbins, S.L.: *Robbins pathological basis of disease*. Philadelphia: WB Saunders, 1999; 6th edn.

Crosby, G.A., Wingard, R.E.: A survey of less common sweeteners. In: Hough, C.A.M., Parker, K.J., Vlitos, A.J.: *Developments in Sweeteners*. London: Applied Science Publishers, 1979; Vol. 1: 135-164.

Dambach, D.M., Andrews, B.A., Moulin, F.: New technologies and screening strategies for hepatotoxicity: Use of in vitro models. *Toxicol Pathol.* 2005; 33(1): 17-26.

Davis, G.S.: *Organic Materia Medica*, Parke, Davis and Co., Detroit, MI. 1890; 2nd edn.: 115, 262.

Decker, T., Lohmann-Matthes, M.L.: A quick and simple method for the quantitation of lactate dehydrogenase release in measurements of cellular cytotoxicity and tumor necrosis factor (TNF) activity. *J Immunol Methods* 1988; 115(1): 61-69.

De Cusati, P.F., Olofson, R.A.: O-1-(1,3-butadienyl) carbamates as diels-alder dienes: Stereospecific synthesis of (\pm)-hernandulcin and congeners. *Tetrahedron Lett.* 1990; 31(10): 1409-1412.

De la Cruz, M.: Facsímile del "Libellus de Medicinalibus Indorum Herbis". In: del Pozo, E.C.: Instituto Mexicano del Seguro Social, Mexico, D.F. 1964; p. 9-144.

De Vincenzi, M., Mancini, E.: Monographs on botanical flavouring substances used in foods. Part VI. *Fitoterapia* 1997; 68(1): 49-61.

Del Donno, M., Bittesnich, D., Chetta, A., Olivieri, D., Lopez-Vidriero, M.T.: The effect of inflammation on mucociliary clearance in asthma: An overview. *Chest* 2000; 118: 1142-1149.

Ding, S.F., Michail, N.E., Habib, N.A.: Genetic changes in hepatoblastoma. *J Hepatol.* 1994; 20(5): 672-675.

Domínguez, X.A., Sánchez, H., Suárez, M., Baldas, J.H., González, M.R.: Chemical constituents of *Lippia graveolens*. *Planta Med.* 1989; 55: 208-209.

Driver, A.G., Mustafa, S.J.: Correlation of histamine H1 receptor function and [3H]mepyramine binding in porcine tracheal tissue. *Eur J Pharmacol.* 1987; 139(3): 287-295.

Dufresne, M., Jane, D., Theriault, A., Adeli, K.: Expression of cathepsin B and aryl hydrocarbon hydroxylase activities, and of apolipoprotein B in human hepatoma cells maintained long-term in a serum-free medium. *In Vitro Cell Dev Biol Anim.* 1993; 29A(11): 873-878.

Dvir, A., Peterson, S.R., Knuth, M.W., Lu, H., Dynan, W.S.: Ku autoantigen is the regulatory component of a template-associated protein kinase that phosphorylates RNA polymerase II. *Proc Natl Acad Sci.* 1992; 89(24): 11920-11924.

Edmondson, J.M., Armstrong, L.S., Martinez, A.O.: A rapid and simple MTT-based spectrophotometric assay for determining drug sensitivity in monolayer cultures. *J Tissue Cult Meth.* 1988, 11(1): 15-17.

- Efferth, T.: Molekulare Pharmakologie und Toxikologie. Biologische Grundlagen von Arzneimitteln und Giften. Berlin: Springer, 2006; p. 153-259.
- Ehrlich, V.A., Majer, B.J., Uhl, M., Darroudi, F., Mersch-Sundermann, V., Rabot, S., Huber, W., Knasmüller, S.: Application of a human hepatoma cell line (HepG2) as an alternative to laboratory animal testing in genetical toxicology. 12th congress on alternatives to animal testing. Linz, Austria 2004.
- Eiser, N.M.: Histamine receptors in the bronchi. *Eur J Respir Dis Suppl.* 1983; 128: 21-25.
- Ekwall, B.: Screening of toxic compounds in mammalian cell cultures. *Ann N Y Acad Sci.* 1983; 407(1): 64-77.
- Ekwall, B., Clemedson, C., Crafoord, B., Ekwall, Ba., Hallander, S., Walum, E., Bondesson, I.: MEIC evaluation of acute systemic toxicity. Part V. Rodent and human toxicity data for the 50 reference chemicals. *Altern Lab Anim.* 1998; 26 (Suppl. 2): 571-616.
- Elvin-Lewis, M.: Should we be concerned about herbal remedies? *J Ethnopharmacol.* 2001; 75(2-3): 141-164.
- Emine, S.Z., Sevim, E., Kazlm, R.T.: Nitric-oxide mediated relaxation induced by bradykinin in the isolated mouse trachea. *Eur J Pharmacol.* 1998; 352(2-3): 263-268.
- Farkas, D., Tannenbaum, S.R.: In vitro methods to study chemically-induced hepatotoxicity: A literature review. *Curr Drug Metab.* 2005; 6(2): 111-125.
- Farnsworth, N.R., Soejarto, D.D.: Potential consequence of plant extinction in the United States on the current and future availability of prescription drugs. *Econ Bot.* 1985; 39(3): 231-240.
- Feldmann, E., Schmiemann, V., Goedecke, W., Reichenberger, S., Pfeiffer, P.: DNA double-strand break repair in cell-free extracts from Ku80-deficient cells: Implications for Ku serving as an alignment factor in non-homologous DNA end joining. *Nucleic Acids Res.* 2000; 28(13): 2585-2596.
- Fernandes, P.H., Kanuri, M., Nechev, L.V., Harris, T.M., Lloyd, R.S.: Mammalian cell mutagenesis of the DNA adducts of vinyl chloride and crotonaldehyde. *Environ Mol Mutagen.* 2005; 45(5): 455-459.
- Fiorentini, P., Huang, K.N., Tishkoff, D.X., Kolodner, R.D., Symington, L.S.: Exonuclease I of *Saccharomyces cerevisiae* functions in mitotic recombination in vivo and in vitro. *Mol Cell Biol.* 1997; 17(5): 2764-2773.
- Fleisch, J.H., Calkins, P.J.: Comparison of drug-induced responses of rabbit trachea and bronchus. *J Appl Physiol.* 1976; 41: 62-66.
- Freshney, R.I.: Tierische Zellkulturen: Ein Methoden-Handbuch. Berlin: de Gruyter, 1990; 2.Aufl.: 259-260.

Gasquet, M., Delmas, F., Timón-David, P., Keita, A., Guindo, M., Koita, N., Diallo, D., Doumbo, O.: Evaluation in vitro and in vivo of a traditional antimalarial, 'Malarial-5'. *Fitoterapia* 1993; 64: 423-426.

Gatti, F.G.: Enantiospecific synthesis of (+)-hernandulcin. *Tetrahedron Lett.* 2008; 49(34): 4997-4998.

Gersbach, P.V.: The essential oil secretory structures of *Prostanthera ovalifolia* (Lamiaceae). *Ann Bot.* 2002; 89(3): 255-260.

Gibson, D.N.: Verbenaceae. In: Standley, P.C., Williams, L.O.: *Flora of Guatemala*. *Fieldiana Bot.* 1970; 24(9): 167-236.

Glatt, H., Gemperlein, I., Setiabudi, F., Platt, K.L., Oesch, F.: Expression of xenobiotic-metabolizing enzymes in propagatable cell cultures and induction of micronuclei by 13 compounds. *Mutagenesis* 1990; 5(3): 241-249.

Gomi, T.: Composition for oral cavity. Patent JP 4069326, publication date : 04-03-1992 (a).

Gomi, T.: Dentifrices and mouthwashes containing menthol and *Lippia dulcis* essential oil. Patent JP 04074114, publication date: 09-03-1992 (b).

Gonzalez, R.J., Tarloff, J.B.: Evaluation of hepatic subcellular fractions for Alamar Blue and MTT reductase activity. *Toxicol In Vitro* 2001, 15(3): 257-259.

Gottheil, W.S.: From Charity Hospital, New York City. *Lippia Mexicana*. *Therap Gaz.* 1884; 8: 58-60.

Gottlieb, T.M., Jackson, S.P.: The DNA-dependent protein kinase: Requirement for DNA ends and association with Ku antigen. *Cell* 1993; 72(1): 131-142.

Gouin, S., Patel, H.: Unusual cause of seizure. *Pediatr Emerg Care* 1996; 12(4): 298-300.

Guerra, F.: *Bibliografía de la Materia Medica Mexicana*. La Prensa Médica Mexicana, Mexico, D.F. 1950; p. 6-10, 37.

Guevara, J.M., Chumpitaz, J., Valencia, E.: The in vitro action of plants on *Vibrio cholerae*. *Rev Gastroenterol Peru* 1994; 14(1): 27-31.

Hänsel, R., Keller, K., Rimpler, H., Schneider, G. (Hrsg.): *Hagers Handbuch der Pharmazeutischen Praxis*, 5. Auflage, Drogen E-O. Berlin: Springer, 1993; Band 5: 686-688.

Han, Z., Malik, N., Carter, T., Reeves, W.H., Wyche, J.H., Hendrickson, E.A.: DNA-dependent protein kinase is a target for a CPP32-like apoptotic protease. *J Biol Chem.* 1996; 271(40): 25035-25040.

Hasspieler, B.M., Ali, F.N., Alipour, M., Haffner, G.D., Adeli, K.: Human bioassays to assess environmental genotoxicity: Development of a DNA break bioassay in HepG2 cells. *Clin Biochem.* 1995; 28(2): 113-116.

Hasspieler, B.M., Haffner, G.D., Adeli, K.: In vitro toxicological methods for environmental health testing. *Rev Environ Health* 1996; 11(4): 213-227.

Hasspieler, B., Haffner, D., Stelljes, M., Adeli, K.: Toxicological assessment of industrial solvents using human cell bioassays: Assessment of short-term cytotoxicity and long-term genotoxicity potential. *Toxicol Ind Health* 2006; 22(7): 301-315.

Hayashi, Y.: Designing in vitro assay systems for hazard characterization. Basic strategies and related technical issues. *Exp Toxicol Pathol.* 2005; 57(Suppl. 1): 227-232.

Hegnauer, R.: *Chemotaxonomie der Pflanzen*. Basel, Stuttgart: Birkhäuser Verlag, 1973; Band VI: 658-681.

Hernández, F.: *Obras Completas Tomo II: Historia natural de nueva España*, Universidad Nacional de Mexico, Mexico, D.F. 1959a; Vol. 1: ix, 208.

Hernández, F.: *Obras Completas Tomo II: Historia natural de nueva España*, Universidad Nacional de Mexico, Mexico, D.F. 1959b; Vol. 2: 68, 264.

Hernández, F.: *Rerum Medicarum Novae Hispaniae Thesaurus seu Plantarum Animalium, Mineralium Mexicanorum Historia*. Typographeio Vitalis Mascardi, Rome, 1651; p. 240.

Hernández, V., Recio, M.C., Máñez, S., Giner, R.M., Ríos, J.L.: Effects of naturally occurring dihydroflavonols from *Inula viscosa* on inflammation and enzymes involved in the arachidonic acid metabolism. *Life Sci.* 2007; 81(6): 480-488.

Huang, Y.: BaCl₂- and 4-aminopyridine-evoked phasic contractions in the rat vas deferens. *Br J Pharmacol.* 1995; 115(5): 845-851.

Hutchings, A., van Staden, J.: Plants used for stress-related ailments in traditional Zulu, Xhosa and Sotho medicine. Part 1: Plants used for headaches. *J Ethnopharmacol.* 1994; 43(2): 89-124.

Inglett, G.E.: Sweeteners: A review. *Food Technology* 1981; p. 37-41.

Inoue, Y., Takeuchi, S.: Expectorant-like action of camphor derivatives. *Nippon Ika Daigaku Zasshi.* 1969; 36(4): 351-354.

Ishaque, A., Al-Rubeai, M.: Monitoring of apoptosis. In: Al-Rubeai, M., Fussenegger, M.: *Cell engineering*, Vol. 4: Apoptosis. New York: Kluwer Academic Publishers, 2004; p. 281-306.

Jackson, S.P.: Sensing and repairing DNA double-strand breaks. *Carcinogenesis* 2002; 23(5): 687-696.

Jaeschke, H., Gores, G.J., Cederbaum, A.I., Hinson, J.A., Pessayre, D., Lemasters, J.J.: Mechanisms of hepatotoxicity. *Toxicol Sci.* 2002; 65(2): 166-176.

Jones, M.N.: Surfactants in membrane solubilisation. *Int J Pharm.* 1999; 177(2): 137-159.

- Juliani, H.R.Jr., Koroch, A.R., Juliani, H.R., Trippi, V.S., Zygadlo, J.A.: Intraspecific variation in the leaf oils of *Lippia junelliana* (mold.) tronc. *Biochem Syst Ecol.* 2002; 30(2): 163-170.
- Junop, M.S., Modesti, M., Guarne, A., Ghirlando, R., Gellert, M., Yang, W.: Crystal structure of the Xrcc4 DNA repair protein and implications for end joining. *EMBO J.* 2000; 19(22): 5962-5970.
- Kamiya, T., Takano, H., Uchiyama, Y., Yamazaki, T., Morita, M.: Treatment of PCB- and/or dioxin-contaminated soils by using plants. Patent JP 2001276804, publication date: 09-10-2001.
- Kaneda, N., Lee, I.S., Gupta, M.P., Soejarto, D.D., Kinghorn, A.D.: (+)-4 beta-hydroxyhernandulcin, a new sweet sesquiterpene from the leaves and flowers of *Lippia dulcis*. *J Nat Prod.* 1992; 55(8): 1136-1141.
- Kant, R.: Sweet proteins-Potential replacement for artificial low calorie sweeteners. *Nutr J.* 2005; 4: 5.
- Kaplowitz, N.: Mechanisms of cell death and relevance to drug hepatotoxicity. In: Kaplowitz, N., DeLeve, L.D.: *Drug-induced liver disease.* New York: Informa Healthcare USA, 2007; 2nd edn.: 85-95.
- Kenakin, T.P.: *A pharmacology primer.* Amsterdam: Academic Press, 2006; 2nd edn.
- Kerr, J.F.R., Wyllie, A.H., Currie, A.R.: Apoptosis: A basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. *Br J Cancer* 1972; 26: 239-257.
- Khanna, K.K., Jackson, S.P.: DNA double-strand breaks: Signaling, repair and the cancer connection. *Nat Genet.* 2001; 27(3): 247-254.
- Kim, G.W., Noshita, N., Sugawara, T., Chan, P.H.: Early decrease in DNA repair proteins, Ku70 and Ku86, and subsequent DNA fragmentation after transient focal cerebral ischemia in mice. *Stroke* 2001; 32(6): 1401-1407.
- Kim, J.H., Lim, H.J., Cheon, S.H.: A facile synthesis of (6S, 1'S)-(+)-hernandulcin and (6S, 1'R)-(+)-epihernandulcin. *Tetrahedron* 2003, 59(38): 7501-7507.
- Kim, N.C., Kinghorn, A.D.: Sweet-tasting and sweetness-modifying constituents of plants. In: Atta-ur-Rahman: *Studies in natural products chemistry, bioactive natural products (part H).* Amsterdam: Elsevier Scientific Publishers, 2002a; 27: 3-57.
- Kim, N.C., Kinghorn, A.D.: Highly sweet compounds of plant origin. *Arch Pharm Res.* 2002b; 25(6): 725-746.
- Kinghorn, A.D., Compadre, C.M., Pezzuto, J.M.: Low cariogenic sweetening agents. US Patent 4808409, publication date: 28-02-1989.

Kinghorn, A.D., Compadre, C.M.: Less common high-potency sweeteners. In: O'Brien Nabors, L.: Alternative sweeteners, 3rd ed., revised and expanded. New York: Marcel Dekker, 2001; p. 209-233.

Kinghorn, A.D., Soejarto, D.D.: Discovery of terpenoid and phenolic sweeteners from plants. *Pure Appl Chem.* 2002; 74(7): 1169-1179.

Kitazawa, T., Uchiyama, F., Hirose, K., Taneike, T.: Characterization of the muscarinic receptor subtype that mediates the contractile response of acetylcholine in the swine myometrium. *Eur J Pharmacol.* 1999; 367(2-3): 325-334.

Klueger, P.A., Daros, M.R., Silva, R.M., Farias, M.R., De Lima, T.C.M.: Neuropharmacological evaluation of crude and semipurified extracts from *Lippia alba* Will. N.E. Br. (Verbenaceae). Abstracts. International joint symposium. Chemistry, biological and pharmacological properties of medicinal plants from the Americas. 1997; Poster B23.

Knasmüller, S., Parzefall, W., Sanyal, R., Ecker, S., Schwab, C., Uhl, M., Mersch-Sundermann, V., Williamson, G., Hietsch, G., Langer, T., Darroudi, F., Natarajan, A.T.: Use of metabolically competent human hepatoma cells for the detection of mutagens and antimutagens. *Mutat Res.* 1998; 402(1-2): 185-202.

Knowles, B.B., Howe, C.C., Aden, D.P.: Human hepatocellular carcinoma cell lines secrete the major plasma proteins and hepatitis B surface antigen. *Science* 1980; 209(4455): 497-499.

Knowles, B.B., Aden, D.P.: Human hepatoma derived cell line, process for preparation thereof, and uses therefor. US Patent 4393133, publication date: 12-07-1983.

Koopman, G., Reutelingsperger, C.P.M., Kuijten, G.A.M., Keehnen, R.M.J., Pals, S.T., Van Oers, M.H.J.: Annexin V for flow cytometric detection of phosphatidylserine expression on B cells undergoing apoptosis. *Blood* 1994; 84(5): 1415-1420.

Kotlikoff, M.I.: Potassium currents in canine airway smooth muscle cells. *Am J Physiol.* 1990; 259: L984-L995.

Kreutner, W., Hey, J.A., Anthes, J., Barnett, A., Young, S., Tozzi, A.: Preclinical pharmacology of desloratadine, a selective and non-sedating histamine H1 receptor antagonist. *Arzneimittelforschung* 2000; 50: 345-352.

Kumaravel, T.S., Bharthy, K., Kudoh, S., Tanaka, K., Kamada, N.: Expression, localization and functional interactions of Ku70 subunit of DNA-PK in peripheral lymphocytes and Nalm-19 cells after irradiation. *Int J Radiat Biol.* 1998; 74(4): 481-489.

Laemmli, U.K.: Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 1970; 227: 680-685.

Lah, B., Žinko, B., Narat, M., Marinšek-Logar, R.: Monitoring of genotoxicity in drinking water using in vitro comet assay and Ames test. *Food Technol Biotechnol.* 2005; 43(2): 139-146.

Lambert, I.B., Singer, T.M., Boucher, S.E., Douglas, G.R.: Detailed review of transgenic rodent mutation assays. *Mutat Res.* 2005; 590(1-3): 1-280.

Langman, I.K.: A selected guide to the literature on the flowering plants of Mexico. Philadelphia: University of Pennsylvania Press, 1964; p. 360-361.

Lea, M.A.: Regulation of gene expression in hepatomas. *Int J Biochem.* 1993; 25(4): 457-469.

LeCluyse, E.L., Alexandre, E., Hamilton, G.A., Viollon-Abadie, C., Coon, D.J., Jolley, S., Richert, L.: Isolation and culture of primary human hepatocytes. *Methods Mol Biol.* 2005; 290: 207-229.

Lee, K.J., Huang, J., Takeda, Y., Dynan, W.S.: DNA ligase IV and XRCC4 form a stable mixed tetramer that functions synergistically with other repair factors in a cell-free end-joining system. *J Biol Chem.* 2000; 275: 34787-34796.

Leist, M., Jäättelä, M.: Four deaths and a funeral: From caspases to alternative mechanisms. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2001; 2(8): 589-598.

Leuschner, J.: Reproductive toxicity studies of D-camphor in rats and rabbits. *Arzneimittelforschung* 1997; 47(2): 124-128.

Li, X., Staszewski, L., Xu, H., Durick, K., Zoller, M., Adler, E.: Human receptors for sweet and umami taste. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2002, 99(7): 4692-4696.

Lieber, M.R., Ma, Y., Pannicke, U., Schwarz, K.: Mechanism and regulation of human non-homologous DNA end-joining. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2003; 4: 712-720.

Lieber, M.R., Ma, Y., Pannicke, U., Schwarz, K.: The mechanism of vertebrate non-homologous DNA end joining and its role in V(D)J recombination. *DNA Repair (Amst.)* 2004; 3(8-9): 817-826.

Liguori, M.J., Blomme, E.A.G., Waring, J.F.: Trovafloxacin-induced gene expression changes in liver-derived in vitro systems: Comparison of primary human hepatocytes to HepG2 cells. *Drug Metab Dispos.* 2008; 36(2): 223-233.

Liu, X., Zou, H., Slaughter, C., Wang, X.: DFF, a heterodimeric protein that functions downstream of caspase-3 to trigger DNA fragmentation during apoptosis. *Cell* 1997; 89(2): 175-184.

López, A.A.M., Rojas, H.N.M., Jiménez, M.C.A.: Plants extracts with cytostatic properties growing in Cuba. *Rev Cubana Med Trop.* 1979; 31(2): 97-104.

Luque de Castro, M.D., Jiménez-Carmona, M.M., Fernández-Peréz, V.: Towards more rational techniques for the isolation of valuable essential oils from plants. *Trends Anal Chem.* 1999; 18(11): 708-716.

Ma, Y., Pannicke, U., Schwarz, K., Lieber, M.R.: Hairpin opening and overhang processing by an Artemis: DNA-PKcs complex in V(D)J recombination and in nonhomologous end joining. *Cell* 2002; 108: 781-794.

Macchione, M., Guimarães, E.T., Saldiva, P.H., Lorenzi-Filho, G.: Methods for studying respiratory mucus and mucus clearance. *Braz J Med Biol Res.* 1995; 28(11-12): 1347-1355.

Macdonald, S.J.F., Dowle, M.D., Harrison, L.A., Shah, P., Johnson, M.R., Inglis, G.G.A., Clarke, G.D.E., Smith, R.A., Humphreys, D., Molloy, C.R., Amour, A., Dixon, M., Murkitt, G., Godward, R.E., Padfield, T., Skarzynski, T., Singh, O.M.P., Kumar, K.A., Fleetwood, G., Hodgson, S.T., Hardy, G.W., Finch, H.: The discovery of a potent, intracellular, orally bioavailable, long duration inhibitor of human neutrophil elastase-GW311616A a development candidate. *Bioorg Med Chem Lett.* 2001; 11(7): 895-898.

Mahady, G.B.: Global harmonization of herbal health claims. *J Nutr.* 2001; 131(3): 1120S-1123S

Maisch, J.M.: On some useful plants of the natural order of Verbenaceae. *Am J Pharm.* 1885; 57: 330-335.

Mangena, T., Muyima, N.Y.O.: Comparative evaluation of the antimicrobial activities of essential oils of *Artemisia afra*, *Pteronia incana* and *Rosmarinus officinalis* on selected bacteria and yeast strains. *Lett Appl Microbiol.* 1999; 28(4): 291-296.

Marthan, R., Martin, C., Amedee, T., Mironneau, J.: Calcium channel currents in isolated smooth muscle cells from human bronchus. *J Appl Physiol.* 1989; 66: 1706-1714.

Maurici, D., Aardema, M., Corvi, R., Kleber, M., Krul, C., Laurent, C., Loprieno, N., Pasanen, M., Pfuhrer, S., Phillips, B., Sabbioni, E., Sanner, T., Vanparys, P.: Genotoxicity and mutagenicity. *Altern Lab Anim.* 2005; 33(Suppl. 1): 117-130.

Mejia, J.V.: Plantas medicinales. Geografía de la República de Guatemala. Tipografía Nacional, Guatemala, 1927; p. 137-163.

Mellen, G.A.: El uso de las plantas medicinales en Guatemala. *Guatemala Indigena* 1974; 9: 99-179.

Melzig, M.F., Löser, B., Ciesielski, S.: Inhibition of neutrophil elastase activity by phenolic compounds from plants. *Pharmazie* 2001; 56(12): 967-970.

Mori, K., Kato, M.: Synthesis of (6S,1'S)-(+)-hernandulcin, a sweetener, and its stereoisomers. *Tetrahedron* 1986; 42(21): 5895-5900.

Morton, J.F.: Atlas of medicinal plants of Middle America. Bahamas to Yucatan. Springfield, IL: Charles C. Thomas, 1981; p. 746-747.

Mosmann, T.: Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: Application to proliferation and cytotoxicity assays. *J Immunol Methods* 1983, 65(1-2): 55-63.

Mullen, P.: PARP cleavage as a means of assessing apoptosis. In: Langdon, S.P.: *Cancer cell culture-methods and protocols.* New Jersey: Humana Press, 2004; p. 171-181.

Nagata, S., Nagase, H., Kawane, K., Mukae, N., Fukuyama, H.: Degradation of chromosomal DNA during apoptosis. *Cell Death Differ.* 2003; 10(1): 108-116.

Nakajima, K., Powers, J.C., Ashe, B.M., Zimmerman, M.: Mapping the extended substrate binding site of cathepsin G and human leukocyte elastase. Studies with peptide substrates related to the alpha 1-protease inhibitor reactive site. *J Biol Chem.* 1979; 254(10): 4027-4032.

Nelson, G., Hoon, M.A., Chandrashekar, J., Zhang, Y.F., Ryba, N.J.P., Zuker, C.S.: Mammalian sweet taste receptors. *Cell* 2001; 106(3): 381-390.

Ni, R., Leo, M.A., Zhao, J., Lieber, C.S.: Toxicity of β -carotene and its exacerbation by acetaldehyde in HepG2 cells. *Alcohol Alcohol.* 2001; 36(4): 281-285.

O'Brien, P.J., Chan, K., Silber, P.M.: Human and animal hepatocytes in vitro with extrapolation in vivo. *Chem Biol Interact.* 2004; 150(1): 97-114.

O'Brien Nabors, L.: Alternative Sweeteners: An Overview. In: O'Brien Nabors, L.: *Alternative Sweeteners*, 3rd ed., revised and expanded. New York: Marcel Dekker, 2001; p. 1-12.

Ohno, Y., Miyajima, A., Sunouchi, M.: Alternative methods for mechanistic studies in toxicology. Screening of hepatotoxicity of pesticides using freshly isolated and primary cultured hepatocytes and non-liver-derived cells, SIRC cells. *Toxicol Lett.* 1998; 102-103: 569-573.

Ohno, K., Tanaka-Azuma, Y., Yoneda, Y., Yamada, T.: Genotoxicity test system based on p53R2 gene expression in human cells: Examination with 80 chemicals. *Mutat Res.* 2005; 588(1): 47-57.

Ollevent, N.A., Humphris, G., Roe, B.: How big is a drop? A volumetric assay of essential oils. *J Clinical Nursing* 1999; 8(3): 299-304.

Ōmura, S., Iwai, Y., Hirano, A., Nakagawa, A., Awaya, J., Tsuchiya, H., Takahashi, Y., Masuma, R.: A new alkaloid AM-2282 of *Streptomyces* origin. Taxonomy, fermentation, isolation and preliminary characterization. *J Antibiot. (Tokyo)* 1977; 30(4): 275-282.

Ono, M., Morinaga, H., Masuoka, C., Ikeda, T., Okawa, M., Kinjo, J., Nohara, T.: New bisabolane-type sesquiterpenes from the aerial parts of *Lippia dulcis*. *Chem Pharm Bull.* 2005; 53(9): 1175-1177.

Ono, M., Tsuru, T., Abe, H., Eto, M., Okawa, M., Abe, F., Kinjo, J., Ikeda, T., Nohara, T.: Bisabolane-type sesquiterpenes from the aerial parts of *Lippia dulcis*. *J Nat Prod.* 2006; 69(10): 1417-1420.

Pang, D., Yoo, S., Dynan, W.S., Jung, M., Dritschilo, A.: Ku proteins join DNA fragments as shown by atomic force microscopy. *Cancer Res.* 1997; 57: 1412-1415.

Pascual, M.E., Slowing, K., Carretero, E., Sánchez Mata, D., Villar, A.: *Lippia*: Traditional uses, chemistry and pharmacology: A review. *J Ethnopharmacol.* 2001; 76(3): 201-214.

Pastwa, E., Blasiak, J.: Non-homologous DNA end joining. *Acta Biochim Pol.* 2003; 50(4): 891-908.

- Paull, T.T., Gellert, M.: The 3'-5' exonuclease activity of Mre11 facilitates repair of DNA double-strand breaks. *Mol Cell* 1998; 1(7): 969-979.
- Peiper, U., Zobel, K.: Barium ions reduce contraction kinetics in rat tracheal smooth muscle. *Pflugers Arch.* 1987; 408(4): 373-378.
- Pérez, S., Meckes, M., Pérez, C., Susunaga, A., Zavala, M.A.: Anti-inflammatory activity of *Lippia dulcis*. *J Ethnopharmacol.* 2005; 102(1): 1-4.
- Pessayre, D., Mansouri, A., Haouzi, D., Fromenty, B.: Hepatotoxicity due to mitochondrial dysfunction. *Cell Biol Toxicol.* 1999; 15(6): 367-73.
- Pessayre, D., Feldmann, G., Haouzi, D., Fau, D., Moreau, A., Neuman, M.: Hepatocyte apoptosis triggered by natural substances (cytokines, other endogenous substances and foreign toxins). In: Cameron, R.G., Feuer, G.: *Apoptosis and its modulation by drugs. Handbook of experimental pharmacology.* Berlin: Springer, 2000; Vol. 142: 59-108.
- Pessayre, D., Fromenty, B., Mansouri, A.: Drug-induced steatosis and steatohepatitis. In: Lemasters, J.J., Niemenen, A.L.: *Mitochondria in pathogenesis.* New York: Plenum Press, 2001: 489-517.
- Pessayre, D., Fromenty, B., Mansouri, A., Berson, A.: Hepatotoxicity due to mitochondrial injury. In: Kaplowitz, N., DeLeve, L.D.: *Drug-induced liver disease.* New York: Informa Healthcare USA, 2007; 2nd edn.: 49-84.
- Peyer, W.: *Hagers pharmazeutisch-technisches Manuale.* Leipzig: Johann Ambrosius Barth, 1931; p. 1051.
- Pfaller, W., Gstraunthaler, G.: Nephrotoxicity testing in vitro- what we know and what we need to know. *Environ Health Perspect.* 1998; 106(Suppl. 2): 559-569.
- Pfeiffer, P.: The mutagenic potential of DNA double-strand break repair. *Toxicol Lett.* 1998; 96-97: 119-129.
- Piacentini, M., Fesus, L., Farrace, M.G., Ghibelli, L., Piredda, L., Melino, G.: The expression of "tissue" transglutaminase in two human cancer cell lines is related with programmed cell death (apoptosis). *Eur J Cell Biol.* 1991; 54(2): 246-254.
- Poot, M., Pierce, R.H., Kavanagh, T.J.: Flow cytometric and fluorometric methods of quantifying and characterizing apoptotic cell death. In: Davis, M.A.: *Apoptosis methods in pharmacology and toxicology: Approaches to measurement and quantification.* New Jersey: Humana Press, 2002; p. 11-36.
- Quast, U.: Do the K⁺ channel openers relax smooth muscle by opening K⁺ channel?. *Trends Pharmacol Sci.* 1993; 14: 332-337.
- Ragucci, K.R., Trangmar, P.R., Bigby, J.G., Detar, T.D.: Camphor ingestion in a 10-year-old male. *South Med J.* 2007; 100(2): 204-207.

Reiter, M., Brandt, W.: Relaxant effects on tracheal and ileal smooth muscles of the guinea pig. *Arzneimittelforschung* 1985; 35(1A): 408-414.

Rice, J.M., Baan, R.A., Blettner, M., Genevois-Charneau, C., Grosse, Y., McGregor, D.B., Partensky, C., Wilbourn, J.D.: Rodent tumors of urinary bladder, renal cortex, and thyroid gland in IARC monographs evaluations of carcinogenic risk to humans. *Toxicol Sci.* 1999; 49(2): 166-171.

Robichová, S., Slamenová, D., Chalupa, I., Sebová, L.: DNA lesions and cytogenetic changes induced by N-nitrosomorpholine in HepG2, V79 and VH10 cells: The protective effects of vitamins A, C and E. *Mutat Res.* 2004; 560(2): 91-99.

Roig y Mesa, J.T.: *Plantas Medicinales, Aromáticas o Venenosas de Cuba, Part 1.* Ministerio de Agricultura, Servicio de Publicidad y Divulgación, Havana, 1945; p. 508-509.

Rudy, B.: Diversity and ubiquity of K channels. *Neuroscience* 1988; 25(3): 729-749.

Rueff, J., Chiapella, C., Chipman, J.K., Darroudi, F., Silva, I.D., Duverger-van Bogaert, M., Fonti, E., Glatt, H.R., Isern, P., Laires, A., Léonard, A., Llagostera, M., Mossesso, P., Natarajan, A.T., Palitti, F., Rodrigues, A.S., Schinoppi, A., Turchi, G., Werle-Schneider, G.: Development and validation of alternative metabolic systems for mutagenicity testing in short-term assays. *Mutat Res.* 1996; 353(1-2): 151-176.

Saad, B., Abu-Hijleh, G., Suter, U.W.: Polymer biocompatibility assessment by cell culture techniques. In: Arshady, R.: *The PMB series: Introduction to polymeric biomaterials.* London: Citrus Books, 2003; Vol. 1: 263-299.

Saad, B., Dakwar, S., Said, O., Abu-Hijleh, G., Al Battah, F., Kmeel, A., Aziازه, H.: Evaluation of medicinal plant hepatotoxicity in co-cultures of hepatocytes and monocytes. *Evid Based Complement Alternat Med.* 2006; 3(1): 93-98.

Sambrook, J., Fritsch, E.F., Maniatis, T.: *Molecular cloning, a laboratory manual.* New York: Cold Spring Harbour Press, 1989; 2nd edn.

Sauerwald, T.M., Betenbaugh, M.J.: The role of Caspases in apoptosis and their inhibition in mammalian cell culture. In: Al-Rubeai, M., Fussenegger, M.: *Cell engineering, Vol. 4: Apoptosis.* New York: Kluwer Academic Publishers, 2004; p. 181-210.

Sauerwein, M., Flores, H., Yamazaki, T., Shimomura, K.: *Lippia dulcis* shoot cultures as a source of the sweet sesquiterpene hernandulcin. *Plant Cell Rep.* 1991a; 9(12): 663-666.

Sauerwein, M., Yamazaki, T., Shimomura, K.: Hernandulcin in hairy root cultures of *Lippia dulcis*. *Plant Cell Rep.* 1991b; 9(10): 579-581.

Savill, J., Fadok, V., Henson, P., Haslett, C.: Phagocyte recognition of cells undergoing apoptosis. *Immunol Today* 1993; 14(3): 131-136.

Saxton, J.H.: *Lippia Mexicana.* *Therap Gaz.* 1881; p. 7, 3.

Sibanda, B.L., Critchlow, S.E., Begun, J., Pei, X.Y., Jackson, S.P., Blundell, T.L., Pellegrini, L.: Crystal structure of an Xrcc4-DNA ligase complex. *Nat Struct Biol.* 2001; 8(12): 1015-1019.

Siméon, R.: Diccionario de la lengua Náhuatl o Mexicana. Siglo Vientiuno Editores, Mexico, D.F. 1981; p. 118, 737, 770.

Sivalokanathan, S., Vijayababu, M.R., Balasubramanian, M.P.: Effects of Terminalia arjuna bark extract on apoptosis of human hepatoma cell line HepG2. *World J Gastroenterol.* 2006; 12(7): 1018-1024.

Slater, T.F., Sawyer, B., Sträuli, U.: Studies on succinate-tetrazolium reductase systems III. Points of coupling of four different tetrazolium salts. *Biochim Biophys Acta.* 1963, 77: 383-393.

Slowing Barillas, K.V.: Estudio de la actividad antiinflamatoria de diversas especies de la flora de Guatemala. Facultad de Farmacia. 1992.

Smith, G.C., Jackson, S.P.: The DNA-dependent protein kinase. *Genes Dev.* 1999; 13: 916-934.

Smith, P.K., Krohn, R.I., Hermanson, G.T., Mallia, A.K., Gartner, F.H., Provenzano, M.D., Fujimoto, E.K., Goeke, N.M., Olson, B.J., Klenk, D.C.: Measurement of protein using bicinchoninic acid. *Anal Biochem.* 1985; 150(1): 76-85.

Soejarto, D.D., Farnsworth, N.R.: Tropical rain forests: Potential source of new drugs? *Perspect Biol Med.* 1989; 32(2): 244-256.

Souto-Bachiller, F.A., De Jesus-Echevarría, M., Cárdenas-González, O.E., Acuña-Rodríguez, M.F., Meléndez, P.A., Romero-Ramsey, L.: Terpenoid composition of *Lippia dulcis*. *Phytochemistry* 1997; 44(6): 1077-1086.

Souza Brito, A.R.M., Souza Brito, A.A.: Forty years of Brazilian medicinal plant research. *J Ethnopharmacol.* 1993; 39(1): 53-67.

Soysal, Y., Öztekin, S.: PH-Postharvest technology technical and economic performance of a tray dryer for medicinal and aromatic plants. *J Agric Eng Res.* 2001; 79(1): 73-79.

Spielmann, H., Bochkov, N.P., Costa, L., Gribaldo, L., Guillouzo, A., Heindel, J.J., Karol, M., Parchment, R., Pfaller, W., Peraita, P.P., Zacharewski, T.: 13th meeting of the scientific group on methodologies for the safety evaluation of chemicals (SGOMSEC): alternative testing methodologies for organ toxicity. *Environ Health Perspect.* 1998; 106(Suppl. 2): 427-439.

Standen, N.B., Quayle, J.M., Davies, N.W., Brayden, J.E., Huang, Y., Nelson, M.T.: Hyperpolarizing vasodilators activate ATP-sensitive K⁺ channels in arterial smooth muscle. *Science* 1989; 245(4914): 177-180.

Stein, R.L.: Catalysis by human leukocyte elastase: Substrate structural dependence of rate-limiting protolytic catalysis and operation of the charge relay system. *J Am Chem Soc.* 1983; 105: 5111-5116.

Steinmetz, M.D.I., Tognetti, P., Mourgue, M., Jouglard, J.I., Millet, Y.: Toxicity of certain commercial essential oils of hyssop and oil of sage. *Plant Med Phytother.* 1980; 14: 34-45.

Studzinski, G.P.: Overview of apoptosis. In Studzinski, G.P.: *Apoptosis: A practical approach.* New York: Oxford University Press, 1999; p. 1-17.

Tähti, H., Nevala, H., Toimela, T.: Refining in vitro neurotoxicity testing: The development of blood-brain barrier models. *Altern Lab Anim.* 2003; 31(3): 273-276.

Tanaka, O.: Steviol glycosides: New natural sweeteners. *Trends Anal Chem.* 1982; 1(11): 246-248.

Terblanché, F.C., Kornelius, G.: Essential oil constituents of the genus *Lippia* (Verbenaceae)- a literature review. *J Essent Oil Res.* 1996; 8(5): 471-485.

Thirstrup, S., Nielsen-Kudsk, J.E., Mellekjær, S.: Involvement of K⁺ channels in the relaxant effect of vasoactive intestinal peptide and atrial natriuretic peptide in isolated guinea-pig trachea. *Eur J Pharmacol.* 1997; 319(2-3): 253-259.

Tuschl, H., Schwab, C.E.: Flow cytometric methods used as screening tests for basal toxicity of chemicals. *Toxicol In Vitro* 2004; 18(4): 483-491.

Uhl, M., Helma, C., Knasmüller, S.: Evaluation of the single cell gel electrophoresis assay with human hepatoma (HepG2) cells. *Mutat Res.* 2000; 468(2): 213-225.

Valentin-Severin, I., Le Hegarat, L., Lhuguenot, J.C., Le Bon, A.M., Chagnon, M.C.: Use of HepG2 cell line for direct or indirect mutagens screening: Comparative investigation between comet and micronucleus assays. *Mutat Res.* 2003; 536(1-2): 79-90.

Wagner, H., Bladt, S.: *Plant drug analysis: A thin layer chromatography atlas.* Berlin: Springer, 1996.

Wanner, A., Salathé, M., O'Riordan, T.G.: Mucociliary clearance in the airways: State of the art. *Am J Respir Crit Care Med.* 1996; 154: 1868-1902.

Weiss, E.A.: *Essential oil crops.* New York: CAB International, 1997.

Werner, U., Seitz, O., Szelenyi, I.: Stimulated elastase release from human leukocytes: Influence of anti-asthmatic, anti-inflammatory and calcium antagonist drugs in vitro. *Agents Actions* 1993; 38(Suppl. 2): C112-C114.

Weyermann, J., Lochmann, D., Zimmer, A.: A practical note on the use of cytotoxicity assays. *Int J Pharm.* 2005; 288(2): 369-376.

Whish, J.P.M., Williams, R.R.: Effects of post harvest drying on the yield of tea tree oil (*Melaleuca alternifolia*). *J Essent Oil Res.* 1996; 8: 47-51.

Wickenden, J.A., Clarke, M.C.H., Rossi, A.G., Rahman, I., Faux, S.P., Donaldson, K., MacNee, W.: Cigarette smoke prevents apoptosis through inhibition of caspase activation and induces necrosis. *Am J Respir Cell Mol Biol.* 2003; 29(5): 562-570.

Wiczak, Z.J.: Synthesis of C-glycosyl compounds and other natural products from levoglucosenone. *Pure Appl Chem.* 1994; 66(10-11): 2189-2192.

Wiechelman, K.J., Braun, R.D., Fitzpatrick, J.D.: Investigation of the bicinchoninic acid protein assay: Identification of the groups responsible for color formation. *Anal Biochem.* 1988; 175(1): 231-237.

Wilkening, S., Stahl, F., Bader, A.: Comparison of primary human hepatocytes and hepatoma cell line HepG2 with regard to their biotransformation properties. *Drug Metab Dispos.* 2003; 31(8): 1035-1042.

Wren, R.C.: *Potter's new cyclopaedia of botanical drugs and preparations.* London: Pittman Publishers, 1950; p. 180.

Wyllie, A.H., Kerr, J.F.R., Currie, A.R.: Cell death: The significance of apoptosis. *Int Rev Cytol.* 1980; 68: 251-306.

Yaneva, M., Kowalewski, T., Lieber, M.R.: Interaction of DNA-dependent protein kinase with DNA and with Ku: Biochemical and atomic-force microscopy studies. *EMBO J.* 1997; 16: 5098-5112.

Zarzuelo, A., Crespo, E.: The medicinal and non-medicinal uses of thyme. In: Stahl-Biskup, E., Sáez, F.: *Thyme, the genus Thymus.* London: Taylor & Francis, 2002; p. 260-292.

Zeiger, E.: Genetic toxicity tests for predicting carcinogenicity. In: Choy, W.N.: *Genetic toxicology and cancer risk assessment.* New York: Marcel Dekker, 2001; p. 29-45.

Zheng, G.C., Kakisawa, H.: Synthesis of (\pm)-hernandulcin by an intramolecular nitrile oxide cycloaddition route from farnesol. *Bull Chem Soc Jpn.* 1989; 62(2): 602-604.

Zheng, G.C., Kakisawa, H.: Stereoselective synthesis of an intensely sweet compound hernandulcin. *Chin Sci Bull.* 1990; 35(16): 1406.

12. VERÖFFENTLICHUNGEN DER DISSERTATION

Publikationen:

Nayal, R., Melzig, M.F.: *Lippia dulcis* Trevis.- eine Süßstoffpflanze mit Potenzial aus Mittelamerika. Zeitschrift für Phytotherapie 2005; 26: 42-46.

Görnemann, T., **Nayal, R.,** Pertz, H.H., Melzig, M.F.: Antispasmodic activity of essential oil from *Lippia dulcis* Trev. J Ethnopharmacol. 2008; 117: 166-169.

Nayal, R., Abajy, Y., Melzig, M.F.: Comparison of essential oil composition and cytotoxicity of *Lippia dulcis* Trev. from Mexico and Panama. Manuscript in preparation.

Nayal, R., Abajy, Y., Melzig, M.F.: Evaluation of the genotoxic potential of *Lippia dulcis* on HepG2 cells using the Ku DNA repair Protein assay. Manuscript in preparation.

Posterpräsentationen:

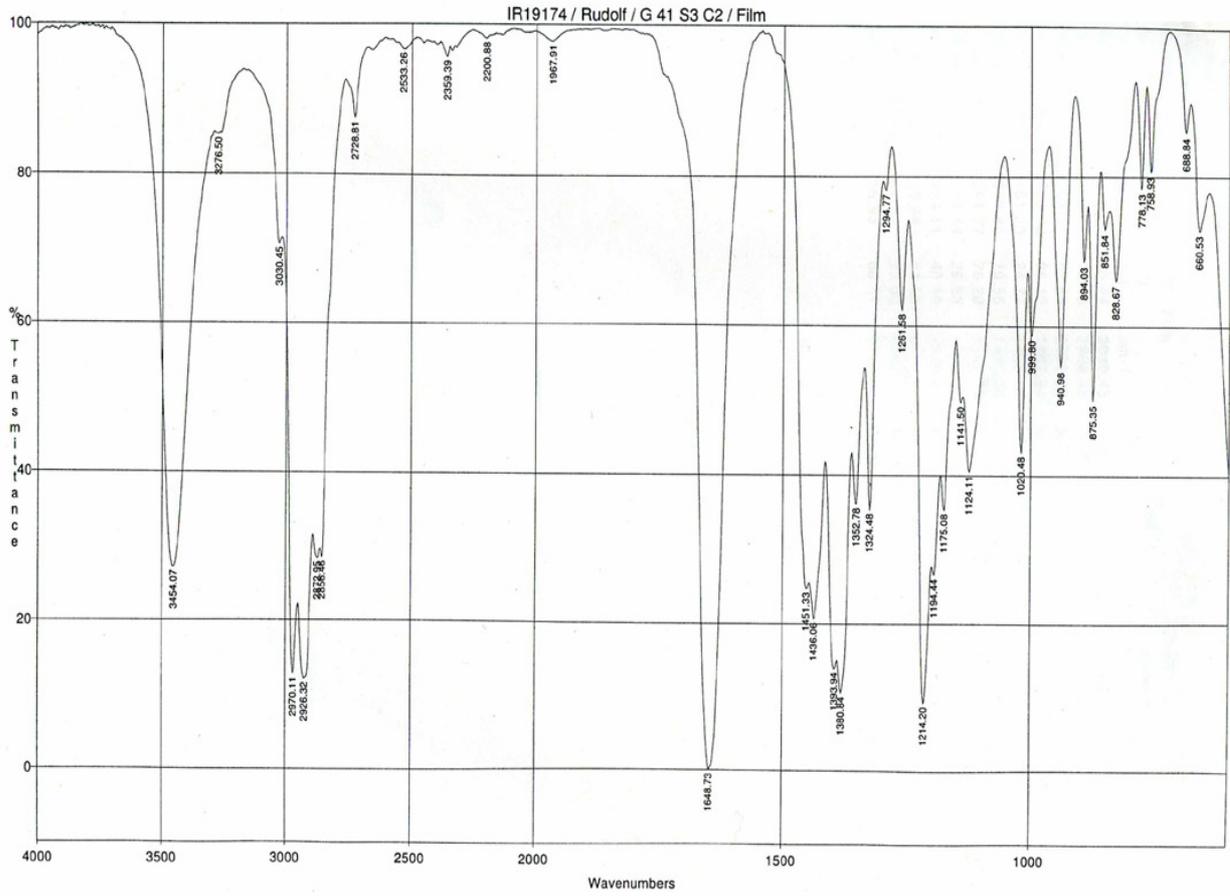
Nayal, R., Melzig, M.F.: *L. dulcis* Trev. An Aztecan sweet herb of potential interest. 55th International Congress and Annual Meeting of the Society for Medicinal Plant Research (GA). Graz, Austria 2007. September 2- 6.

Nayal, R., Melzig, M.F.: Investigations of cytotoxicity of *Lippia dulcis* Trev. on the human hepatoma cell line HepG2. 7th Joint Meeting of AFERP, ASP, GA, PSE & SIF. Athens, Greece 2008. August 3- 8.

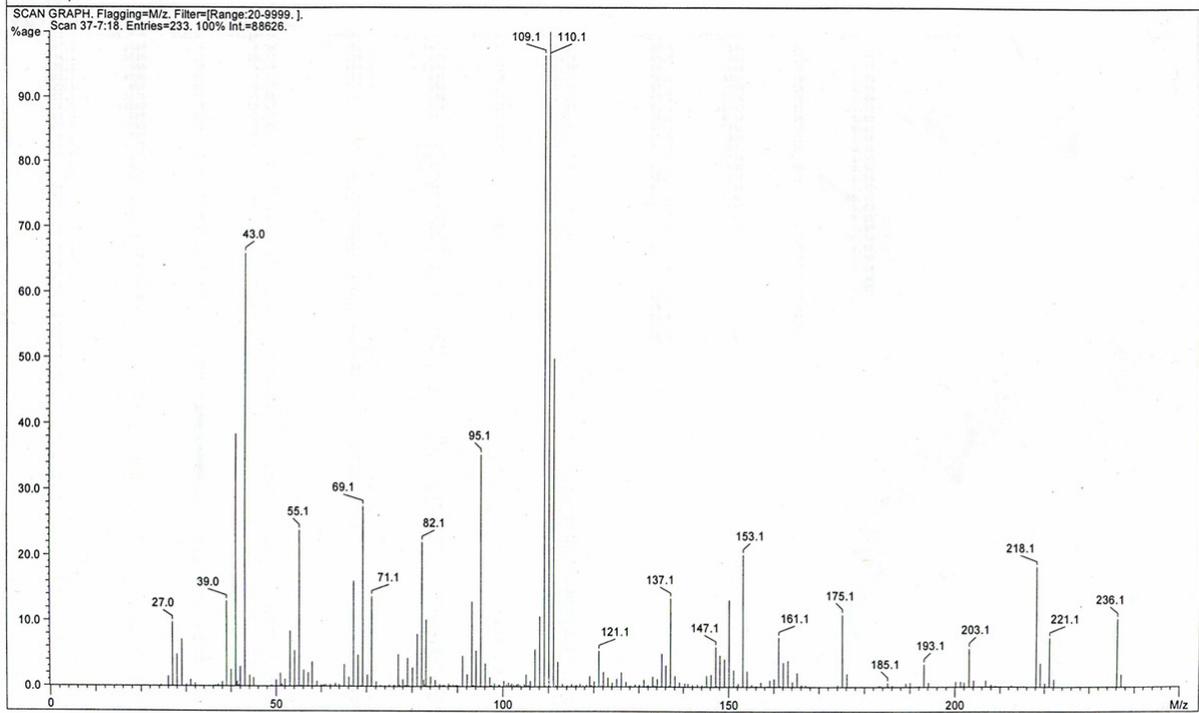
Nayal, R., Melzig, M.F.: Cytotoxicity of *Lippia dulcis* Trev. herb extracts to human hepatocellular carcinoma cell lines. Scientific Meeting of Syrian Students in Germany. Berlin, Germany 2009. Februar 7.

13. ANHANG

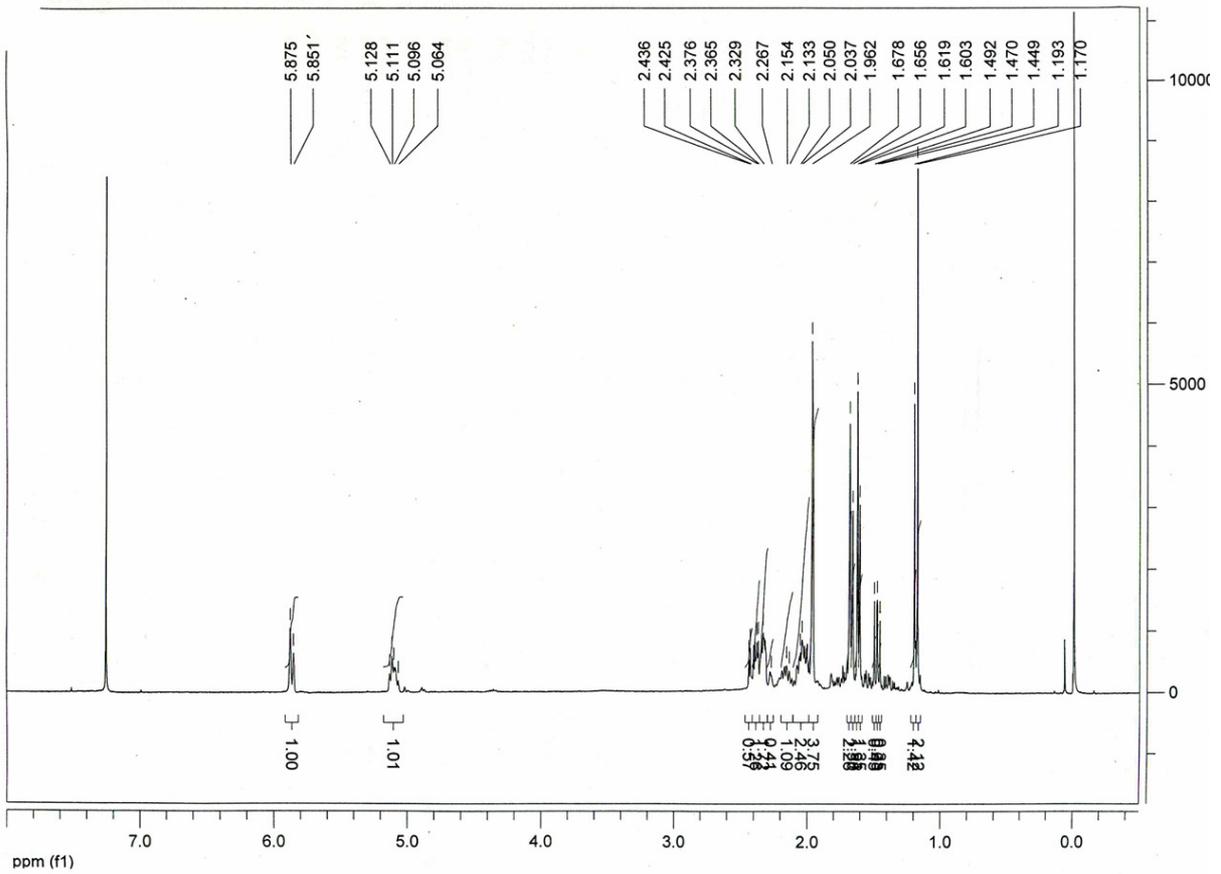
A. Die analytischen Daten vom synthetisierten Hernandulcin

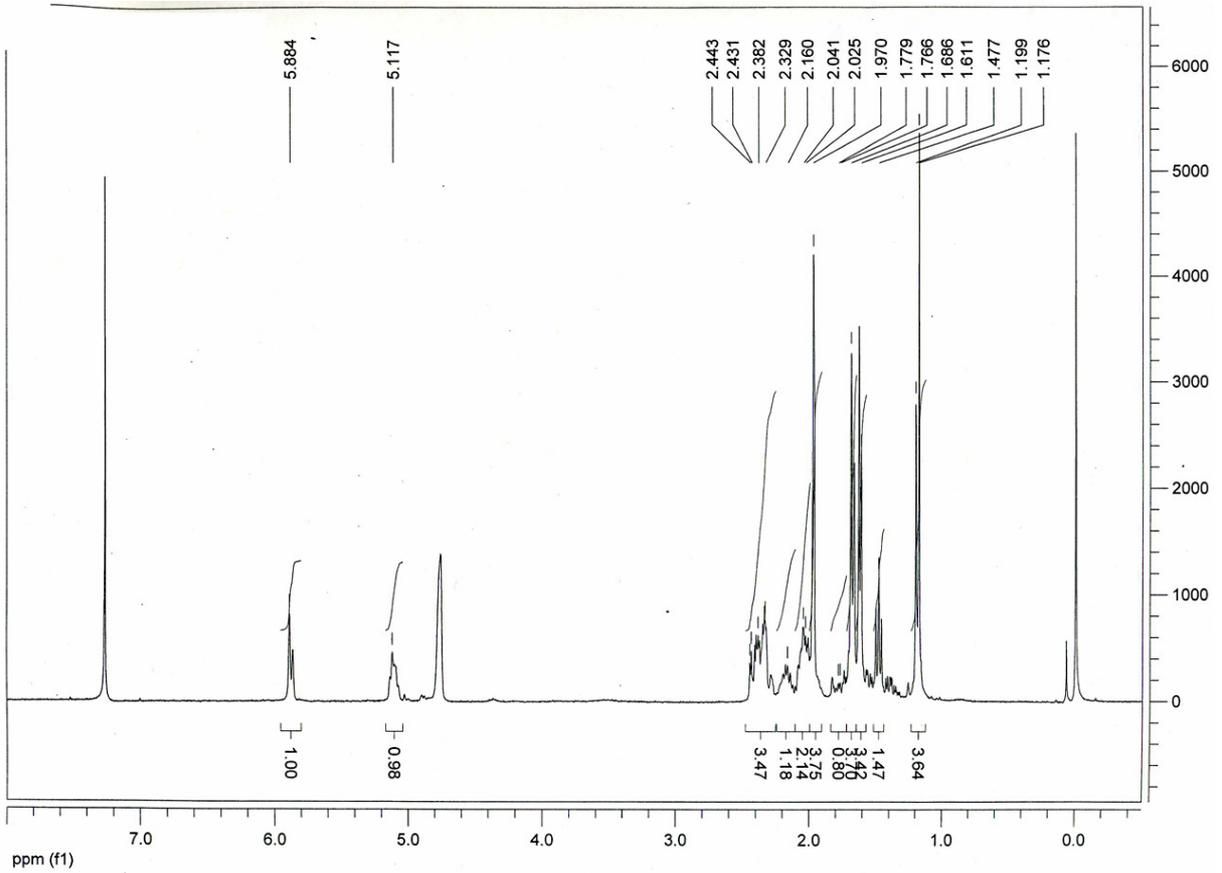
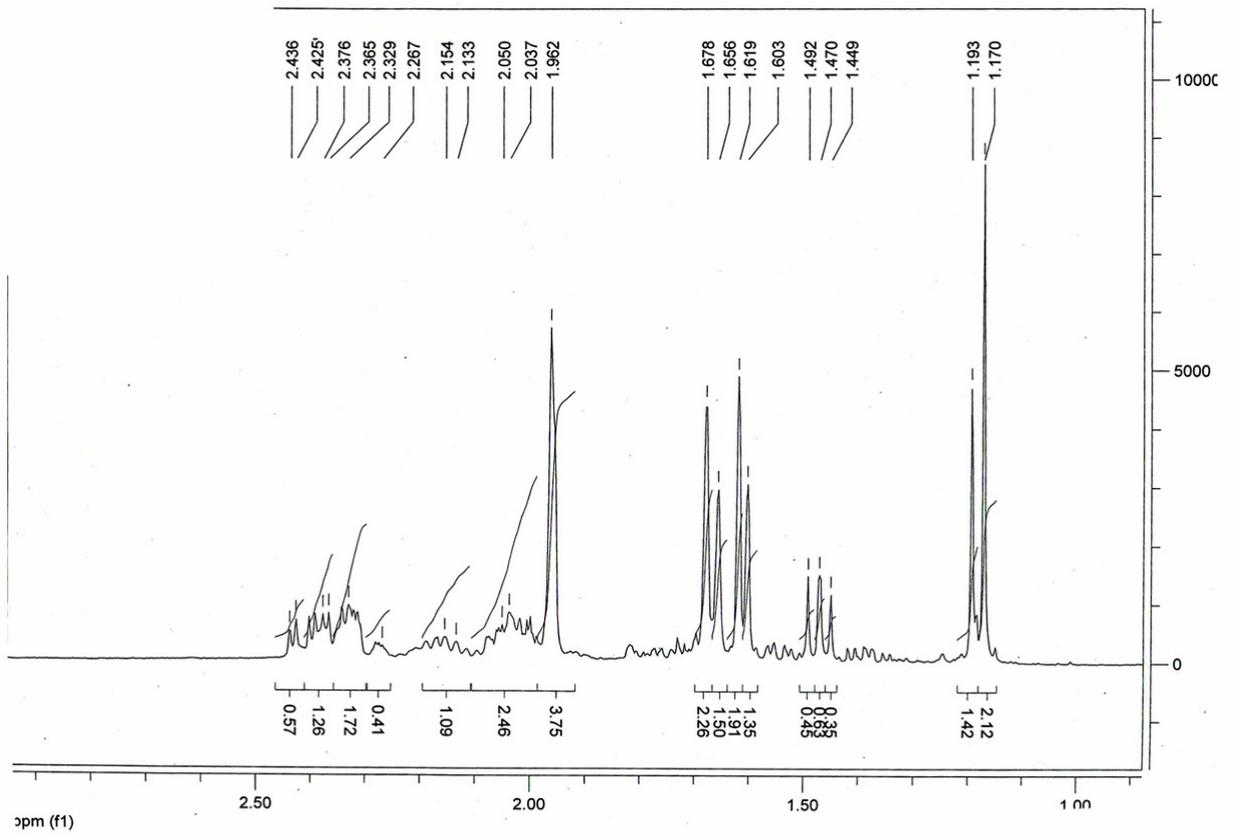


IR-Spektrum von Hernandulcin



MS-Spektrum





NMR-Spektren

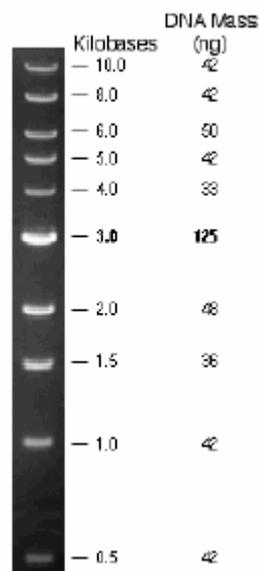
B. Auswertung und Präsentation der Daten in Abschnitt 2.3.11.2

Die Konzentrations-Wirkungs-Kurven wurden entsprechend der *Hill*-Gleichung mit Hilfe der Software (GraphPad Prism 4.0, GraphPad Software, San Diego, CA, USA) ausgewertet um die Parameter E_{\max} (maximaler beobachteter Effekt) und den pEC_{50} (der negative Logarithmus einer Agonisten-Konzentration, die den halbmaximalen Effekt hervorruft) zu ermitteln. Die Antagonistaffinitäten von Atropin und Mepyramin wurden als pA_2 Wert angegeben. pA_2 wurde aus einer einzelnen Antagonisten-Konzentration mit Hilfe folgender Gleichung berechnet:

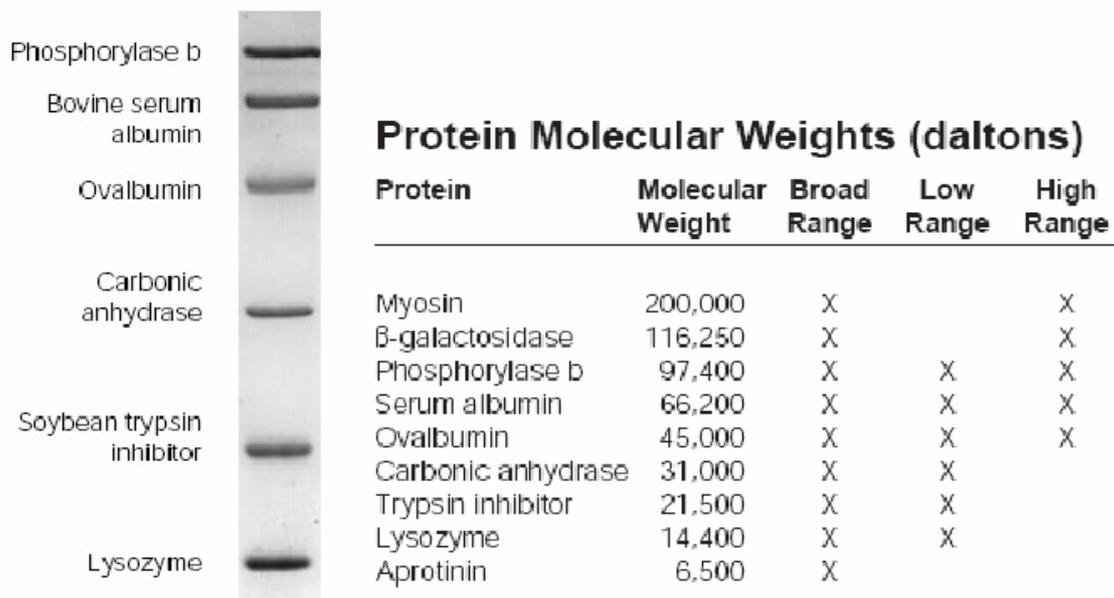
$$pA_2 = -\log[B] + \log(r-1)$$

$[B]$ ist die Molarität des Antagonisten und r ist das Verhältnis der Agonisten- EC_{50} in An- und Abwesenheit des Antagonisten.

C. DNA- und Proteinstandards



1 kb DNA *ladder* auf 1% Agarose (New England Biolab)



Low range molecular weight Proteinstandard in 12% SDS-PAGE (BioRad)

DANKSAGUNG

Die vorliegende Arbeit wurde auf Anregung und unter Leitung von Herrn Prof. Dr. M. F. Melzig am Institut für Pharmazie der Freien Universität Berlin angefertigt. Ihm gilt Mein besonderer Dank für seine stete Bereitschaft zu wissenschaftlichen Diskussionen, seine wertvollen Ratschläge, sowie seine Förderung und Unterstützung meiner Arbeit.

Frau Privat-Dozentin Dr. K. Jenett-Siems danke ich für die rege Diskussionsbereitschaft in der DC Auswertung im Rahmen dieser Arbeit.

Danken möchte ich auch Herrn Professor Dr. H. Pertz und Herrn T. Görnemann für die Durchführung der *in vitro* Bestimmung der spasmolytischen Aktivität des Öls.

Bei Frau Dr. J. Lazar-Schurreit bedanke ich mich für ihre große Hilfsbereitschaft und ihre Unterstützung.

Herrn Prof. E. J. Verspohl und seiner Arbeitsgruppe (Institut für Pharmazeutische und Medizinische Chemie, Münster) danke ich für die Durchführung der Untersuchung an der Rattentrachea.

Herrn Prof. R. Gust und seiner Arbeitsgruppe (Institut für Pharmazie der FU-Berlin) danke ich für die Synthese der Referenzsubstanz Hernandulcin.

Ein herzliches Dankeschön geht an Frau Dr. B. Rennert für ihre Hilfsbereitschaft, die vielen anregenden Gespräche und das Korrekturlesen der Dissertation.

Sehr dankbar bin ich ebenfalls der Universität Aleppo und dem syrischen Hochschulministerium für die Finanzierung meines Aufenthalts in Deutschland während der Doktorarbeit.

Für die Teilfinanzierung dieser Arbeit danke ich der Müggenburg-Stiftung.

Ich danke allen Mitarbeitern der Arbeitsgruppe Pharmazeutische Biologie für die freundliche Zusammenarbeit und die angenehme Arbeitsatmosphäre, besonders danken möchte ich hierbei Frau M. Meyer für ihre praktische Unterstützung bei der Extraktion sowie Frau U. Friedrich für die Einarbeitung im Zelllabor.

Frau E. Christmann-Oesterreich (Institut für Pharmazie der FU-Berlin) danke ich für die gute Zusammenarbeit zu jeder Zeit bei der Durchführung der GC Messungen.

Herrn Dipl.-Biochem. E.-K. Çelik danke ich für seine Hilfsbereitschaft sowie das Korrekturlesen der Dissertation.

Mein größtes Dankeschön geht an meinen Mann Yaser für sein Verständnis und Vertrauen, seine unermüdliche Energie, sein Interesse am Fortgang der Arbeit und seine unbegrenzte Hilfe durch alle Phasen dieser Arbeit. Mein besonderer Dank gilt der Aufsicht unseres kleinen Nabil während des Schreibens dieser Dissertation. Das war sicherlich eine große Herausforderung. Vielen Dank!

Meiner ganzen Familie möchte ich sehr herzlich danken. Ganz besonders geht mein Dank an meine Mutter für ihre fortwährende Unterstützung, sie war mir zu jedem Zeitpunkt eine große Stütze und hat mir wertvolle Tipps gegeben.

Letzlich schulde ich ein Dankeschön an meinen Vater. Wäre er heute noch am Leben, hätte er sich um diese Arbeit sehr gefreut. Meinem Vater sei diese Arbeit gewidmet.

EIDESSTATTLICHE ERKLÄRUNG

Hiermit erkläre ich, dass ich die vorliegende Arbeit selbständig und nur unter Zuhilfenahme der angegebenen Quellen angefertigt habe.

Berlin, 6. März 2009

Ream Nayal