

Lehrstuhl für Phytopathologie  
Technische Universität München

Kooperative Wirkung pflanzlicher Antioxidantien in pathologisch  
relevanten Arteriosklerose- und Arthritismodellen

Dipl.-Ing. agr. (Univ.) Jens Milde

Vollständiger Abdruck der von der Fakultät Wissenschaftszentrum Weihenstephan für Ernährung, Landnutzung und Umwelt der Technischen Universität München zur Erlangung des akademischen Grades eines

Doktors der Naturwissenschaften (Dr. rer. nat.)

genehmigten Dissertation.

Vorsitzender:

Univ.-Prof. Dr. D. Treutter

Prüfer der Dissertation:

1. Univ.-Prof. Dr. E.F. Elstner

2. Univ.-Prof. Dr. G. Rechkemmer

Die Dissertation wurde am 4. Mai 2004 bei der Technischen Universität München eingereicht und durch die Fakultät Wissenschaftszentrum Weihenstephan für Ernährung, Landnutzung und Umwelt am 21. Juli 2004 angenommen.

<b>1</b>	<b>Einleitung</b>	<b>4</b>
<b>2</b>	<b>Material</b>	<b>11</b>
2.1	Chemikalien	11
2.2	Extrakte	13
2.3	Herstellung von Puffern und anderen Lösungen	15
2.4	Geräte	16
<b>3</b>	<b>Methoden</b>	<b>19</b>
3.1	<b>Salix-Extrakte als Antioxidantien in Arthritismodellen</b>	<b>19</b>
3.1.1	Oxidative Hyaluronsäuredepolymerisation	19
3.1.2	Xanthin/Xanthinoxidase-System	21
3.1.3	Extraktanalytik	26
3.1.4	Statistische Auswertung der Meßergebnisse	29
3.2	<b>Lutein und Lycopin als Antioxidantien in einem Arteriosklerosemodell</b>	<b>30</b>
3.2.1	LDL-Isolierung und -Analyse	30
3.2.2	Untersuchungen zur LDL-Oxidation	34
3.2.3	Statistische Auswertung der Meßergebnisse	37
<b>4</b>	<b>Ergebnisse</b>	<b>38</b>
4.1	<b>Salix-Extrakte als Antioxidantien in Arthritismodellen</b>	<b>38</b>
4.1.1	Oxidative Depolymerisation humaner Hyaluronsäure	38
4.1.2	Xanthin/Xanthinoxidase-System	44
4.1.3	Extraktanalytik	58
4.2	<b>Lutein und Lycopin als Antioxidantien in einem Arteriosklerosemodell</b>	<b>72</b>
4.2.1	LDL-Oxidation unter Zugabe von Lycopin oder Lutein	73
4.2.2	LDL-Oxidation nach Vorinkubation des Plasmas mit Lycopin bzw. Lutein	75
<b>5</b>	<b>Diskussion</b>	<b>88</b>
5.1	<b>Salix-Extrakte als Antioxidantien in Arthritismodellen</b>	<b>88</b>
5.2	<b>Lutein und Lycopin als Antioxidantien in einem Arteriosklerosemodell</b>	<b>97</b>
<b>6</b>	<b>Zusammenfassung</b>	<b>102</b>
<b>7</b>	<b>Literatur</b>	<b>103</b>
<b>8</b>	<b>Lebenslauf</b>	<b>114</b>
<b>9</b>	<b>Danksagung</b>	<b>115</b>

## Abkürzungsverzeichnis

ABTS	2,2'-Azinobis(3-Ethylbenzthiazolin-6-Sulfonsäure)
AMD	altersbedingte Makuladegeneration
AU	absorbance units
AUC	area under curve
BSA	Rinderserumalbumin
COX	Cyclooxygenase
DAB	Deutsches Apothekerbuch
DEV	Droge-Extrakt-Verhältnis
DMSO	Dimethylsulfoxid
FPLC	Fast Protein Liquid Chromatography
GC	Gaschromatograph
HPLC	High Performance Liquid Chromatography
HSA	humanes Serumalbumin
i.A.	im Ansatz
KMB	$\alpha$ -Keto- $\gamma$ -S-Methyl-Buttersäure
LDL	low-density lipoprotein
NSAR	nichtsteroidale Antirheumatika
PBS	phosphate buffered saline
PGE <sub>2</sub>	Prostaglandin E <sub>2</sub>
PP	Phosphat-Puffer
ROS	Reaktive Sauerstoffspezies
TEAC	trolox equivalent antioxidant capacity
X	Xanthin
XOD	Xanthinoxidase

# 1 Einleitung

## Reaktive Sauerstoffspezies und ihre Relevanz in der Pathophysiologie von Rheuma und Arteriosklerose

Sauerstoff ist eine Grundlage für höheres Leben. Normalerweise kommt das Gas in der Natur als unreaktives Biradikal vor. Diese Form wird auch als Triplettzustand bezeichnet und ist für Lebewesen weitgehend ungefährlich. Durch verschiedene chemische wie physikalische Modifikationen kann Sauerstoff in mehrere reaktive Spezies (reactive oxygen species, ROS) überführt werden. Hierzu zählen u.a. Singulett-Sauerstoff, Superoxidanionradikal, Wasserstoffperoxid und das extrem reaktive Hydroxylradikal. ROS stellen sowohl im Tier- als auch im Pflanzenreich ein großes Gefahrenpotential z.B. durch Initialisierung von Radikalkettenreaktionen dar. Bei ungebremstem Fortschreiten dieser Reaktionen werden Moleküle, Membranen und damit einhergehend Kompartimentierungen in den Zellen zerstört. Diese sind aber unabdingbar für eine Aufrechterhaltung der Funktion. Das Absterben von Zellen oder ganzer Zellverbände ist die Folge. Aus diesem Grund haben alle Lebewesen im Laufe der Evolution verschiedene Strategien zur Entgiftung von ROS entwickelt. Sie können grundsätzlich in hochmolekulare (z.B. Enzyme wie Katalase) und niedermolekulare Antioxidantien (z.B. Vitamin C) eingeteilt werden (Elstner, 1990, Halliwell und Gutteridge, 1999, Sies, 1991).

Auf der anderen Seite werden ROS vom menschlichen Körper bei der unspezifischen Immunabwehr produziert, z.B. von aktivierten Leukozyten. Dieser Umstand kann bei Autoimmunerkrankungen in betroffenen Geweben zu großen Schäden führen. Bei vielen anderen Erkrankungen sind ROS ebenfalls maßgeblich an der Pathogenese beteiligt, wie z.B. bei Katarakt, altersbedingter Makuladegeneration (AMD), Schlaganfall, neuralen Störungen (Parkinson, Alzheimer) und Krebserkrankungen (Elstner, 1993, Halliwell und Gutteridge, 1999). Auf die Rolle von ROS, insbesondere bei rheumatischen Erkrankungen und bei Arteriosklerose, wird an dieser Stelle näher eingegangen.

Mit dem umgangssprachlichen Begriff Rheuma sind zwei verschiedene Erkrankungen gemeint, die eine ähnliche Symptomatik hervorrufen. Zum einen die Arthrose, ein reiner Verschleiß besonders beanspruchter Gelenke, die vorwiegend

bei älteren Menschen auftritt. Hier kommt es im Laufe der Pathogenese zu lokal begrenzten, entzündlichen Reaktionen in den betroffenen Gelenken (Elstner, 1993). Bei der rheumatoiden Arthritis handelt es sich im Gegensatz dazu um eine chronisch entzündliche Autoimmunerkrankung der Bindegewebszellen, die systemisch auftritt. Die aus diesem Grund auch chronische Polyarthritits genannte Krankheit richtet sich v.a. gegen die Synovialmembran der Gelenkinnenhaut. Nahezu alle Gelenke sind dadurch einem ständigen oxidativem Streß durch ROS ausgesetzt. Schäden am Knochen, Knorpel, der Synovialflüssigkeit und –membran, der Kapsel und dem sie umgebenden Gewebe sind die Folge (Abbildung 1). Dies führt letztendlich zu massiven Gelenkdeformationen und starken Schmerzen (Elstner, 1993, Halliwell und Gutteridge, 1999, Pschyrembel, 1998).

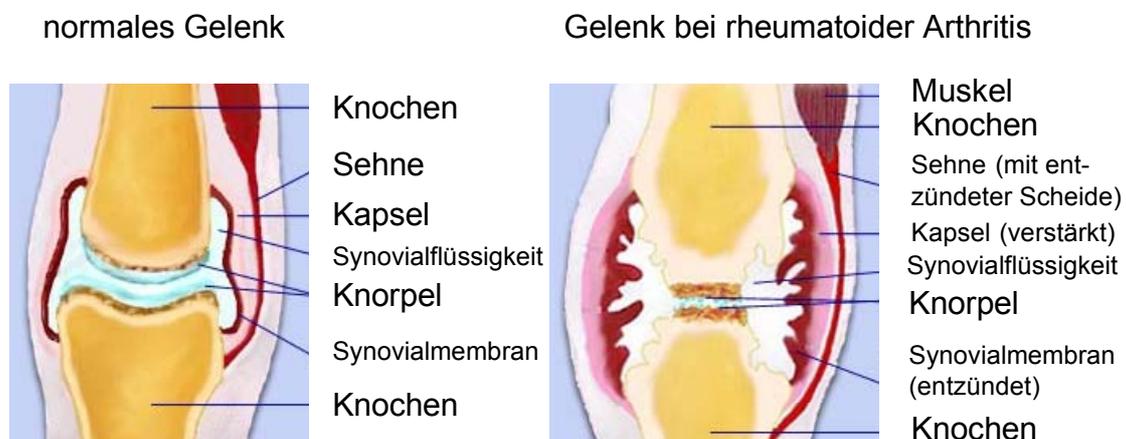


Abbildung 1 Vergleich eines gesunden Gelenks mit einem Gelenk bei rheumatoider Arthritis. (Die Proportionen sind nicht naturgetreu dargestellt.)

(Bildquelle: [www.mydr.com.au/content/images/categories/Arthritis/](http://www.mydr.com.au/content/images/categories/Arthritis/); Stand März 2004)

Die Arteriosklerose ist eine chronisch verlaufende, entzündliche Erkrankung der Arterien, die sich über mehrere Dekaden entwickelt (Soufi et al., 2002). Herzinfarkt und Hirnschlag sind mögliche Konsequenzen bei ausbleibender Behandlung. Eine fortwährende Dysfunktion des Endotheliums ist der erste Schritt dieser Erkrankung. Mögliche Ursachen sind modifiziertes LDL (low-density lipoprotein, Lipoprotein geringer Dichte), erhöhte LDL-Spiegel, freie Radikale (z.B. durch Zigarettenkonsum

verursacht), Diabetes mellitus, Bluthochdruck, genetische Prädisposition, erhöhte Homocysteinwerte im Plasma oder eine Kombination genannter und weiterer Faktoren. Eine gesteigerte Permeabilität des Endotheliums führt zum Eindringen v.a. von LDL in die Intima. Dort unterliegen sie einer langsamen Oxidation. Oxidiertes LDL fördert die Bildung von Atheromen, so wirkt es z.B. chemotaktisch auf Monozyten, die ebenfalls in die Intima eindringen können (Berliner und Heinecke, 1996). Dort zu Makrophagen differenziert, nehmen sie oxidiertes LDL unkontrolliert über den Scavenger-Rezeptor auf. Ein Absterben der Makrophagen und die Bildung von Schaumzellen sind die Folge. Erste Läsionen entstehen, die sich später durch viele andere Begleiterscheinungen zu Plaques (Abbildung 2) entwickeln können (Ross, 1999).

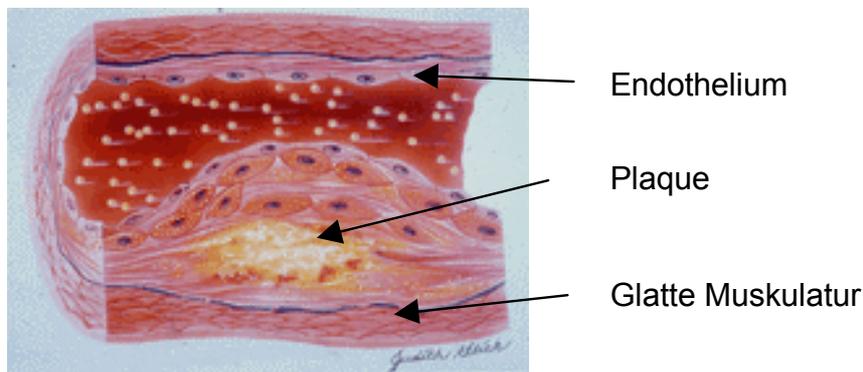


Abbildung 2 Gefäßlängsschnitt mit Plaque  
(Quelle: [www.deutsche-gefaessliga.de/bilder/Schema-Atherosklerose.gif](http://www.deutsche-gefaessliga.de/bilder/Schema-Atherosklerose.gif); Stand März 2004)

Minimal oxidiertes LDL ist überdurchschnittlich an der Entstehung von Läsionen beteiligt, da es vom Körper im Plasma noch nicht als oxidiert erkannt wird. Im Gegensatz dazu hat oxidiertes LDL eine äußerst geringe Halbwertszeit im Plasma, bei Ratten z.B. nur wenige Minuten (Steinberg, 1997). Minimal oxidiertes LDL trägt aber bereits verschiedene ROS, wie z.B. Lipidperoxide, in sich, so daß sie auf diesem Wege erst in die Intima eingeschleust werden und die LDL-Oxidation beginnen kann. Aus diesem Grund ist eine Erhöhung der endogenen Antioxidantiengehalte und eine Steigerung der Oxidationsresistenz von LDL für die Arterioskleroseprävention durchaus von Bedeutung.

### Salix und dessen Extrakte in der Rheumatherapie

Die heute üblichen Antirheumatika sind sowohl Basis- als auch Akuttherapeutika, wobei erstere zu den krankheitsmodulierenden Substanzen, wie Chloroquin, gehören. Bei Letzteren wird zwischen Glucocorticoiden (z.B. Prednison) und nichtsteroidalen Antirheumatika (NSAR) unterschieden. Sie haben keinen krankheitsmodulierenden Einfluß, sondern behandeln nur die Symptome der chronischen Entzündung. NSAR wirken größtenteils über eine mehr oder weniger spezifische Hemmung von COX-2 (z.B. Celecoxib). Der Wirkmechanismus verschiedener Pflanzenextrakte, wie z.B. von *Salix*-Extrakten, die ebenfalls in diese Gruppe gehören, ist aber bis heute oftmals noch ungeklärt.

Eine der ältesten und wohl auch bekanntesten analgetischen und antirheumatischen Arzneidroge ist die Weidenrinde. Sie fand bereits bei Dioskurides und Hippokrates als Droge Erwähnung und die Kräuterbücher des 16. und 17. Jahrhunderts empfehlen sie als Fiebermittel (Hiller und Melzig 2000, Krüger 2000). Zulässig für den therapeutischen Einsatz sind u.a. *S. daphnoides*, *S. purpurea* und *S. fragilis* (Abbildung 3).



Abbildung 3 *Salix spec.*

(Quelle: [www.lysator.liu.se/runeberg/nordflor/379.html](http://www.lysator.liu.se/runeberg/nordflor/379.html);  
Stand März 2004))

Kennzeichnend für *Salix*-Extrakte sind Gehalte an Salicylalkoholderivaten von 1,5% bis über 11% mit nach Stammpflanze unterschiedlicher Zusammensetzung (Europäisches Arzneibuch 2002: min. 1,5% berechnet als Salicin) (Wichtel, 1997). Weiden sind in Europa, Asien und z.T. auch in Nordamerika beheimatet. Neben den oben bereits erwähnten Salicylaten weisen sie ein sehr breites Inhaltsstoffspektrum mit vielen Phenolen (z.B. Kaffeesäure) und Flavonoiden (z.B. Quercetinglycoside) auf. Der Gerbstoffanteil liegt zwischen 8% und 20%.

Hinweise auf schwerwiegende Nebenwirkungen bei Einnahme von *Salix*-Extraktpräparaten liegen nicht vor. Möglich sind jedoch gastrointestinale Beschwerden, die auf den Gerbstoffgehalt der Droge zurückzuführen sind (Wichtel, 1997). Die mittlere Tagesdosis soll 60 bis 120 mg Gesamtsalicin entsprechen (Monographie der Kommission E, 1984).

Ziel dieser Arbeit ist es, mögliche Wirkmechanismen der *Salix*-Extrakte bei der Rheumatherapie aufzuzeigen, da eine reine COX-Hemmung mittlerweile ausgeschlossen werden kann (Wagner et al., 2003). Diese Wirkmechanismen sollen dann mit bestimmten Inhaltsstoffen in Zusammenhang gebracht werden.

### Lycopin bzw. Lutein und ihre Bedeutung für den Menschen

Carotinoide sind in Flora und Fauna weitverbreitete Pigmente, von denen im Augenblick etwa 650 verschiedene bekannt sind. Für den Menschen haben insbesondere Carotinoide mit Provitamin-A-Charakter große Bedeutung. Sie sind ernährungsbedingt fast ausschließlich pflanzlichen Ursprungs, wenngleich auch Bakterien und Pilze zu ihrer Synthese befähigt sind. Aber auch andere Carotinoide sind für unsere Gesundheit und volle Leistungsfähigkeit wichtig, wie z.B. Lutein und Zeaxanthin für das Auge (Watzl und Bub, 2001, Löffler und Petrides, 2003, Karlson, 1994).

Das C-40 Grundgerüst von Carotinoiden ist aus acht Isoprenresten symmetrisch aufgebaut. Sie zählen zu den Tetraterpenen. Die Farbe reicht von Gelb bis Rot und ist bedingt durch eine unterschiedlich große Zahl an konjugierten Doppelbindungen. Durch Kopf-an-Kopf-Kondensation von zwei Molekülen Tetraprenyldiphosphat (C-20) entsteht Phytoen (C-40). Hiervon ausgehend kommt es durch weitere Kondensationen und Additionen zur Bildung verschiedenster Verbindungen, die grundsätzlich in Carotine (reine Polyenkohlenwasserstoffe) und Xanthophylle (sauerstoffhaltige Carotinoide) eingeteilt werden können (Karlson, 1994).

Lycopin zählt zu den offenkettigen Carotinen und besitzt 11 konjugierte und 2 isolierte Doppelbindungen (Abbildung 4). Bei Lutein sind die Enden der Polyprenylketten zu Ringen geschlossen und an Position 3 und 3' Hydroxylgruppen addiert. Lutein hat 9 völlig konjugierte Doppelbindungen (Abbildung 5). Die Doppelbindung der  $\beta$ -Endgruppe ist aus sterischen Gründen nur teilweise konjugiert (Landrum und Bone, 2001).

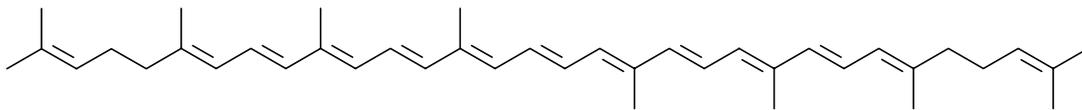


Abbildung 4 Lycopin:  $\Psi, \Psi$ -Carotin

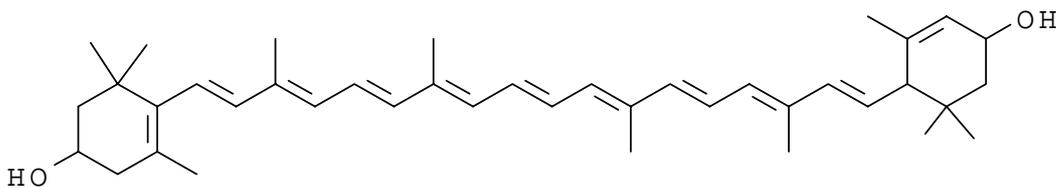


Abbildung 5 Lutein:  $\beta, \epsilon$ -Carotin-3,3'-Diol

Wie oben bereits erwähnt, nimmt Lutein für die Funktionsfähigkeit des Auges eine entscheidende Rolle ein. Es wird neben Zeaxanthin und Meso-Zeaxanthin selektiv in die Makula eingebaut. Dort fungiert es als effektiver Filter für energiereiches Blaulicht, das sonst zur Bildung von ROS, wie Singulett-Sauerstoff, führt (Krinsky, 2002). Es wirkt also als „natürliche Sonnenbrille“ im Auge. Die Beobachtung, daß mit zunehmendem Lebensalter und v.a. bei AMD-Patienten geringere Konzentrationen von Lutein gefunden werden, läßt den Schluß zu, daß es einen Zusammenhang zwischen niedrigeren Gehalten an makulärem Pigment und einem erhöhten Risiko für AMD gibt (Pauleikhoff et al., 2001, Richter et al., 2002).

Lycopin gilt ebenfalls als ein potenter Quencher von Singulett-Sauerstoff, aber auch als guter Radikalfänger (Stahl und Sies, 1996). Es ist im Gewebe nicht gleich verteilt, sondern akkumuliert bevorzugt in der Leber oder den Hoden (Watzl und Bub, 2001,

Stahl et al., 1992, Kaplan et al., 1990). Potentiell gesundheitsfördernde Effekte von Lycopin wurden in Bezug auf das Prostatakrebsrisiko und bei oxidativem Streß in der Haut, ausgelöst durch UV-Strahlung, festgestellt (Stahl und Sies, 1996). Die Datengrundlage für einen inversen Zusammenhang von Lycopinaufnahme und Magen- und Brustkrebsrisiko ist noch widersprüchlich (Johnson, 2002).

Ziel dieser Arbeit ist es, das Verhalten von Lycopin und Lutein während der Lipidperoxidation zu beobachten. LDL wird oxidiert, so daß aus den *in vitro*-Ergebnissen Rückschlüsse auf ein mögliches antioxidatives Verhalten bei atherogenen Vorgängen *in vivo* gezogen werden können.

## 2 Material

### 2.1 Chemikalien

Verbindung	Abkürzung/Formel	M [g/mol]	Firma	Artikelnr.
Acetonitril	CH <sub>3</sub> CN	41,05	Merck	1.13358.2500
Ascorbinsäure	C <sub>6</sub> H <sub>7</sub> O <sub>6</sub> Na	198,10	Sigma	A-7631
BIO-RAD Protein Assay			BIO-RAD	500-0006
(+/-)-Catechin	C <sub>15</sub> H <sub>14</sub> O <sub>6</sub>	290,30	Sigma	C-0774
β-Carotin	C <sub>40</sub> H <sub>56</sub>	536,90	Sigma	C-9750
Chlorogensäure	C <sub>16</sub> H <sub>18</sub> O <sub>9</sub>	354,30	Sigma	C-3878
Dichlormethan	CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>	84,93	Merck	1.06044.2500
Dimethylsulfoxid	DMSO	78,13	Riedel-de Haën	34915
Dinatriumhydrogenphosphat-Dihydrat	Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> * 2H <sub>2</sub> O	177,99	Merck	1.06346.1000
(-)-Epicatechin	C <sub>15</sub> H <sub>14</sub> O <sub>6</sub>	290,30	Sigma	E-1753
Eisen(II)-Sulfat	FeSO <sub>4</sub> * 7 H <sub>2</sub> O	278,00	Sigma	F-7002
Ethanol	C <sub>2</sub> H <sub>5</sub> OH	46,07	Merck	1.00983.2500
Ethen Prüfgas	C <sub>2</sub> H <sub>4</sub>	28,05	Messer	
Ethylendiaminotetraessigsäure	EDTA	372,24	Merck	1.08418.0250
Ferulasäure	C <sub>10</sub> H <sub>10</sub> O <sub>4</sub>	194,20	Sigma	F-3500
Hexan	C <sub>6</sub> H <sub>14</sub>	86,18	Merck	1.04374.2500
Hyaluronsäure		ca. 10 <sup>7</sup>	Sigma	H-1876

Verbindung	Abkürzung/Formel	M [g/mol]	Firma	Artikelnr.
Hydroxylamin	NH <sub>2</sub> OH	69,49	Sigma	H-9876
Isoquercitrin	C <sub>15</sub> H <sub>10</sub> O <sub>6</sub>	464,38	Roth	6527.1
Kämpferol	C <sub>21</sub> H <sub>20</sub> O <sub>13</sub>	286,24	Roth	5859
α-Keto-γ-S-Methyl- Buttersäure	C <sub>5</sub> H <sub>7</sub> O <sub>3</sub> SNa	170,20	Sigma	K-6000
Kaffeensäure	C <sub>9</sub> H <sub>8</sub> O <sub>4</sub>	180,20	Sigma	C-0625
Kaliumbromid	KBr	119,01	Merck	1.04905.0500
Kupfer(II)-sulfat Pentahydrat	CuSO <sub>4</sub> * 5 H <sub>2</sub> O	249,68	Fluka	211456 1081
(+)-Limonen	C <sub>10</sub> H <sub>16</sub>	136,20	Sigma	L-2129
Lutein	C <sub>40</sub> H <sub>56</sub> O <sub>2</sub>	568,9	AquaNova	
Lycopin	C <sub>40</sub> H <sub>56</sub>	536,85	AquaNova	
Methanol	CH <sub>3</sub> OH	32,04	Merck	1.13351.2500
Naphtylethylendi- amindihydrochlorid	C <sub>12</sub> H <sub>14</sub> N <sub>2</sub> * 2 HCl	259,20	Sigma	N-9125
Natriumchlorid	NaCl	58,44	Merck	1.06404.5000
Natriumdihydrogen- phosphat- Monohydrat	NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> * H <sub>2</sub> O	137,99	Merck	1.06346.1000
Natriumhydroxid	NaOH	40,00	Merck	1.06498.1000
Natriumsulfat	Na <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	142,00	Sigma	S-6264
Quercetin	C <sub>15</sub> H <sub>10</sub> O <sub>7</sub>	338,27	Merck	75421930
Rinderserumalbu- min	BSA		Sigma	A-2153
Rutin	C <sub>27</sub> H <sub>30</sub> O <sub>16</sub> * 3 H <sub>2</sub> O	664,60	Sigma	R-9000

Verbindung	Abkürzung/Formel	M [g/mol]	Firma	Artikelnr.
Saccharose	C <sub>12</sub> H <sub>22</sub> O <sub>11</sub>	342,30	Fluka	84100
Salicin	C <sub>13</sub> H <sub>18</sub> O <sub>7</sub>	286,30	Sigma	S-0625
Salicylsäure	C <sub>7</sub> H <sub>6</sub> O <sub>3</sub>	138,10	Sigma	S-6271
Saligenin	C <sub>7</sub> H <sub>8</sub> O <sub>2</sub>	124,10	Sigma	S-0503
Salzsäure 32%	HCl	36,46	Merck	1.00319.2500
Sulfanilamid	C <sub>6</sub> H <sub>8</sub> N <sub>2</sub> O <sub>2</sub> S	172,20	Sigma	S-9251
α-Tocopherol	C <sub>29</sub> H <sub>50</sub> O <sub>2</sub>	430,70	Sigma	T-3251
α-Tocopherolacetat	C <sub>31</sub> H <sub>52</sub> O <sub>3</sub>	472,70	Sigma	T-3376
Trolox	C <sub>14</sub> H <sub>18</sub> O <sub>4</sub>	250,29	Aldrich	23,881-3
Tween 20	C <sub>58</sub> H <sub>114</sub> O <sub>26</sub>	1227,72	Merck	8.22184.0500
Ubichinon	C <sub>59</sub> H <sub>90</sub> O <sub>4</sub>	863,40	Sigma	C-9538
Wasserstoffperoxid (30%)	H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	34,00	Merck	1.08597
Xanthin	C <sub>5</sub> H <sub>3</sub> N <sub>4</sub> O <sub>2</sub> Na	174,10	Sigma	X-2502
Xanthinoxidase	XOD		Roche	110 434

## 2.2 Extrakte

Die verwendeten Weidenrindentrockenextrakte und die Auszüge aus Brennessel und Teufelskralle stammen von der Firma Steigerwald Arzneimittelwerke GmbH, Darmstadt. Die *Salix spec.*-Extrakte werden durchgehend von 3001 bis 3021 nummeriert. Die Herkunft entspricht den Anforderungen des DAB, d.h. es kommt Rinde der Spezies *S. daphnoides*, *S. purpurea* und *S. fragilis* zum Einsatz. Nähere Angaben des Herstellers sind der Tabelle 1 zu entnehmen.

Tabelle 1 Angaben über Droge-Extrakt-Verhältnis (DEV), Hilfsstoffe, Extraktionsmittel und Code-Nummer.

Code Nr.	STW Code	Bemerkungen	Extraktionsmittel	DEV	Träger %	Träger %
3001	STW 33-I		H <sub>2</sub> O	16 – 23:1	3,00 Sil.	1,2 Mag.
3002	STW 33-I		H <sub>2</sub> O	16 – 23:1	3,00 Sil.	1,2 Mag.
3003	STW 33-I		H <sub>2</sub> O	16 – 23:1	3,00 Sil.	1,2 Mag.
3004	-		H <sub>2</sub> O	5 – 10:1	20 Ac.	20 Pov.
3005	STW 33-I		H <sub>2</sub> O	16 – 23:1	3,00 Sil.	1,2 Mag.
3006	STW 33-I		H <sub>2</sub> O	16 – 23:1	3,00 Sil.	1,2 Mag.
3006		Unterfraktionen von 3006	Toluol		nat.	-
3006			Ethylacetat		nat.	-
3006			Butanol		nat.	-
3006			Ethanol		nat.	-
3006			H <sub>2</sub> O		-	-
3007	(STW 33-I)		H <sub>2</sub> O	16 – 23:1	nat.	-
3008	STW 33-I		H <sub>2</sub> O	16 – 23:1	3,00 Sil.	1,2 Mag.
3009	STW 33-A		70% EtOH	8 – 14:1	nat.	-
3010	STW 33-I		H <sub>2</sub> O	16 - 23:1	3,00 Sil.	1,2 Mag.
3011	STW 33-I		H <sub>2</sub> O	16 - 23:1	3,00 Sil.	1,2 Mag.
3012	STW 33-I		H <sub>2</sub> O	16 - 23:1	3,00 Sil.	1,2 Mag.
3013	-		H <sub>2</sub> O	6 – 14:1	<0,5 Sic.	-
3014	-		H <sub>2</sub> O	6 – 14:1	10-30 Mal.	-
3015	-		H <sub>2</sub> O	5 – 10:1	20 Ac.	20 Pov.
3016	-	<i>Salix purp.</i>	H <sub>2</sub> O	16 - 23:1	43 Mal.	-
3017	-	<i>Salix purp.</i>	H <sub>2</sub> O	16 - 23:1	50 Mal.	-
3018	-		H <sub>2</sub> O	8 –14:1	3 Sil.	-
3019	-		H <sub>2</sub> O	16 – 23:1	3,00 Sil.	1,25 Mag.
3020	-	Laborcharge	H <sub>2</sub> O	16 – 23:1	nat.	-
3021	-	Laborcharge	H <sub>2</sub> O	16 – 23:1	nat.	-
-	STW 37	Teufelskralle	60% EtOH	4,4 –5,0:1	nat.	-
-	STW 38	Brennessel	95% Prop	19 –33:1	nat.	-

Genauere Angaben zu den Hilfsstoffen aus Tabelle 1:

- Mag.: Magnesium Stearate Ph Eur 3rd ed Suppl 2001 (lt. Analysezertifikat des Herstellers)
- Sil.: Silicium Dioxide Ph Eur 3rd ed Suppl 1997 (lt. Analysezertifikat des Herstellers)
- Sic.: Silica colloidalis anhydrica Ph Eur (lt. Analysezertifikat des Herstellers)
- Ac.: Acaciae gummi Ph Eur (lt. Hersteller-Spezifikation, m/m)
- Pov.: Povidonium Ph Eur (lt. Hersteller-Spezifikation, m/m)
- Mal.: Maltodextrin Ph Eur bzw. USP (lt. Hersteller-Spezifikation)
- nat.: Nativextrakt

Von Extrakt 3006 wurden verschiedene Unterfraktionen mit immer hydrophileren Lösungsmitteln (Toluol, Ethylacetat, Butanol, Ethanol, Wasser) hergestellt. Die entsprechenden Unterfraktionen haben im Folgenden neben der Nummer als Index das Auszugsmittel angegeben, z.B. 3006<sub>Ethanol</sub> für die mit Ethanol gewonnene Fraktion aus Extrakt 3006.

## 2.3 Herstellung von Puffern und anderen Lösungen

Soweit nicht anders angegeben, werden alle Lösungen mit H<sub>2</sub>O<sub>bidest</sub> hergestellt.

- Phosphatpuffer (0,2 M) verschiedene pH Werte
  - Lösung A: 0,2 M NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (27,9 g/l)
  - Lösung B: 0,2 M Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> (35,6 g/l)Der pH-Wert wird am pH-Meter mit Lösung A bzw. Lösung B eingestellt.
- PBS für LDL-Oxidation
  - 9 g NaCl werden in 100 ml Phosphatpuffer (0,2 M; pH 7,4) gelöst und mit H<sub>2</sub>O auf 1 l aufgefüllt.
- Dichtelösungen für LDL-Isolation
  - Dichtelösung A: 40,0 g KBr und 0,5 g EDTA ad 500 ml H<sub>2</sub>O lösen. Die Dichte muß 1,080 g/ml betragen.
  - Dichtelösung B: 25,0 g KBr und 0,5 g EDTA ad 500 ml H<sub>2</sub>O lösen. Die Dichte muß 1,050 g/ml betragen.
  - Dichtelösung C: 0,5 g EDTA ad 500 ml H<sub>2</sub>O lösen. Die Dichte beträgt 1,000 g/ml.
- Phosphatpuffer für FPLC
  - Phosphatpuffer (0,2 M, pH 6,8) wird in gleichen Teilen mit Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (0,2 M) gemischt.

## 2.4 Geräte

### Gaschromatograph

Star 3400 CX; Varian

Shimadzu Integrator C-R6A Cromatopac

Säule: 1/8 Zoll x 60 cm Aluminiumoxid

Detektor: FID

### High Performance Liquid Chromatography (HPLC)

#### Apparatur I

Steuerungseinheiten:	Waters 600 Controller
Probengeber:	Waters 717plus Autosampler
Probenschleife:	20 µl
Säulenofen:	K 5 TechLab
Detektor:	Waters 474 Scanning Fluorescence Detector Waters 996 Photodiode Array Detector
Auswertungssoftware:	Waters Millenium Version 3.05.01

#### Apparatur II

Pumpe:	Typ 112 Beckman
Probengeber:	ALTEX 210 A Valve Beckman
Probenschleife:	20 µl
Mischkammer:	Typ 340 Beckman
Steuerungseinheit:	Model 420 Beckman
Säulenofen:	TCM Waters
Festwellendetektor:	Typ 160 (Filter 280 nm) Beckman
Integrator:	Chromatopac C-R1B Shimadzu
Auswertungssoftware:	System Gold

## Fast Protein Liquid Chromatography (FPLC)

System Controller Waters 650

Detektor: Lambda-Max Model 481 LC Spectrometer Waters

Probenschleife: 0,5 ml

Säule: Protein Pak Glass 300SW (8,0 x 300 mm) Waters

Auswertungssoftware: Millennium 2.1 Waters

## pH-Meter

Orion Research 701 A Bachhofer

## Photometer

Uvikon 930 Kontron Instruments

Uvikon 922 Kontron Instruments

Ultraspec III Pharmacia LKB

## Vakuumkonzentrator

Rotations-Vakuum-Verdampfer RVC2-18 Christ

## Ultraschallbad

Sonorex RK100H Bandelin

## Waagen

Feinwaage Modell 2474 Sartorius

Waage MC1 Sartorius

## Zentrifugen

Ultrazentrifuge Optima LE-70 Beckman

mit Swinging Bucket Rotor SW 40 Ti

Centrifuge 5810 R Eppendorf

Centrifuge GS-15 Beckman

## 3 Methoden

### 3.1 *Salix*-Extrakte als Antioxidantien in Arthritismodellen

#### 3.1.1 Oxidative Hyaluronsäuredepolymerisation

Hyaluronsäure wird von Bindegewebszellen synthetisiert und sezerniert. Sie kommt daher in der intrazellulären Matrix aller Organe vor. Elastische und gelartige Gewebe, wie der Glaskörper des Auges, die Nabelschnur, Herzklappen oder die Synovialflüssigkeit der Gelenke besitzen einen besonders hohen Anteil an Hyaluronsäure.

Hyaluronsäure (Abbildung 6) ist ein unverzweigtes Glycosaminoglycan aus glycosidisch abwechselnd  $\beta$ -1,3 und  $\beta$ -1,4 verbundener  $\beta$ -D-Glucuronsäure und N-Acetylglucosamin (Balazs et al., 1986).

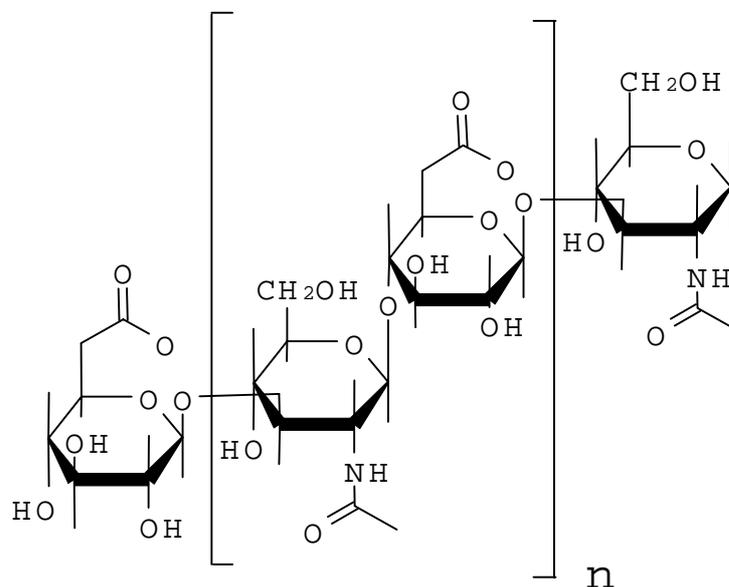


Abbildung 6 Hyaluronsäure

Wässrig gelöst, zeichnet sich das gestreckte Makromolekül durch hohe Viskosität aus. Dies macht Hyaluronsäure in den Gelenkspalten zu einem idealen „Schmiermittel“ (Trommer et al., 2003). Hydroxylradikale, produziert z.B. durch aktivierte Leukozyten in rheumatischen Gelenken, sind in der Lage, Hyaluronsäure oxidativ zu depolymerisieren. Eine Molekulargewichtsverringering, verbunden mit einer Abnahme der

Viskosität und des „Schmiereffektes“, sind die Folge (Balazs, 1967). Auf längere Sicht bleiben Schäden am Knorpel oder sogar am Gelenkknochen nicht aus (Balogh et al., 2003, Elstner, 1993, Lengfelder und Fink, 1987).

*In vitro* wird dieser pathologische Zustand in folgendem Testansatz nachgestellt:

Phosphatpuffer pH7,4	100 mM i.A.
Hyaluronsäure	0,25 mg/ml i.A.
Testsubstanz	verschiedene Konzentrationen
EDTA	0,5 mM i.A.
Fe <sup>2+</sup>	0,5 mM i.A.
⇒ vortexen	
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	0,5 mM i.A.
H <sub>2</sub> O	ad 1ml

Der Ansatz wird für 40 min bei 37 °C inkubiert und anschließend mittels FPLC (Fast Protein Liquid Chromatography) analysiert (modifiziert nach Schempp, 1993). Die Trennung erfolgt bei einer Flußrate von 0,8 ml/min mit 0,1 M Phosphatpuffer (pH 6,8) versetzt mit 0,1 M Sulfat. Bei 230 nm wird der Lauf photometrisch verfolgt.

Ein typisches Chromatogramm ist in Abbildung 7 dargestellt. Je kleiner Moleküle sind, desto länger ist die Retentionszeit. Native Hyaluronsäure wird mit einem Hauptpeak nach ca. 8 min detektiert, gefolgt von zwei weiteren deutlich kleineren Peaks zwischen 15 min und 25 min. Nach einer oxidativen Depolymerisation durch OH-Radikale aus der Fenton-Reaktion verliert der erste Peak an Höhe und ein neuer Peak erscheint bei ca. 20 min, d.h. die ursprünglich vorhandenen Polymere werden zum Großteil in kleinere Bruchstücke gespalten.

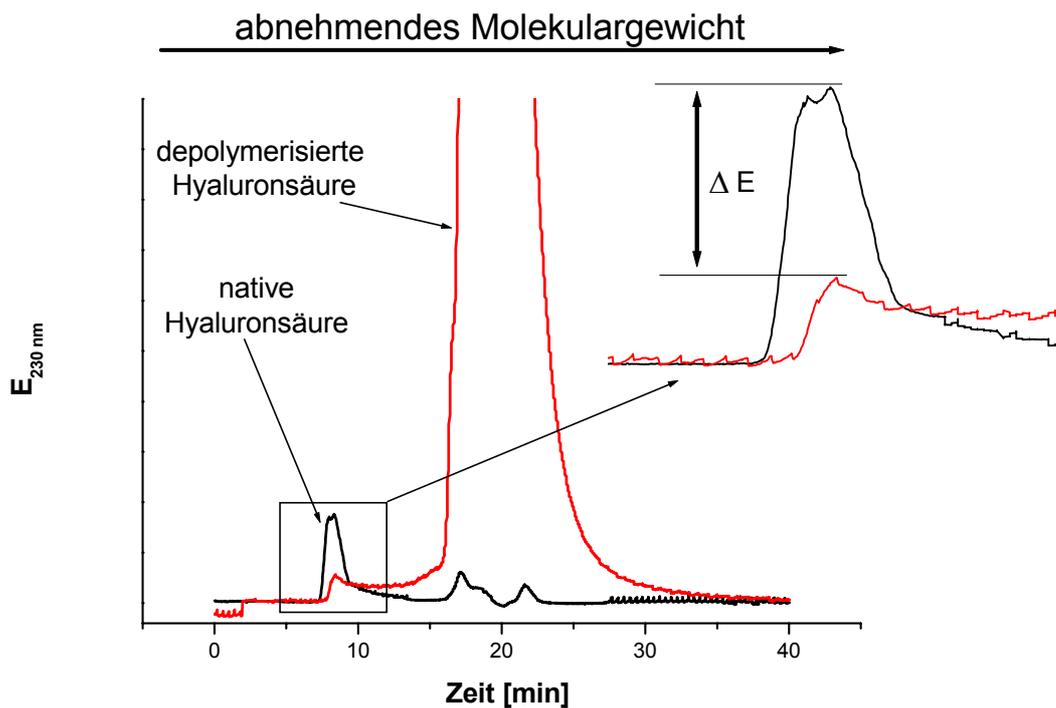


Abbildung 7 Chromatogramm der nach Molekulargröße aufgetrennten Hyaluronsäure nach 40 min Inkubation. Die schwarze Linie zeigt den Kurvenverlauf ohne Oxidans, die rote den bei gleichzeitiger Generierung von Hydroxylradikalen.

### 3.1.2 Xanthin/Xanthinoxidase-System

Das Xanthin/Xanthinoxidase(X/XOD)-System stellt ein biochemisches Testsystem dar, in dem Superoxidanionradikale ( $O_2^{\bullet-}$ ), Wasserstoffperoxid ( $H_2O_2$ ) und, indirekt durch Katalyse mit Übergangsmetallen, Hydroxylradikale ( $\bullet OH$ ) erzeugt werden (Halliwell und Gutteridge, 1999). In der normal oxygenierten Zelle liegt das Enzym hauptsächlich in Form der Xanthindehydrogenase (EC 1.1.1.204) vor. Es katalysiert die Oxidation von Hypoxanthin über Xanthin zu Harnsäure, wobei  $NAD^+$  zu NADH reduziert wird. Unter ischämischen Bedingungen wird aus der Xanthindehydrogenase durch Proteolyse die Xanthinoxidase (XOD). Dieses Enzym bedingt letztendlich, während der Reperfusion, die Oxidation von Xanthin mittels Sauerstoff zu Harnsäure,  $O_2^{\bullet-}$  und  $H_2O_2$  (Abbildung 8) (McCord, 1985).

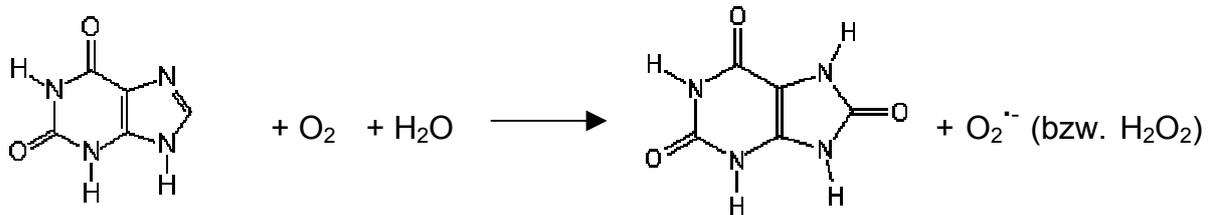


Abbildung 8 Oxidation von Harnsäure durch XOD

Übergangsmetallionen, wie  $\text{Fe}^{3+}$  oder  $\text{Cu}^{2+}$ , die ubiquitär vorhanden sind, führen über den Haber-Weiss-Mechanismus zur Produktion von Hydroxylradikalen (Abbildung 9) (Halliwell und Gutteridge, 1999).

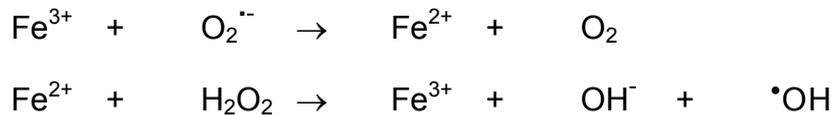


Abbildung 9 Haber-Weiss Reaktionen

Alle oben genannten reaktiven Sauerstoffspezies können *in vivo* zu einer Schädigung führen. Sie sind v.a. an unselektiven und destruktiven Oxidationsprozessen beteiligt. So spielen ROS eine entscheidende Rolle bei der Pathogenese von unzähligen Erkrankungen, wie rheumatoider Arthritis, Athrose, Katarakt, Arteriosklerose, AMD etc. (Elstner, 1993, Halliwell und Gutteridge, 1999).

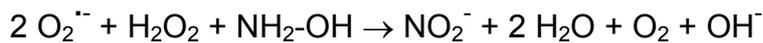
Ischämische Zustände treten im Körper nicht nur bei Thrombosen, Atheromen oder chirurgischen Eingriffen auf, sondern kennzeichnen auch Gelenke mit rheumatoider Arthritis. Besonders bei Bewegung wird eine druckinduzierte Ischämie im Gelenk und dem Synovialspalt erzeugt. Nach der Belastung, also im Zustand der Ruhe, tritt die Reperfusion ein (Blake et al., 1997). Die Patienten durchleben ständig den Zyklus von Ischämie und Reoxygenierung. Sie sind somit einer dauerhaften Produktion von ROS durch XOD ausgesetzt. Das Enzym selbst wurde in den Endothelzellen des Synoviums gefunden (Allen et al., 1987, Stevens et al., 1992).

Antioxidative Substanzen Im X/XOD-System können auf verschiedene Art und Weise wirken. Sie können einerseits direkt Radikalfänger für ROS sein. Um klare Aussagen über eine Probe machen zu können, wird die Oxidation mit verschiedenen Indikator-molekülen durchgeführt. Diese Indikatoren besitzen eine unterschiedliche Selektivität gegenüber verschiedenen ROS. Andererseits kann auch die Aktivität der XOD selbst

allosterisch oder kompetitiv gehemmt werden, wie es z.B. von Allopurinol bekannt ist (Voet et al., 2002). Die Messung der XOD-Aktivität und damit einhergehend eine eventuelle Hemmung oder Stimulierung erfolgt mittels HPLC.

### 3.1.2.1 Oxidation von Hydroxylamin zu Nitrit

Die Oxidation von Hydroxylamin zu Nitrit wird durch Superoxidradikale katalysiert. Die zugrundeliegende Reaktion lautet:



Hydroxylradikale oxidieren Hydroxylamin nicht zu Nitrit, so daß durch dieses Testsystem hauptsächlich Radikalfängereigenschaften gegenüber Superoxidradikalen detektiert werden.

Testansatz:

Phosphatpuffer pH 7,4	100 mM i.A.
Hydroxylamin	1 mM i.A.
Xanthin	0,5 mM i.A.
Testsubstanz	verschiedene Konzentrationen
XOD	0,04 U/ml i.A.
H <sub>2</sub> O	ad 1ml

Die Inkubationszeit beträgt 30 min bei 37 °C im Wasserbad. Das entstandene Nitrit kann durch Bildung eines Azofabstoffes im sauren Reaktionsmilieu photometrisch nachgewiesen werden. Dazu werden 300 µl des Reaktionsansatzes mit 300 µl Sulfanilsäure (1% Sulfanilamid in 8% Salzsäure) und anschließend mit 300 µl Naphtylethylendiamin versetzt, 15 min inkubiert und anschließend bei 540 nm im Photometer analysiert.

Je schwächer die Färbung ausfällt, desto effektiver konnte O<sub>2</sub><sup>•-</sup> abgefangen werden. Gleichzeitig kommt aber auch noch eine Hemmung der Superoxidbildung in Frage (nach Elstner und Heupel, 1976).

### 3.1.2.2 Oxidation von α-Keto-γ-S-Methyl-Buttersäure zu Ethen

Unter dem Einfluß v.a. von Hydroxylradikalen zerfällt α-Keto-γ-S-Methyl-Buttersäure (KMB), wobei unter anderem auch Ethen gebildet wird (Halliwell und Gutteridge, 1999, Beauchamp und Fridovich, 1970). Die Reaktion wird in volumengeeichten und

gasdicht verschlossenen Reagenzgläsern durchgeführt, so daß dieses Gas chromatographisch quantifiziert werden kann.

Testansatz:

Phosphatpuffer pH 7,4	100 mM i.A.
KMB	1 mM i.A.
Xanthin	0,5 mM i.A.
Testsubstanz	verschiedene Konzentrationen
XOD	0,01 U/ml i.A.
H <sub>2</sub> O	ad 2ml

Die Inkubationszeit beträgt 30 min bei 37 °C im Wasserbad. Aus dem Gasraum wird mit einer gasdichten Insulinspritze 1 ml entnommen und in den Gaschromatographen injiziert. Die Trennung wird unter folgenden Bedingungen durchgeführt:

Säulentemperatur:	80 °C
Injektionstemperatur:	80 °C
Trägergas:	Stickstoff (25 ml/min)
Brenngase:	Wasserstoff (25 ml/min) Synthetische Luft (250 ml/min)
Detektionstemperatur:	225 °C

Die Ethenmenge wird nach folgender Formel berechnet:

$$\frac{\text{area} * (\text{Gesamt volumen [ml]} - \text{Probenvolumen [ml]})}{\text{Eichfaktor [ml/pmole]}} = \text{Ethen [pmole]}$$

Der Eichfaktor wird an jedem Versuchstag mit Ethen-Prüfgas ermittelt.

Je mehr Ethen in einem Ansatz detektiert wird, desto weniger wirkt die eingesetzte Testsubstanz der KMB-Oxidation entgegen (Blaurock et al., 1992).

### 3.1.2.3 Hemmung der XOD

Die Enzymaktivität der XOD kann durch verschiedene Inhibitoren, sowohl allosterisch als auch kompetitiv, vermindert werden. Durch diesen Vorgang werden letztendlich weniger ROS gebildet und somit über die oben beschriebenen Nachweisreaktionen

(3.1.2.1 und 3.1.2.2) detektiert. Die Wirkung eines Stoffes, der aufgrund der Ergebnisse aus den Testsystemen eventuell als Radikalfänger eingestuft würde, könnte tatsächlich durch eine Hemmung der XOD-Aktivität hervorgerufen werden. Dies wird in folgendem Ansatz untersucht:

Phosphatpuffer pH 7,4	100 mM i.A.
Xanthin	0,5 mM i.A.
Testsubstanz	verschiedene Konzentrationen
XOD	0,04 U/ml i.A.
H <sub>2</sub> O	ad 1ml

Die Inkubationszeit beträgt 10 min bei 37 °C im Wasserbad. Die Reaktion wird mit 50 µl 10 N Salzsäure abgestoppt. Der Zeitpunkt ist so gewählt, daß das Substrat noch nicht vollständig umgesetzt wurde und sich die Umsatzrate der XOD noch im linearen Bereich befindet. Die Analyse erfolgt mittels HPLC (Apparatur I) unter folgenden Bedingungen:

Flußrate :	1 ml/min
Laufmittel A:	Methanol
Laufmittel B:	NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> (50 mM)
Gradient:	0 min            100% A
	4 min – 6 min    Wechsel auf 100% B
	9 min – 10 min   Wechsel auf 100% A
	20 min            Ende
Säule:	LiChrospher® 60 RP-Select B 5 µm LiChroCART® 125
Säulentemperatur:	35 °C
Detektion:	λ = 275 nm

Die gebildete Harnsäure ist ein Maß für die Aktivität der XOD. Wird im Vergleich zur Kontrolle während der Inkubationszeit weniger Harnsäure produziert, so hemmt die Testsubstanz die XOD-Aktivität.

### 3.1.3 Extraktanalytik

#### 3.1.3.1 Bestimmung des Gerbstoff- und Gesamtsalicingehaltes

Die Ermittlung des Gesamtpolyphenolanteils der einzelnen Extrakte wurde von der Firma Steigerwald Arzneimittelwerk GmbH nach folgender Methode vorgenommen: Es werden 200 mg Weidenrindenextrakt in einem 250 ml Rundkolben mit 150 ml H<sub>2</sub>O versetzt und im Wasserbad 30 min unter Rückfluß extrahiert. Anschließend wird die Probe unter fließendem Wasser gekühlt und quantitativ in einem 250 ml Meßkolben überführt, wobei mit H<sub>2</sub>O nachgewaschen und auf 250 ml aufgefüllt wird. Nach Absetzen fester Bestandteile wird die Flüssigkeit durch eine Glasfritte (0,2 µm) filtriert. Die ersten 50 ml des Filtrats werden verworfen.

5,0 ml Filtrat werden mit 20 ml H<sub>2</sub>O versetzt. 2 ml dieser Lösung werden mit 1 ml Folin-Phenolreagenz sowie 10 ml H<sub>2</sub>O gemischt und mit einer Natriumcarbonatlösung (290 g/l) zu 25 ml verdünnt.

Die Extinktion wird nach 15 min und 30 min bei 715 nm gegen H<sub>2</sub>O als Referenz im Photometer gemessen. Die Auswertung erfolgt in Form von Pyrogalloläquivalenten, die in % (w/w) vom Trockengewicht umgerechnet werden.

Die Messung der Gesamtsalicingehalte wurden ebenfalls von der Firma Steigerwald Arzneimittelwerk GmbH durchgeführt. Die Quantifizierung bedient sich einer Analyse mittels HPLC nach Shao (1991).

#### 3.1.3.2 Inhaltsstoffanalyse

Zur genaueren Charakterisierung der verschiedenen *Salix*-Extrakte werden drei verschiedene Behandlungsvarianten an der HPLC analysiert: eine unbehandelte, eine sauer hydrolysierte und eine alkalisch hydrolysierte Lösung jeder Probe.

##### unbehandelte Variante

5 mg Probe werden in 1,1 ml H<sub>2</sub>O und 0,9 ml Methanol gelöst. Die Flüssigkeit wird durch Filtration (Porengröße 0,22 µm) von unlöslichen Bestandteilen gereinigt.

##### sauer hydrolysierte Variante

5 mg Probe werden in 1,0 ml Salzsäure (0,1 N) gelöst und 60 min bei 80 °C inkubiert. Anschließend wird die Reaktion mit 0,1 ml 1 N Natronlauge gestoppt und mit 0,9 ml

Methanol auf 2 ml Gesamtvolumen aufgefüllt. Die Flüssigkeit wird durch Filtration (Porengröße 0,22 µm) von unlöslichen Bestandteilen gereinigt.

#### alkalisch hydrolysierte Variante

5 mg Probe werden in 1,0 ml Natronlauge (0,1 N) gelöst und 60 min bei 80 °C inkubiert. Anschließend wird die Reaktion mit 0,1 ml 1 N Salzsäure gestoppt und mit 0,9 ml Methanol auf 2 ml Gesamtvolumen aufgefüllt. Die Flüssigkeit wird durch Filtration (Porengröße 0,22 µm) von unlöslichen Bestandteilen gereinigt.

Die Filtrate werden durch HPLC (Apparatur I) unter folgenden Bedingungen getrennt (nach Shao, 1991) und sowohl photometrisch als auch mittels Fluoreszenz analysiert:

Flußrate :	1 ml/min
Laufmittel A:	1,8% Tetrahydrofuran in 0,5% o-Phosphorsäure
Laufmittel B:	Methanol
Gradient:	0 min 100% A
	3 min – 8 min 85% A
	8 min – 20 min 70% A
	20 min – 40 min 60% A
	40 min – 55 min 0% A
	55 min – 60 min 0% A
	60 min – 65 min 100% A
	65 min – 70 min 100% A
Vorsäule:	Superspher <sup>®</sup> 60 RP-Select B LiChroCART <sup>®</sup> 4-4
Säule:	Superspher <sup>®</sup> 60 RP-Select B LiChroCART <sup>®</sup> 250-4
Säulentemperatur:	35 °C
Detektion:	$\lambda = 254 \text{ nm}$
Fluoreszenz Anregung:	275 nm
	Detektion: 360 nm

Zur Identifizierung und Quantifizierung der Peaks in den Chromatogrammen werden folgende Referenzsubstanzen in verschiedenen Konzentrationen unter oben beschriebenen Laufbedingungen mittels HPLC analysiert: Epicatechin, Catechin,

Chlorogensäure, Ferulasäure, Isoquercitrin, Kaffeesäure, Kämpferol, Luteolin, Luteolin-7-Glucosid, Naringenin, Quercetin, Rutin, Salicin, Salicylsäure und Saligenin. Eine Kalibrationsgerade zur Ermittlung der Konzentration in Abhängigkeit von der gemessenen Peakfläche ist am Beispiel des Naringenins dargestellt (Abbildung 10). Für alle anderen Substanzen werden in Tabelle 2 die Regressionsgleichungen mit den dazugehörigen Bestimmtheitsmaßen angegeben. Die Regressionsgeraden gehen nicht durch den Nullpunkt, da dieser nicht kalibriert wurde und die HPLC-Software die optimale Regression für den Kalibrationsbereich automatisch ermittelt.

Tabelle 2 Regressionsgleichungen und Bestimmtheitsmaße für HPLC-Referenzsubstanzen.

Substanz	Regressionsgerade	r <sup>2</sup>
Catechin	area = 3.034e <sup>6</sup> [ml/mg] * c [mg/ml] - 1.302e <sup>5</sup>	0.999
Chlorogensäure	area = 2.211e <sup>7</sup> [ml/mg] * c [mg/ml] - 8.571e <sup>5</sup>	0.999
Epicatechin	area = 3.455e <sup>6</sup> [ml/mg] * c [mg/ml] - 1.286e <sup>5</sup>	0.999
Ferulasäure	area = 3.395e <sup>7</sup> [ml/mg] * c [mg/ml] - 1.311e <sup>6</sup>	0.999
Isoquercitrin	area = 4.871e <sup>7</sup> [ml/mg] * c [mg/ml] - 4.204e <sup>5</sup>	0.995
Kaffeesäure	area = 3.803e <sup>7</sup> [ml/mg] * c [mg/ml] - 1.579e <sup>6</sup>	0.999
Kämpferol	area = 3.023e <sup>5</sup> + 5.789e <sup>7</sup> [ml/mg] * c [mg/ml]	0.990
Luteolin	area = 1.729e <sup>6</sup> + 6.427e <sup>7</sup> [ml/mg] * c [mg/ml]	0.968
Luteolin-7-Glucosid	area = 5.081e <sup>7</sup> [ml/mg] * c [mg/ml] - 1.021e <sup>6</sup>	0.999
Naringenin	area = 1.186e <sup>7</sup> [ml/mg] * c [mg/ml] - 1.532e <sup>5</sup>	0.998
Quercetin	area = 5.788e <sup>7</sup> [ml/mg] * c [mg/ml] - 1.064e <sup>6</sup>	0.999
Rutin	area = 4.572e <sup>7</sup> [ml/mg] * c [mg/ml] - 1.219e <sup>6</sup>	1.000
Salicin	area = 2.298e <sup>6</sup> [ml/mg] * c [mg/ml] - 5.287e <sup>4</sup>	1.000
Salicylsäure	area = 3.275e <sup>6</sup> [ml/mg] * c [mg/ml] - 1.086e <sup>5</sup>	0.999
Saligenin	area = 5.318e <sup>6</sup> [ml/mg] * c [mg/ml] - 2.265e <sup>5</sup>	0.999

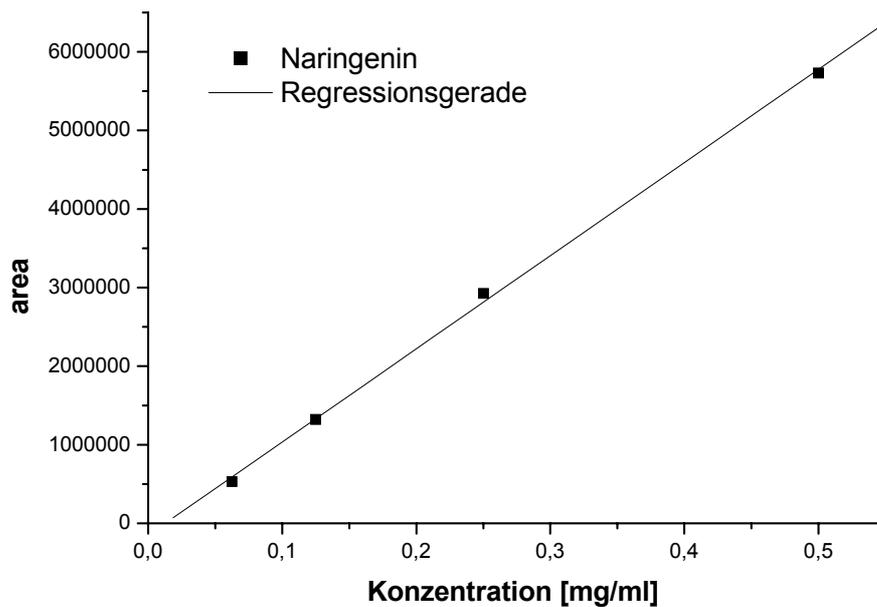


Abbildung 10      Regressionsgerade für Naringenin: Peakfläche in Abhängigkeit von der eingesetzten Konzentration.

### 3.1.4 Statistische Auswertung der Meßergebnisse

Alle Versuche wurden mit mindestens drei Parallelen an zwei verschiedenen Tagen durchgeführt. Die angegebenen Werte stellen Mittelwerte mit zugehöriger Standardabweichung von verschiedenen Versuchstagen dar. Die Versuche zur oxidativen Hyaluronsäuredepolymerisation konnten aus technischen Gründen lediglich mit zwei Messungen an unterschiedlichen Tagen durchgeführt werden, so daß in diesen Abbildungen die beiden Einzelmeßwerte dargestellt sind. Die Auswertung und graphische Darstellung der Meßergebnisse erfolgt rechnergestützt mit folgender Software: Microsoft Word 97, Microsoft Excel 97, Microsoft Powerpoint 97, Microcal Origin 6.1, Isis Draw 1.2.

Signifikante Unterschiede der Meßwerte wurden mit Hilfe des t-Tests ( $p < 0,05$ ) ermittelt.

## **3.2 Lutein und Lycopin als Antioxidantien in einem Arteriosklerosemodell**

### **3.2.1 LDL-Isolierung und -Analyse**

Das Spenderblut stammt von 10 gesunden Personen unterschiedlicher Altersgruppen und unterschiedlichen Geschlechts (5 männlich, 5 weiblich). Zur Gewinnung des Plasmas werden zu 100 ml Blut 4 ml EDTA-Lösung (25 mg EDTA / ml H<sub>2</sub>O) gegeben. Nachdem Blut für 20 min bei 10 °C und 1600 g zentrifugiert wurde, wird das Plasma mit einer Pipette abgezogen. Die Plasmaproben der verschiedenen Probanden werden vereinigt und je 100 ml Plasma werden mit 1 ml 60% Saccharoselösung versetzt. Das gepoolte Plasma wird anschließend mit Stickstoff überschichtet und bei –70 °C gelagert.

Um Testsubstanzen im LDL anzureichern, werden 0,1 bis 0,4 ml der zu untersuchenden Substanz in wässriger Lösung ad 3,1 ml Plasma gegeben. Das Plasma wird anschließend für 1,5 h bei 37 °C am Inkubationsrad inkubiert.

Zur Isolierung des LDL werden in 3 ml Plasma je 1,23 g KBr gelöst, so daß sich eine Dichte von 1,4 g/ml einstellt. Diese 3 ml Plasma werden mit den Dichtelösungen A (2,5 ml), B (2,5 ml) und C vorsichtig überschichtet. Von Dichtelösung C wird soviel zugegeben, bis sie kurz unter den Rand des Zentrifugenröhrchens reicht. Der Ansatz verbleibt für 22 h bei 285.000 g (40.000 U/min) in einem Schwenkkopffrotor in der Ultrazentrifuge. Hier erfolgt die LDL-Isolierung mittels des aufgebauten Dichtegradienten.

Nach Zentrifugation erhält man drei verschiedene Banden im Dichtegradienten: von oben nach unten eine VLDL/Chylomikronen-Bande, eine LDL-Bande und eine HDL-Bande. Die LDL-Bande wird abgenommen und durch einen Sterilfilter (0,2 µm Porengröße) von möglichen Verunreinigungen befreit. Bis zur weiteren Verwendung wird das LDL im Kühlschrank verwahrt. Die Lagerzeit soll eine Dauer von 7 Tagen nicht überschreiten.

Vor den Experimenten wird das LDL in einer EconoPac DG-10 Gelfiltrationssäule (Biorad) von EDTA und KBr entsalzt.

Zur Bestimmung des LDL-Gehaltes in der Probe wird zunächst eine Protein-kalibrationsgerade mit BSA erstellt.

10 µl BSA-Lösung werden mit 200 µl Bio Rad–Protein Assay und 790 µl H<sub>2</sub>O<sub>bidest</sub> für 15 min inkubiert. Die Methode ist der Proteinbestimmung nach Bradford angelehnt, und beruht auf einer Komplexbildung verbunden mit einer Verschiebung des Absorptionsmaximums von 465 nm nach 595 nm (Bradford, 1976). Im Anschluß wird die Extinktion bei 595 nm im Photometer gemessen. Die Proteinkalibrationsgerade ist in Abbildung 11 dargestellt.

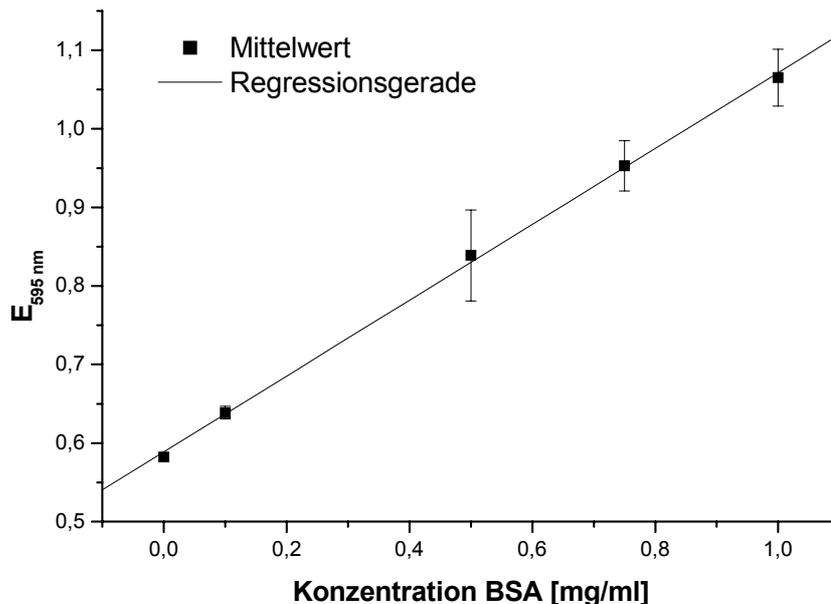


Abbildung 11 Proteinkalibrationsgerade unter Verwendung von BSA als Standard im Bio Rad–Protein Assay. Die Regressionsgleichung ist durch folgende Parameter bestimmt:

$$c(\text{Protein}) [\text{mg/ml}] = (\text{Extinktion} - 0,58869) / 0,48281 [\text{ml/mg}]$$

$$r = 0,99949, p < 0,0001$$

Vor jedem Oxidationsversuch kann nun die LDL-Konzentration bestimmt werden. Dies geschieht über den Proteingehalt (ApoB 100) und mittels des oben beschriebenen Assays.

### Extraktion lipophiler Antioxidantien

250 µl entsalzte LDL-Probe werden zusammen mit 200 µl Ethanol, 50 µl α-Tocopherolacetat (gelöst in EtOH, dient als interner Standard) und 500 µl Hexan 1 min gevortext und danach für 3 min bei 4000 U/min und 4°C zentrifugiert. Von der überstehenden Hexanphase werden 400 µl entnommen und der Ansatz erneut mit 400 µl frischem Hexan aufgefüllt. Es wird wie oben verfahren, so daß anschließend

0,8 ml vereinigte Hexanphase vorliegen, die dann im Rotationsvakuumverdampfer bei 40 °C getrocknet wird.

Der Rückstand wird in 50 µl des Laufmittels für die HPLC (Methanol/Acetonitril/Tetrahydrofuran 5/4,5/0,5) gelöst. An der HPLC (Apparatur II) werden  $\alpha$ -Tocopherol,  $\beta$ -Carotin, Lutein und Q<sub>10</sub> (oxidiert) quantifiziert. Für die Trennung gelten folgende Parameter:

Laufmittel: Methanol/Acetonitril/Tetrahydrofuran (5/4,5/0,5)  
Fluß: 1 ml/min  
Säule: Nucleosil 300, ODS, 7 µm Korngröße, 125 \* 4,6 mm  
Säulentemperatur 35 °C  
Detektion:  $\lambda = 280$  nm  
Analysendauer: 20 min

Ein typisches Chromatogramm der endogenen Antioxidantien aus LDL wird in Abbildung 12 wiedergegeben. Die Auftrennung für Lutein ist bei dieser Analyse nicht optimal. Da bei dieser HPLC-Apparatur die Möglichkeit des Nachintegrierens von Peaks nicht besteht, wird Lutein über die Peakhöhe quantifiziert.

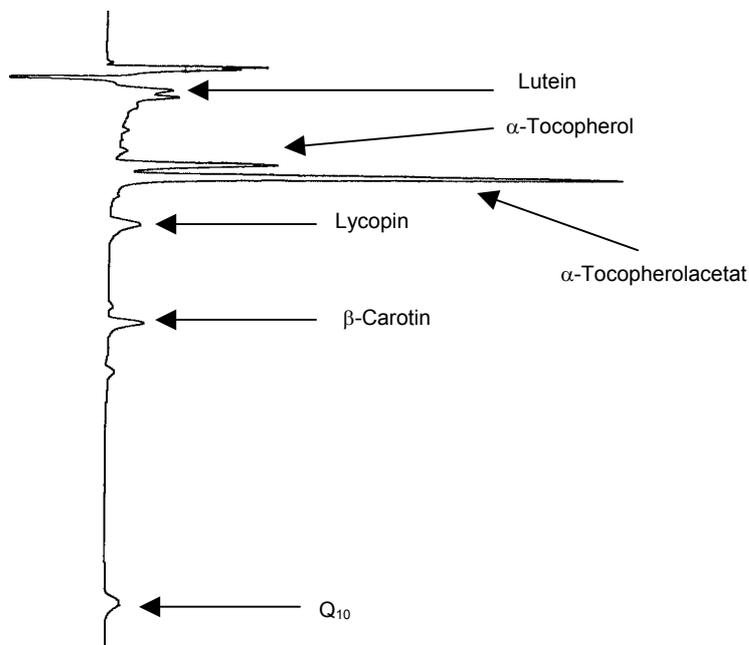


Abbildung 12 Chromatogramm nach Auftrennung der endogenen Antioxidantien aus LDL

Für alle Stoffe werden Kalibrationsgeraden erstellt, beispielhaft wird in Abbildung 13 die von  $\alpha$ -Tocopherol dargestellt. Die entsprechenden Regressionsgleichungen und Korrelationskoeffizienten sind in Tabelle 3 zusammengefaßt. Zur Bestimmung der Wiederfindungsrate dient  $\alpha$ -Tocopherolacetat.

Tabelle 3 Regressionsgleichungen der Antioxidantien und dazugehörige Korrelationskoeffizienten

Substanz	Regressionsgleichung	r
$\alpha$ -Tocopherol	$c [\mu\text{M}] = \text{area} / 2939 [\mu\text{M}^{-1}]$	0,9997
$\alpha$ -Tocopherolacetat	$c [\mu\text{M}] = \text{area} / 2306 [\mu\text{M}^{-1}]$	0,9999
$\beta$ -Carotin	$c [\mu\text{M}] = \text{area} / 14063 [\mu\text{M}^{-1}]$	0,9999
Lutein	$c [\mu\text{M}] = \text{Peakhöhe [mm]} / 3,5 [\text{mm} \cdot \mu\text{M}^{-1}]$	0,9792
Lycopin	$c [\mu\text{M}] = \text{area} / 14510 [\mu\text{M}^{-1}]$	0,9999
Q <sub>10 ox.</sub>	$c [\mu\text{M}] = \text{area} / 17098 [\mu\text{M}^{-1}]$	0,9999

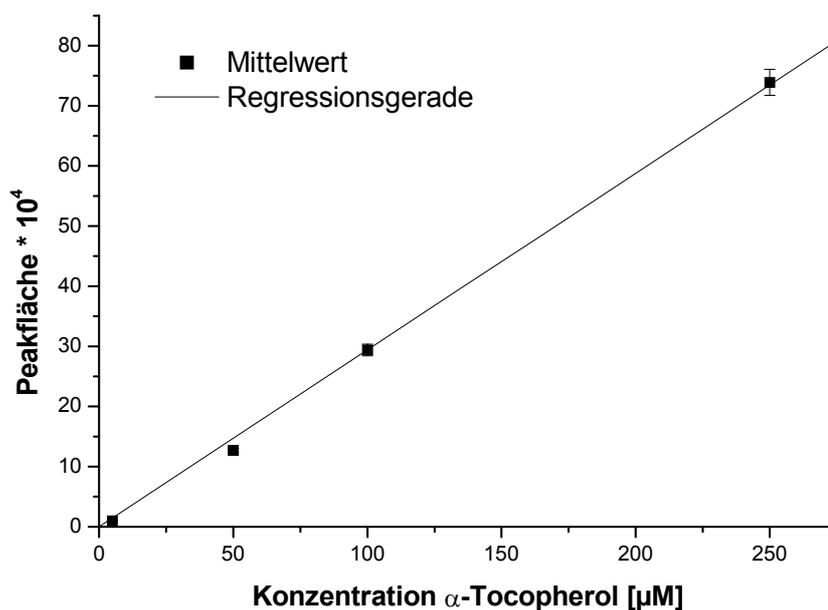


Abbildung 13 Kalibrationsgerade  $\alpha$ -Tocopherol

Anhand der Proteinkonzentrationen [mg/ml] kann nun der Stoffgehalt mol Antioxidans/mol LDL ermittelt werden. Die Umrechnung der Proteinkonzentration in die Stoffmenge erfolgt mit Hilfe des Molekulargewichts von ApoB100 (540.000 g/mol).

## 3.2.2 Untersuchungen zur LDL-Oxidation

### 3.2.2.1 Bildung konjugierter Diene während der Lipidperoxidation (Dienkonjugation)

Bei der kupferinduzierten Oxidation des Fettsäureanteils im LDL entstehen unter anderem konjugierte Diene. Der Mechanismus ist schematisch anhand der  $\alpha$ -Linolensäure in Abbildung 14 gezeigt.

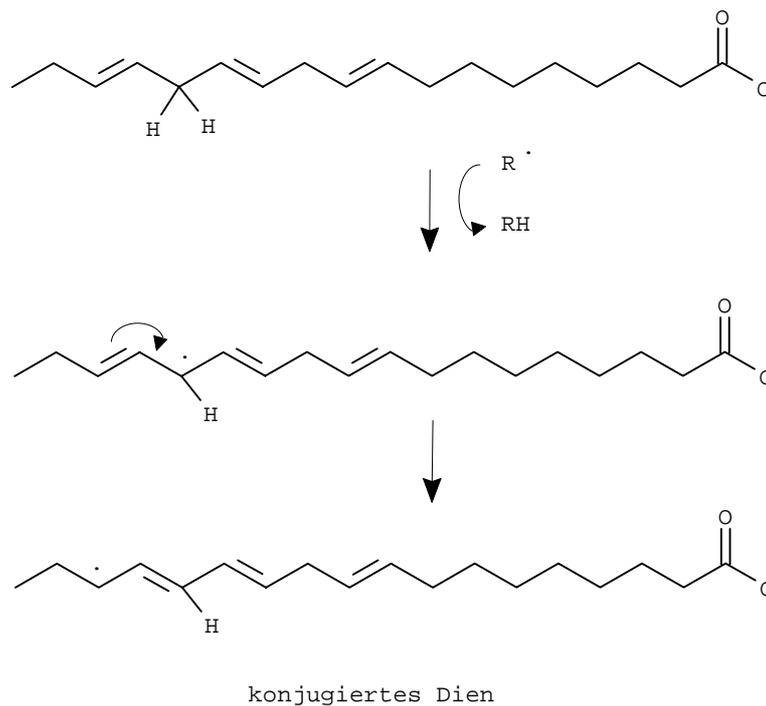


Abbildung 14 Bildung konjugierter Diene

Die Bildung konjugierter Diene kann im Photometer bei 234 nm verfolgt werden (Esterbauer et al., 1989). Ein typischer Verlauf einer solchen Oxidation ist in Abbildung 15 veranschaulicht.

Die LDL-Oxidation ist, wie andere Lipidperoxidationen auch, eine Radikalkettenreaktion, die sich in drei Phasen einteilen lässt (Benzie, 1996).

**Phase I:** Nach Zugabe des Oxidationsmittels folgt eine Phase der sehr langsamen Oxidation (Lag-Phase). Während dieser Phase werden die endogenen Antioxidantien (u.a.  $\alpha$ -Tocopherol und Carotinoide) verbraucht

- Phase II:** Die Oxidationsrate nimmt nun rapide zu (Propagationsphase). Es entstehen aus vielfach ungesättigten Fettsäuren u.a. Lipidhydroperoxide. In dieser Phase wird die maximale Dienbildungsrate erreicht.
- Phase III:** Im Anschluß folgt eine Dekompositionsphase, in der die konjugierten Diene zu ihren Endprodukten der Lipidperoxidation weiterreagieren, wie z.B. zu Aldehyden oder Epoxiden.

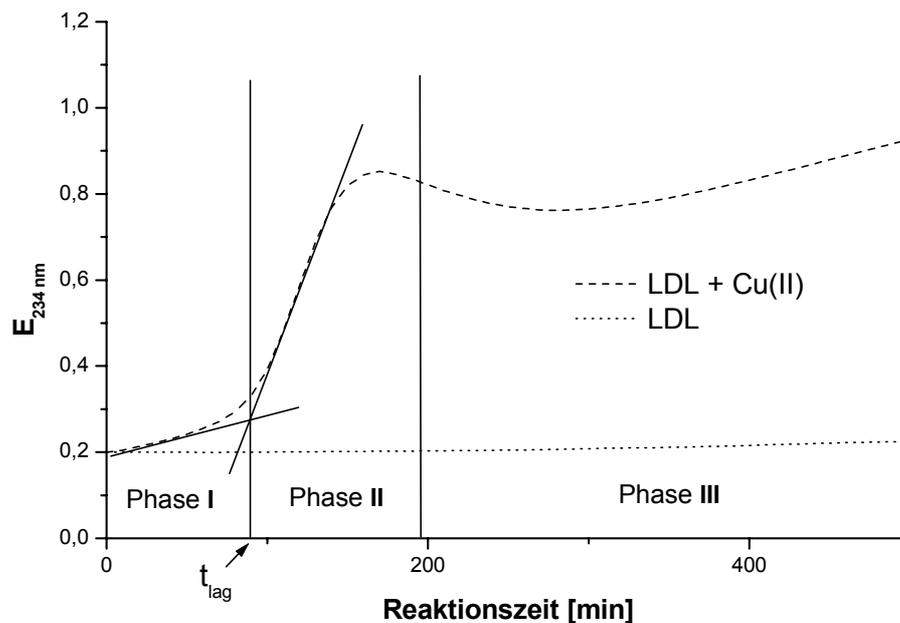


Abbildung 15 Typischer Verlauf einer kupferinduzierten Bildung konjugierter Diene in LDL

Für die Beurteilung der antioxidativen Eigenschaften einer Substanz wird häufig die Dauer der Lag-Phase ( $t_{lag}$ ) herangezogen (Parathasarathy, 1998). Dieser Wert wird mit einer Kontrolle verglichen, wodurch die sogenannte Lag-Phasenverlängerung ermittelt wird. Je länger diese Verzögerung der Lag-Phase dauert, desto ausgeprägter ist die Resistenz gegen einen oxidativen Angriff.

Im Reaktionsansatz werden jeweils LDL (25  $\mu\text{g}$  entsalztes Protein) mit  $\text{Cu(II)SO}_4$ -Lösung (1,68  $\mu\text{M}$  im Ansatz) und der zu testenden Substanz versetzt. Das Reaktionsgemisch wird mit PBS auf ein Endvolumen von 1 ml gebracht. Zur Kontrolle werden alle Ansätze gleichzeitig ohne Kupferzugabe gemessen. Somit kann z.B. überprüft werden, ob die zugegebenen Substanzen eine oxidative Wirkung auf LDL ausüben.

### 3.2.2.2 Abnahme der Tryptophanfluoreszenz

Zur Beobachtung der Oxidation am ApoB100 der LDL wird die Abnahme der Fluoreszenz an Tryptophanresten gemessen. Die Aminosäure wird durch Cu(II) oxidiert und verliert dabei ihre Fluoreszenz (Abbildung 16). Dieser Vorgang kann im Fluoreszenzphotometer verfolgt werden (Reyftmann et al., 1990). Die Oxidation verläuft anfänglich relativ langsam (frühe Proteinoxidation), beschleunigt sich aber mit Beginn der Lipidperoxidation (späte Proteinoxidation). Je langsamer die Fluoreszenz abnimmt, bzw. je später die späte Proteinoxidation einsetzt, desto besser ist das LDL vor Oxidation geschützt.

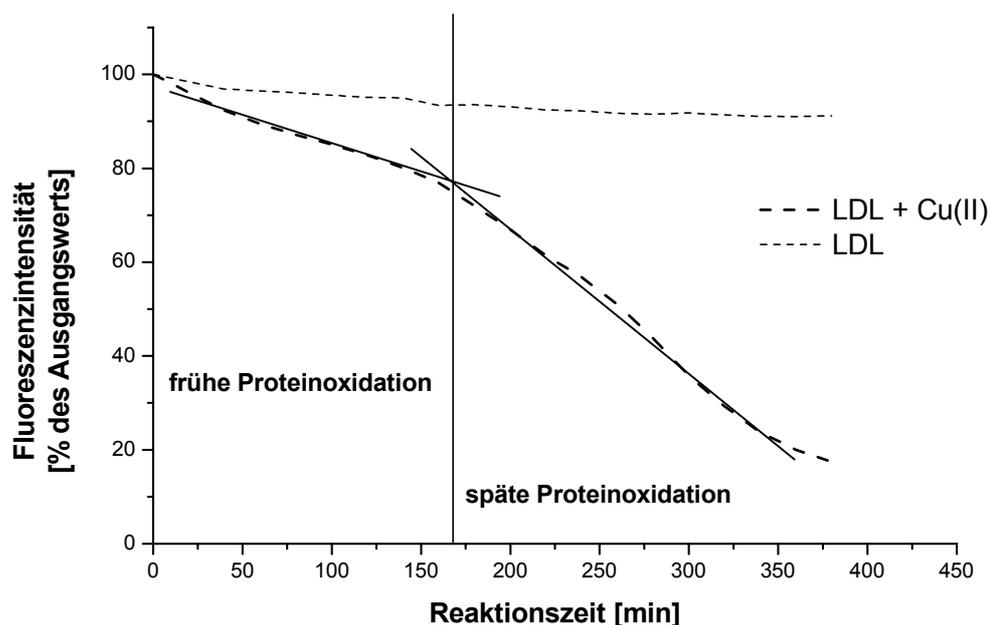


Abbildung 16 Typischer Verlauf einer kupferinduzierten Abnahme der Tryptophanfluoreszenz in LDL

Im Ansatz werden 50 µg Protein mit 3,36 µM Cu(II) und einer Testsubstanz in gewünschter Konzentration ad 1 ml PBS versetzt. Die Kontrollen enthalten kein Cu(II). Es werden alle 20 min zwei Messungen durchgeführt, um Geräteschwankungen auszugleichen. Die Proben werden in der Zwischenzeit im Dunklen verwahrt, um eine Bleichung zu verhindern.

Am Gerät werden folgende Parameter eingestellt:

Excitation: 282 nm

Emission: 331 nm

(nach Gießauf, 1995)

### **3.2.3 Statistische Auswertung der Meßergebnisse**

Alle Versuche wurden mindestens einmal wiederholt und an zwei verschiedenen Tagen durchgeführt. Die angegebenen Werte stellen Mittelwerte mit zugehöriger Standardabweichung von verschiedenen Versuchstagen dar. Die Auswertung und graphische Darstellung der Meßergebnisse erfolgt rechnergestützt mit folgender Software: Microsoft Word 97, Microsoft Powerpoint 97, Microsoft Excel 97, Microcal Origin 6.1, Isis Draw 1.2.

## 4 Ergebnisse

### 4.1 *Salix*-Extrakte als Antioxidantien in Arthritismodellen

#### 4.1.1 Oxidative Depolymerisation humaner Hyaluronsäure

Dieses Modell stellt ein biochemisches Testsystem für rheumatische Beschwerden dar. Es beleuchtet insbesondere degenerative, entzündliche Prozesse im Gelenkspalt. Hyaluronsäure ist ein Makromolekül, das den Hauptbestandteil der Synovialflüssigkeit in Gelenken ausmacht. Durch oxidativen Angriff verschiedener ROS kann es depolymerisiert werden, verliert seine Viskosität und damit auch seinen „Schmiereffekt“. Eine Degeneration der betroffenen Gelenke ist die Folge (Lengfelder und Fink, 1987).

In diesem System wird humane Hyaluronsäure in einem FPLC-Chromatogramm mit und ohne Oxidans quantifiziert. Die Güte der Antioxidantien wird anhand der verbliebenen nativen Hyaluronsäure im Vergleich zur Kontrolle ohne Oxidans bewertet. Je mehr native Hyaluronsäure nach dem oxidativen Angriff noch intakt vorliegt, desto wirkungsvoller schützen die zugesetzten Substanzen (Abbildung 7, S. 21).

#### Testsubstanzen in verschiedenen Konzentrationen

Zunächst werden einzelne Extrakte in verschiedenen Konzentrationen auf ihre Wirkung hin untersucht. Aus versuchstechnischen Gründen, wie keinem hohen Probendurchsatz innerhalb eines vertretbaren Zeitraums und Kapazitätsengpässen an den verwendeten Geräten, konnten nicht alle 23 Extrakte und Salicylsäure getestet werden. Das Testsystem ist auch aus zeitlichen Gründen für eine breit angelegte Untersuchung einer Vielzahl von Extrakten nicht geeignet. Es kommen deshalb nur einige ausgewählte Substanzen zum Einsatz. Dargestellt wird die verbleibende Hyaluronsäure in Abhängigkeit von der eingesetzten Konzentration an Testsubstanz. Eine Regressionsanalyse unter Verwendung der Mittelwerte der Einzelmessungen soll zeigen, inwieweit ein linearer Zusammenhang des Reaktionsverhaltens feststellbar ist.

Extrakt 3006, 3007 und 3009 hemmen den Hyaluronsäureabbau konzentrationsabhängig (Abbildung 17 - Abbildung 19). Die Grundreaktion führt zu einer Depolyme-

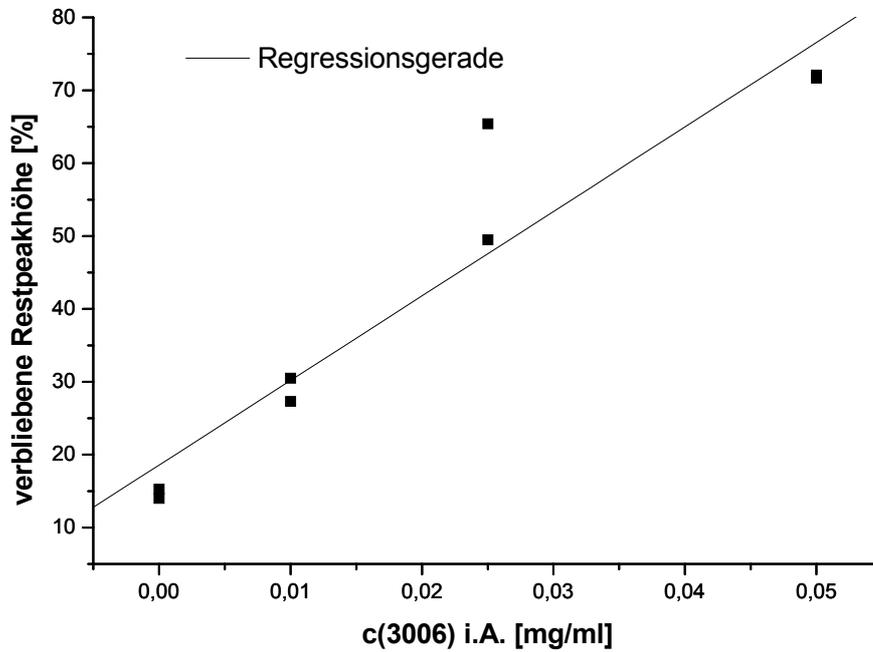


Abbildung 17 Einfluß von 3006 in verschiedenen Konzentrationen auf die Hyaluronsäuredepolymerisation

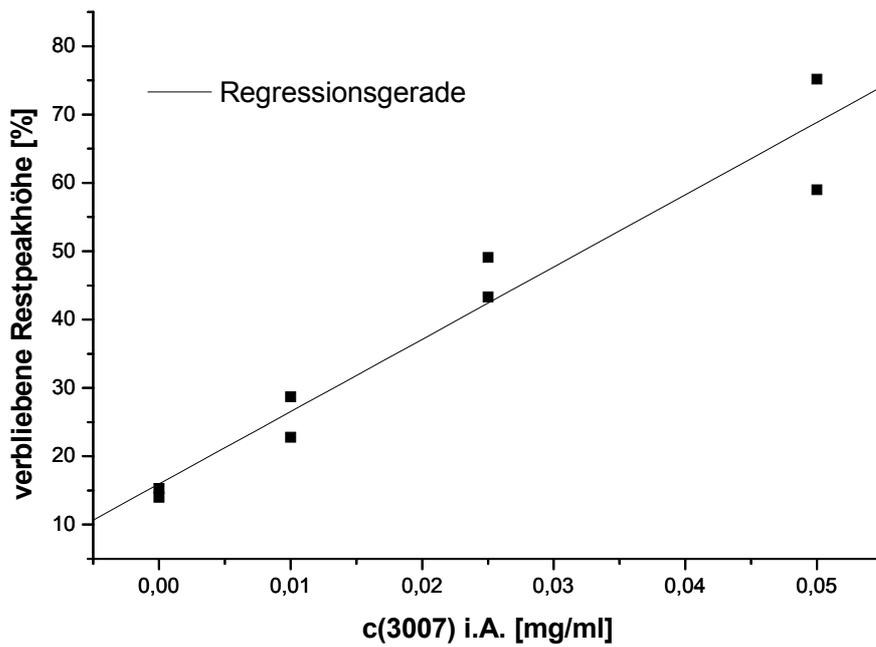


Abbildung 18 Einfluß von 3007 in verschiedenen Konzentrationen auf die Hyaluronsäuredepolymerisation

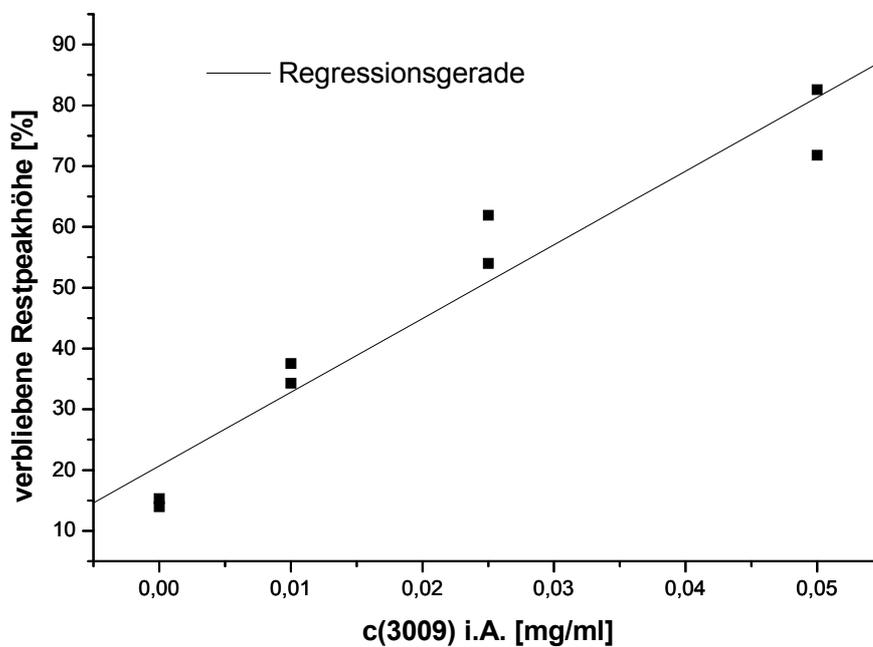


Abbildung 19 Einfluß von 3009 in verschiedenen Konzentrationen auf die Hyaluronsäuredepolymerisation

risation von ca. 85%. Durch Zugabe verschiedener *Salix*-Extrakte kann diese Fragmentierung deutlich gebremst werden. Im Fall von 3009 verbleiben maximal 77% der Hyaluronsäure intakt. Die Extrakte 3006 und 3007 schützen lediglich 72% bzw. 67% des Mucopolysaccharids vor Oxidation.

Teufelskrallenextrakt schützt humane Hyaluronsäure ebenfalls vor Depolymerisation (Abbildung 20). Bei maximal 0,05 mg/ml i.A. verbleiben 65% intakt. Die beiden Meßwerte haben jedoch eine sehr große Spannweite, so daß diese hohe Mittelwertabweichung kritisch ist. Die Hemmwirkung fällt insgesamt schlechter aus als bei den *Salix*-Extrakten.

Hyaluronsäure wird von Salicylsäure ebenfalls vor Fragmentierung geschützt (Abbildung 21). Der beste Schutz wird bei der höchsten Konzentration gemessen und beträgt im Mittel 47%. Ob die Hemmung tatsächlich konzentrationsabhängig ist, kann durch das vorliegende Datenmaterial aber nicht validiert werden. Die Messungen weisen im Fall der Salicylsäure zu große Schwankungen auf.

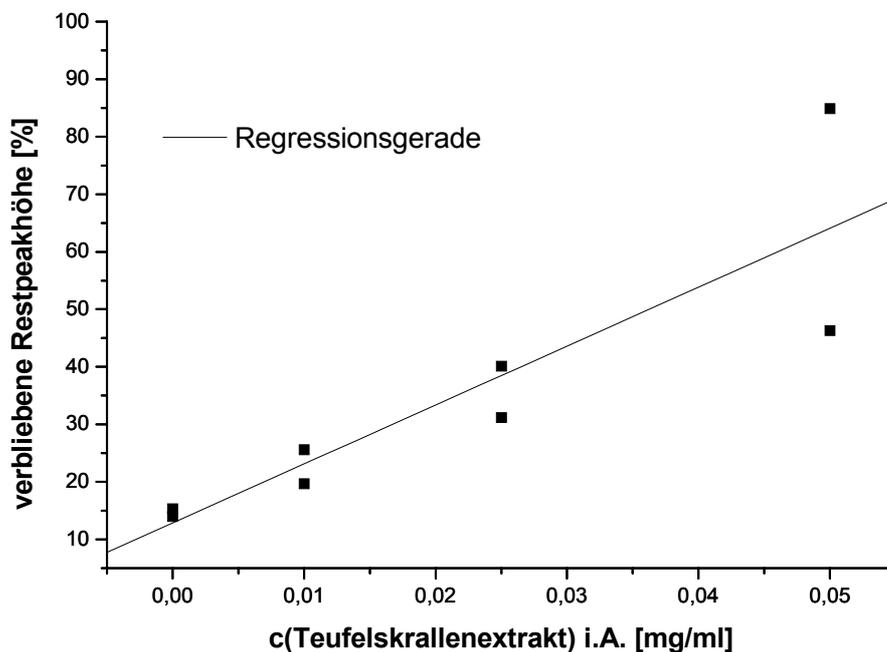


Abbildung 20 Einfluß des Teufelskrallenextraktes in verschiedenen Konzentrationen auf die Hyaluronsäuredepolymerisation

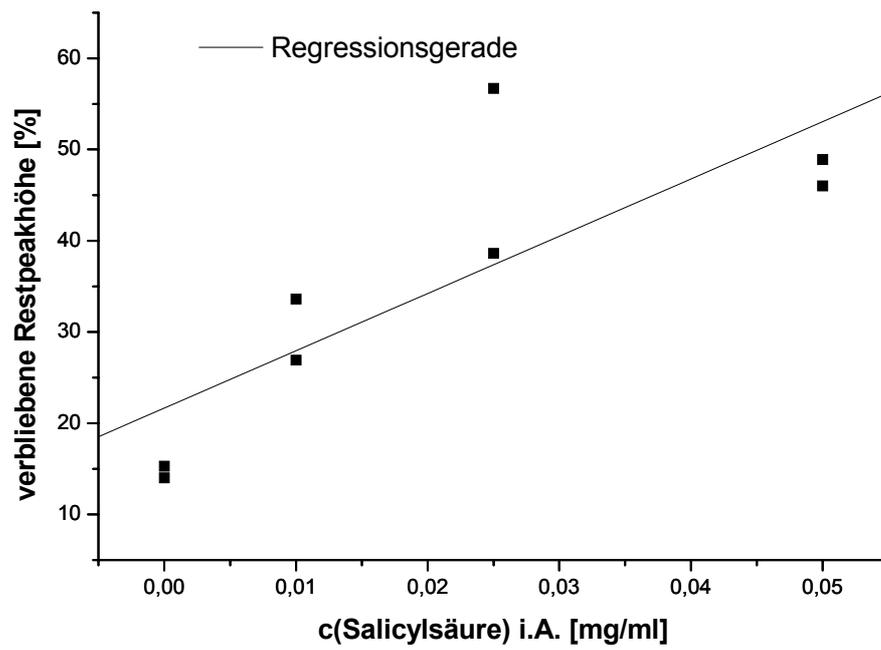


Abbildung 21 Einfluß der Salicylsäure in verschiedenen Konzentrationen auf die Hyaluronsäuredepolymerisation

### Vergleich der Testsubstanzen

Eine Bewertung der Substanzen untereinander kann anhand der Steigung der jeweiligen Regressionsgerade vorgenommen werden (Tabelle 4). Da nur einige *Salix*-Extrakte zum Einsatz kamen, soll dies weniger ein Vergleich der Weidenrinden-auszüge untereinander sein, sondern mehr eine Einordnung des Potentials von *Salix*-Extrakten im Vergleich zu einem Teufelskrallenextrakt und Salicylsäure. Der Vergleich von Daten verschiedener Versuchstage ist in diesem Fall zulässig, da sich die Grundreaktionen der einzelnen Tage nur geringfügig unterscheiden. Die Substanzen lassen sich folgendermaßen nach abnehmender Wirksamkeit auflisten: 3009 > 3006 > 3007 / Teufelskrallenextrakt >> Salicylsäure.

Tabelle 4 Einfluß verschiedener Substanzen auf die Hyaluronsäuredepolymerisation

Substanz	Regressionsgleichung	r
3006	verbliebene Hyaluronsäure [%] = 18,6 + 1160,3 [ml/mg] *c [mg/ml]	0,9661
3007	verbliebene Hyaluronsäure [%] = 15,9 + 1058,2 [ml/mg] *c [mg/ml]	0,9938
3009	verbliebene Hyaluronsäure [%] = 20,6 + 1213,5 [ml/mg] *c [mg/ml]	0,9744
Teufelskrallenextrakt	verbliebene Hyaluronsäure [%] = 12,9 + 1024,5 [ml/mg] *c [mg/ml]	0,9954
Salicylsäure	verbliebene Hyaluronsäure [%] = 21,7 + 628,2 [ml/mg] *c [mg/ml]	0,8630

## 4.1.2 Xanthin/Xanthinoxidase-System

Das Xanthin/Xanthinoxidase(X/XOD)-System stellt ein biochemisches Testsystem dar. Es werden Superoxidationradikale, Wasserstoffperoxid und, indirekt durch Katalyse mit Übergangsmetallen, Hydroxylradikale erzeugt.  $\cdot\text{OH}$  gehören zu den reaktivsten Oxidantien ( $k$ -Wert:  $10^8 - 10^{10} \text{ M}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$ ), die an vielen pathologischen Prozessen, insbesondere an entzündlichen Erkrankungen beteiligt sind. Durch die verwendeten Methoden können insbesondere die Radikalfängereigenschaften gegenüber  $\cdot\text{OH}$  und  $\text{O}_2^{\cdot-}$ , sowie eine mögliche Hemmung der XOD selbst ermittelt werden.

Im Rahmen dieser Arbeit werden verschiedene *Salix*-Extrakte, Unterfraktionen eines bestimmten *Salix*-Extraktes, ein Extrakt aus Teufelskrallen, ein Brennesselextrakt und Salicylsäure auf ihre Hemmwirkung in diesem Testsystem hin untersucht.

### 4.1.2.1 Oxidation von Hydroxylamin zu Nitrit

Ein möglicher Indikator zur Messung der protektiven Eigenschaften verschiedener Antioxidantien im X/XOD-System stellt das Hydroxylamin ( $\text{NH}_2\text{-OH}$ ) dar. Es wird hauptsächlich von  $\text{O}_2^{\cdot-}$  zu Nitrit oxidiert. Das entstehende Nitrit kann im sauren Milieu nach Azokupplung mit Sulfanilamid und  $\alpha$ -Naphthylethylendiamin bei 540 nm photometrisch quantifiziert werden. Je weniger Nitrit erzeugt wird, desto geringer ist die gebildete Farbstoffmenge und desto effektiver wirkt das untersuchte Antioxidans in diesem Testsystem.

#### Testsubstanzen in verschiedenen Konzentrationen

Von allen Proben werden zunächst Dosis-Wirkungs-Kurven ermittelt.

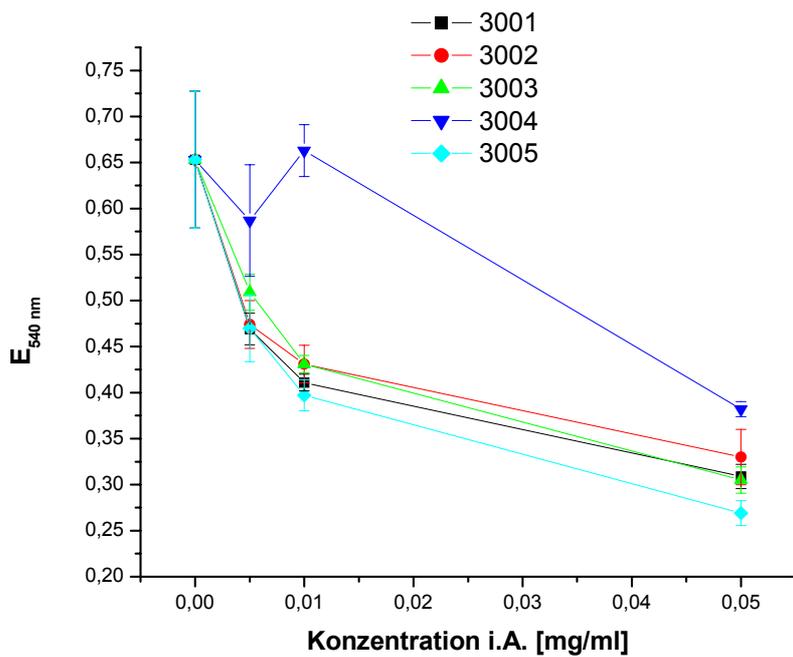


Abbildung 22 Einfluß der *Salix*-Extrakte 3001 bis 3005 auf die Nitritbildung im X/XOD-System

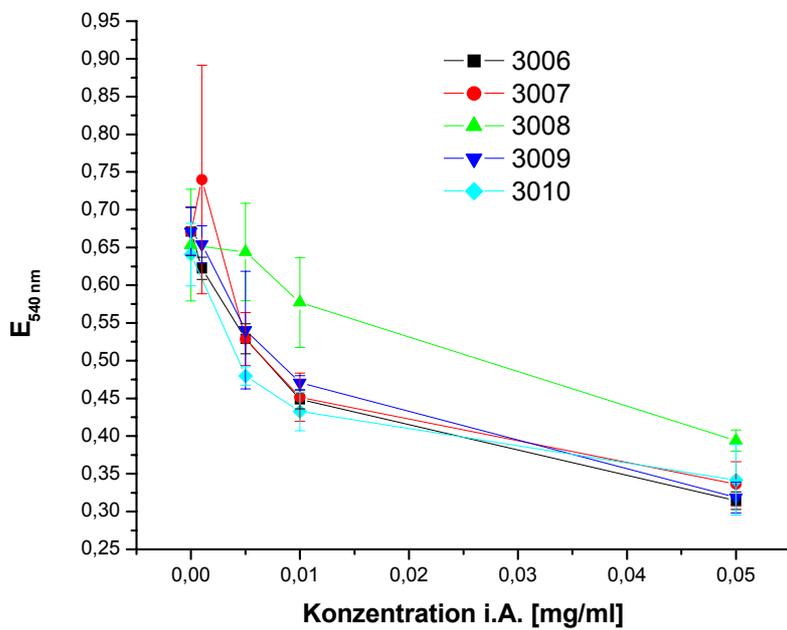


Abbildung 23 Einfluß der *Salix*-Extrakte 3006 bis 3010 auf die Nitritbildung im X/XOD-System

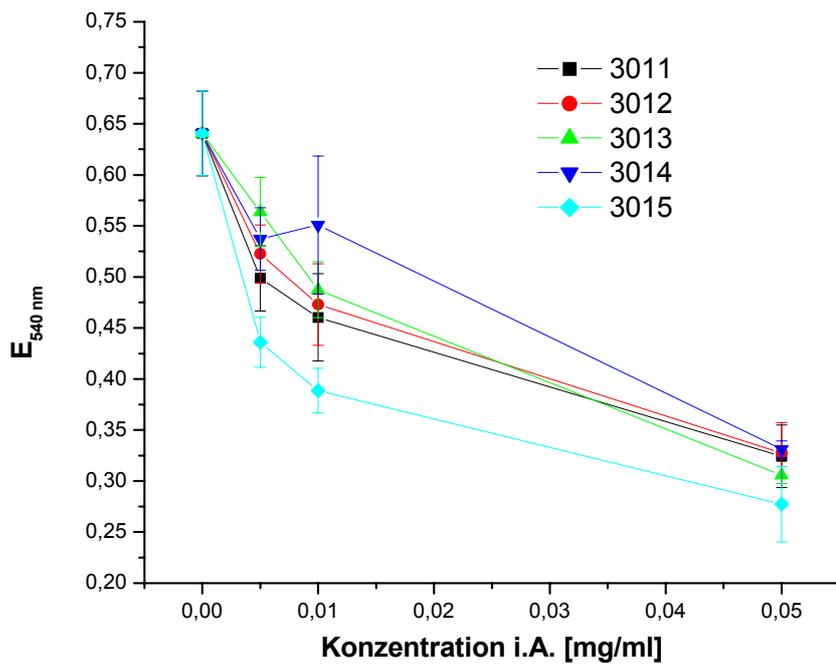


Abbildung 24 Einfluß der *Salix*-Extrakte 3011 bis 3015 auf die Nitritbildung im X/XOD-System

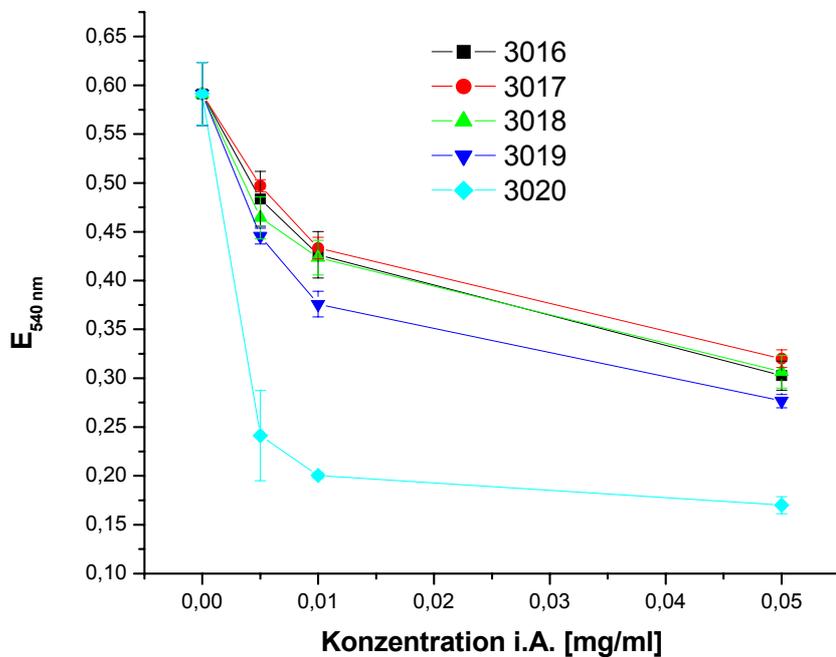


Abbildung 25 Einfluß der *Salix*-Extrakte 3016 bis 3020 auf die Nitritbildung im X/XOD-System

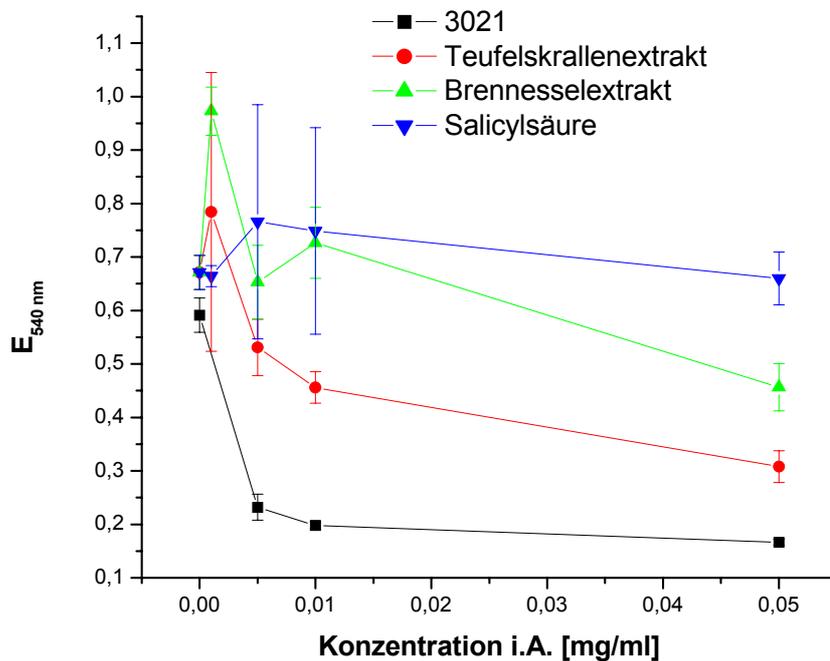


Abbildung 26 Einfluß des *Salix*-Extraktes 3021, des Teufelskrallenextraktes, des Brennesselextraktes und der Salicylsäure auf die Nitritbildung im X/XOD-System

Die *Salix*-Extrakte 3001 bis 3021 hemmen, mit Ausnahme von 3004, konzentrationsabhängig die Bildung von Nitrit (Abbildung 22 - Abbildung 26). Der Extrakt 3004 zeigt erst bei der höchsten Konzentration von 0,05 mg/ml eine deutliche Hemmung. Ausgehend von einer Grundreaktion mit 0,59 AU bis 0,67 AU wird die Gesamtreaktion maximal auf 33% (3020 und 3021) gehemmt. Die restlichen *Salix*-Extrakte erreichen hingegen nur eine Maximalhemmung von ca. 50%. Dieser Effekt wird jeweils erst bei der höchsten Konzentration (0,05 mg/ml) im Ansatz erreicht, wohingegen 3020 und 3021 ihre volle Wirkung bereits bei einer niedrigeren Konzentration (0,01 mg/ml) erzielen.

Der Extrakt aus Teufelskralle zeigt bei 0,001 mg/ml noch keine Hemmung. Diese tritt erst mit steigender Probenmenge konzentrationsabhängig ein (Abbildung 26).

Der Brennesselextrakt stimuliert die Nitritbildung zunächst deutlich, meßbar in einer Extinktionszunahme von 0,67 AU auf 0,97 AU. Erst bei einer Konzentration von 0,05 mg/ml kommt es zu einer leichten Hemmung der Nitritbildung (Abbildung 26).

Salicylsäure hat bei den verwendeten Konzentrationen keinen signifikanten Einfluß auf die Nitritbildung (Abbildung 26).

Von *Salix*-Extrakt 3006 liegen Unterfraktionen vor, die durch sukzessive Extraktion mit immer hydrophileren Lösungsmitteln (Toluol → Ethylacetat → Butanol → Ethanol → H<sub>2</sub>O) gewonnen wurden. Um mit diesen Extrakten im X/XOD-System arbeiten zu können, müssen sie einerseits in Lösung gebracht werden, andererseits sollte das Lösungsmittel das Testsystem nicht zu stark beeinflussen. Methanol z.B. hemmt die X/XOD-Reaktion und kann somit keine Verwendung finden (Coughlan et al., 1969). Da es sich bei einigen Unterfraktionen um sehr lipophile Auszüge handelt, muß auch ein Lösungsmittel mit ausreichenden Lösungseigenschaften zum Gebrauch kommen. Hierbei hat sich DMSO als am geeignetsten erwiesen. Es führt bei der verwendeten Verdünnung i.A. (1:5) nur zu einer geringen Stimulierung des Systems (<10%). Der Gesamtextrakt 3006 wird als Referenzsubstanz, ebenfalls in DMSO gelöst, eingesetzt.

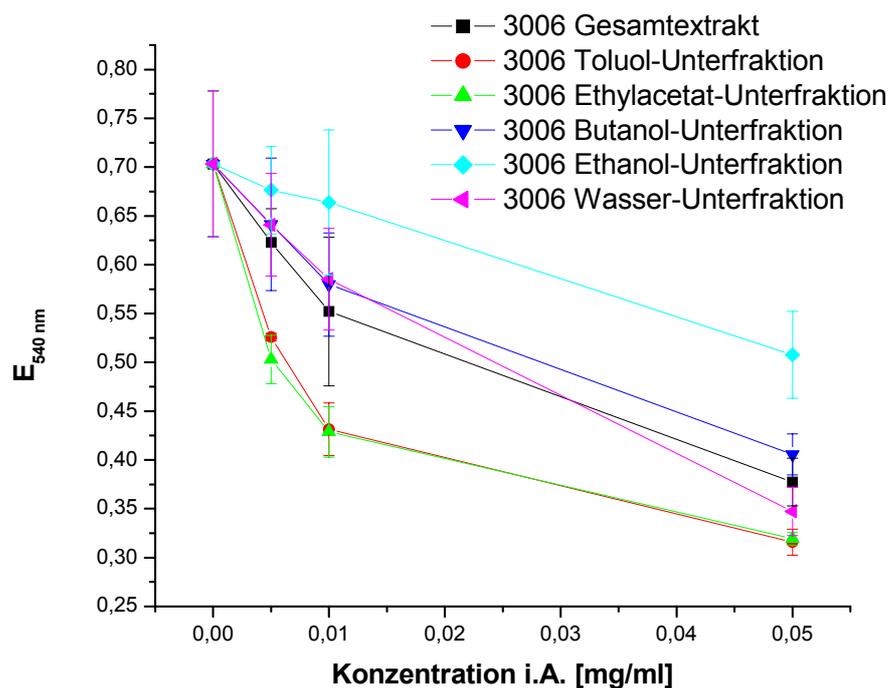


Abbildung 27 Einfluß des *Salix*-Extraktes 3006 und dessen Unterfraktionen auf die Nitritbildung im X/XOD-System

Die Unterfraktionen von 3006 hemmen die Nitritbildung konzentrationsabhängig mit unterschiedlicher Wirksamkeit (Abbildung 27). Ausgehend von einer Grundreaktion (0,7 AU) erreichen die Extrakte 3006<sub>Toluol</sub> und 3006<sub>Ethylacetat</sub> mit 0,05 mg/ml eine

Hemmung um 50%. Sämtliche Meßpunkte dieser beiden Unterfraktionen weisen geringere Nitritmengen auf als 3006. Die Extrakte 3006<sub>Butanol</sub> und 3006<sub>Wasser</sub> zeigen hingegen keinen Unterschied zum Gesamtextrakt. 3006<sub>Ethanol</sub> kann die Oxidation von Hydroxylamin weit weniger effektiv verhindern. Es wird lediglich eine Maximalhemmung von ca. 28% hervorgerufen.

*Salix*-Extrakte sind reich an Flavonoiden. Aus diesem Grund wird anhand eines ausgewählten Polyphenols (Catechin) das antioxidative Verhalten in diesem Testsystem untersucht.

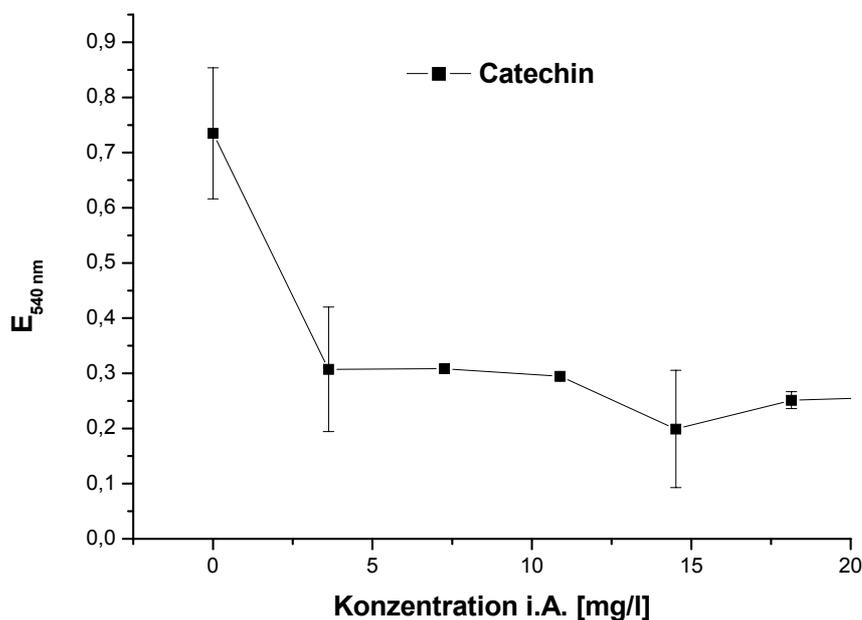


Abbildung 28 Einfluß von Catechin auf die Nitritbildung im X/XOD-System

Catechin zeigt eine konzentrationsabhängige Hemmung der Nitritbildung. Ausgehend von einer Grundreaktion von 0,73 AU wird die Extinktion bereits bei einer Konzentration von 3,6 mg/l auf 0,3 AU reduziert und erreicht damit die Maximalhemmung (Abbildung 28).

#### Vergleich der Testsubstanzen

Die Grundreaktionen bei der Bestimmung des konzentrationsabhängigen Verhaltens der Extrakte unterscheiden sich aufgrund der vielen unterschiedlichen Versuchstage zu stark. Aus diesem Grund wird bei einer Konzentration (0,05 mg/ml i.A.) die Hemmung der Nitritbildung in einem Versuchsansatz bestimmt. Erst dann ist ein Vergleich zulässig.

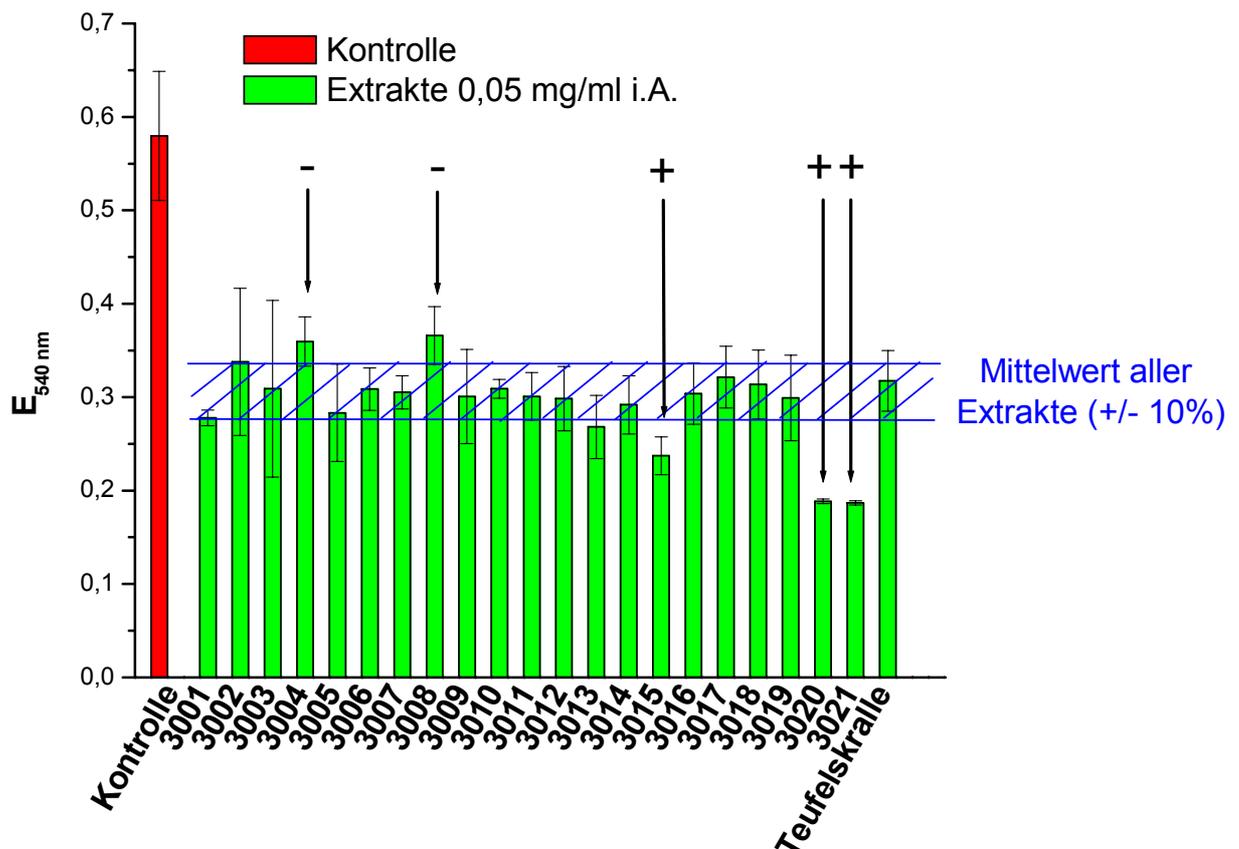


Abbildung 29 Einfluß der Einzelnextrakte (0,05 mg/ml) auf die Nitritbildung im X/XOD-System. Der schraffierte Bereich stellt den Mittelwert aller Extrakte (ohne 3020 und 3021) +/- 10% dar.

Unterschiede in der Hemmwirkung aus Abbildung 29 werden mit dem t-Test auf ihre Signifikanz untersucht. Der Vergleich der Einzelnextrakte zeigt eine signifikante Hemmung der Nitritbildung gegenüber der Kontrolle auf dem 5%-Niveau. Die *Salix*-Extrakte 3020 und 3021 hemmen die Reaktion signifikant besser als alle anderen Extrakte. Untereinander unterscheiden sie sich nicht. Der Extrakt 3015 zeigt gegenüber den restlichen Extrakten (mit Ausnahme von 3003 und 3005) ebenfalls eine signifikant bessere Hemmung. Die Extrakte 3004 und 3008 liegen mit ihren Mittelwerten deutlich über dem Durchschnitt aller Extrakte (schraffierter Bereich). Der Brennesselextrakt und Salicylsäure werden aufgrund ihrer schwachen oder nicht vorhandenen Wirkung (Abbildung 26) in diesen Vergleich nicht mit einbezogen.

#### 4.1.2.2 Oxidation von $\alpha$ -Keto- $\gamma$ -S-Methyl-Buttersäure zu Ethen

Ein weiteres Indikatormolekül für ROS, die durch die X/XOD-Reaktion gebildet werden, ist  $\alpha$ -Keto- $\gamma$ -S-Methyl-Buttersäure (KMB). Diese wird durch  $\cdot\text{OH}$  in Ethen gespalten, das gaschromatographisch quantifiziert wird (Halliwell und Gutteridge, 1999, Beauchamp und Fridovich, 1970). Die Menge an gebildetem Ethen dient als Maß für die Qualität des untersuchten Antioxidans in diesem Testsystem. Je weniger Ethen gebildet wird, desto effektiver wirkt das Antioxidans.

Das Verhalten der Unterfraktionen des Extrakts 3006 kann in diesem System nicht bestimmt werden, da diese nur in DMSO völlig zu lösen sind. DMSO ist ein bekannter  $\cdot\text{OH}$ -Fänger (Elstner, 1993) und stört zudem die gaschromatographische Analyse.

#### Testsubstanzen in verschiedenen Konzentrationen

In den folgenden Abbildungen (30-34) sind Dosis-Wirkungs-Kurven der getesteten Substanzen dargestellt.

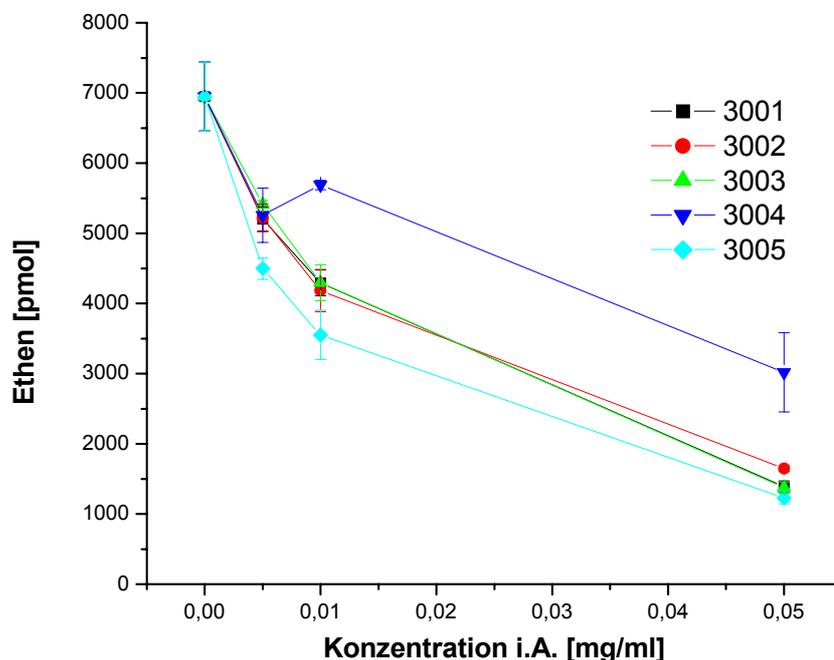


Abbildung 30 Einfluß der *Salix*-Extrakte 3001-3005 auf die Ethenfreisetzung im X/XOD-System

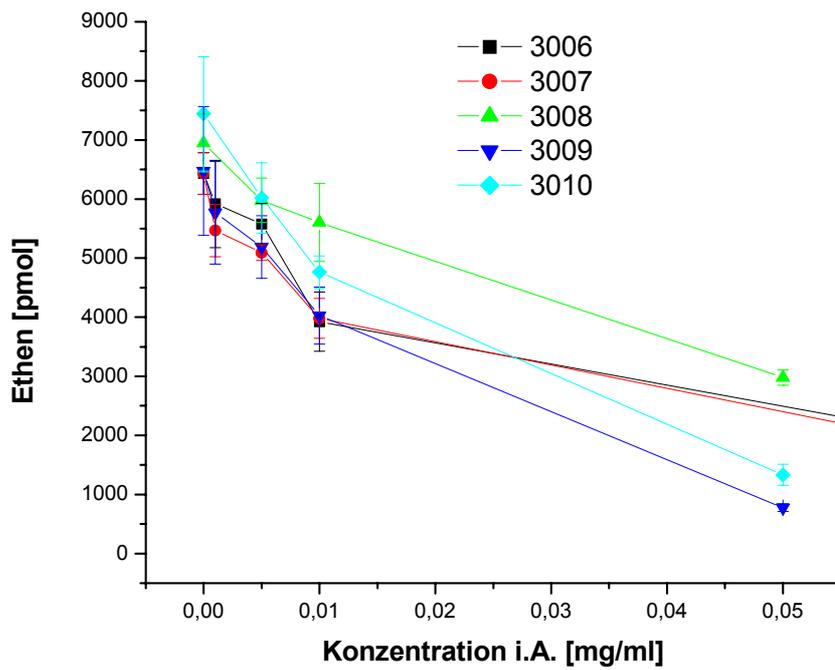


Abbildung 31 Einfluß der *Salix*-Extrakte 3006-3010 auf die Ethenfreisetzung im X/XOD-System

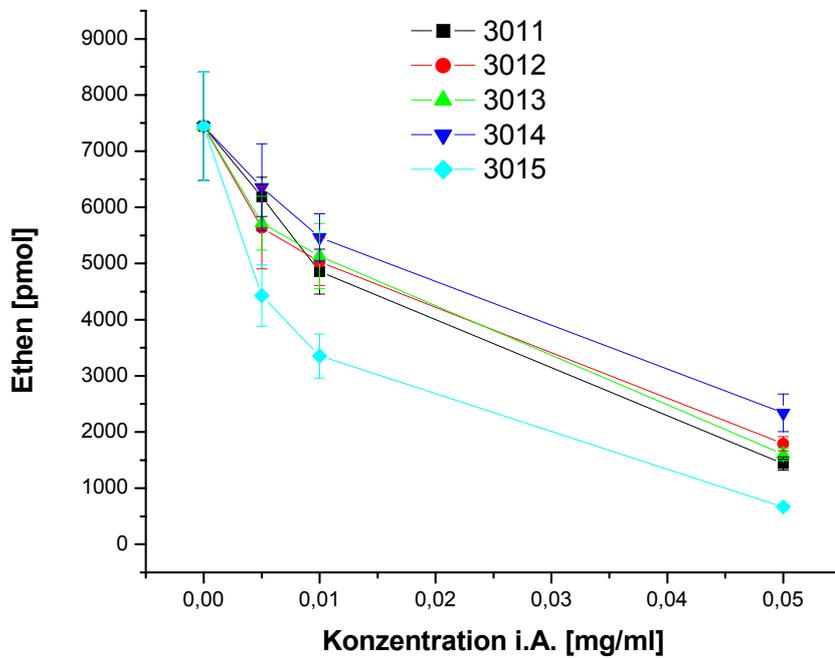


Abbildung 32 Einfluß der *Salix*-Extrakte 3011-3015 auf die Ethenfreisetzung im X/XOD-System

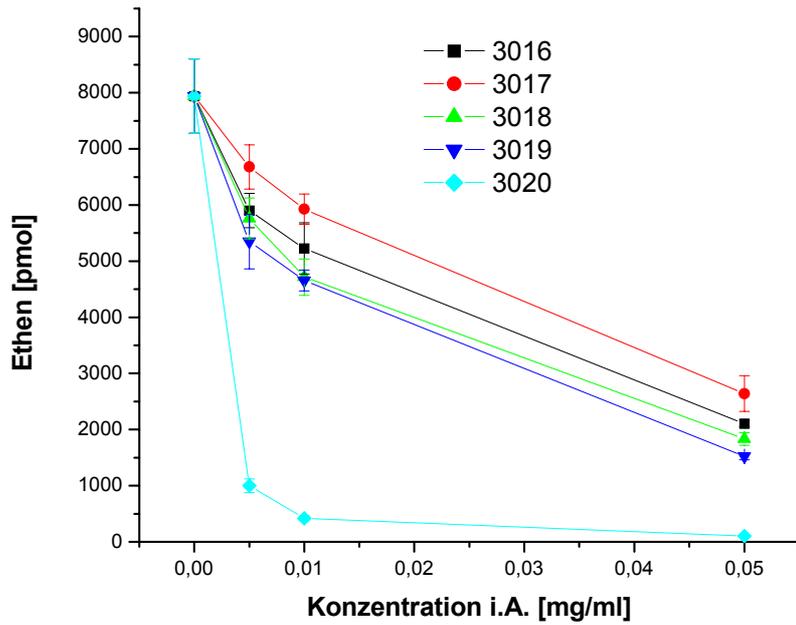


Abbildung 33 Einfluß der *Salix*-Extrakte 3016-3020 auf die Ethenfreisetzung im X/XOD-System

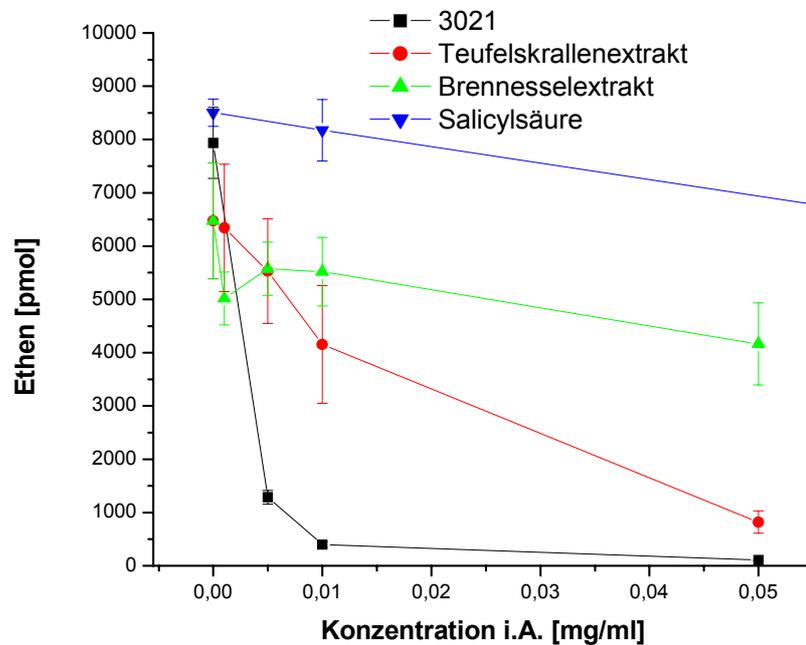


Abbildung 34 Einfluß des *Salix*-Extraktes 3021, des Teufelskrallenextraktes, des Brennesselextraktes und von Salicylsäure auf die Ethenfreisetzung im X/XOD-System

Die *Salix*-Extrakte 3001 bis 3021 hemmen konzentrationsabhängig, mit Ausnahme von 3004, die Bildung von Ethen (Abbildung 30 - Abbildung 34). Der Extrakt 3004 zeigt erst bei der höchsten Konzentration von 0,05 mg/ml eine deutliche Hemmung. Die Grundreaktion führt zu einer Produktion von ca. 6400 pmol bis maximal 8500 pmol Ethen und wird durch die Zugabe der Extrakte auf max. 1,3% (3020 und 3021) reduziert. Eine sehr starke Hemmung wird bereits bei 0,01 mg/ml dieser beiden Extrakte verzeichnet. Die restlichen Extrakte erreichen zumindest in höchster Konzentration eine 50%-Hemmung der Grundreaktion, mit Ausnahme des Brennesselextraktes. Salicylsäure bewirkt nur eine minimale Verringerung der KMB-Oxidation (Abbildung 34).

#### Vergleich der Testsubstanzen

Die Grundreaktionen bei der Bestimmung des konzentrationsabhängigen Verhaltens der Extrakte unterscheiden sich aufgrund der unterschiedlichen Versuchstage zu stark. Aus diesem Grund wird bei einer Konzentration (0,01 mg/ml i.A.) die Hemmung der KMB-Oxidation in einem Versuchsansatz bestimmt.

Bei einer Konzentration von 0,1 mg/ml weisen alle Extrakte außer 3008 eine signifikante (5%, t-Test) Hemmung der KMB-Oxidation auf (Abbildung 35). Salicylsäure wird aufgrund ihrer nicht vorhandenen Wirkung (Abbildung 34) bei dieser Konzentration nicht in den Vergleich mit einbezogen. Die Extrakte 3020 und 3021 heben sich zusätzlich deutlich positiv in ihrem Verhalten von den restlichen Extrakten ab. Es werden lediglich 490 bzw. 450 pmol Ethen in diesen Ansätzen gebildet, das entspricht einer Hemmung um 93% bzw. 94%. Der *Salix*-Extrakt 3015 unterdrückt die Ethenbildung im Vergleich zu den verbliebenen Extrakten, mit Ausnahme zu 3001 und 3005, ebenfalls signifikant besser. 3004 und 3008 beeinflussen das X/XOD-System signifikant am schlechtesten. Sie können sich jedoch nicht vom Brennesselextrakt (3004 zusätzlich vom Teufelskrallenextrakt) unterscheiden. Der Auszug aus Brennessel weist keinen Unterschied mehr zu 3001, 3004, 3006, 3008, 3009, 3014 und dem Teufelskrallenextrakt auf.

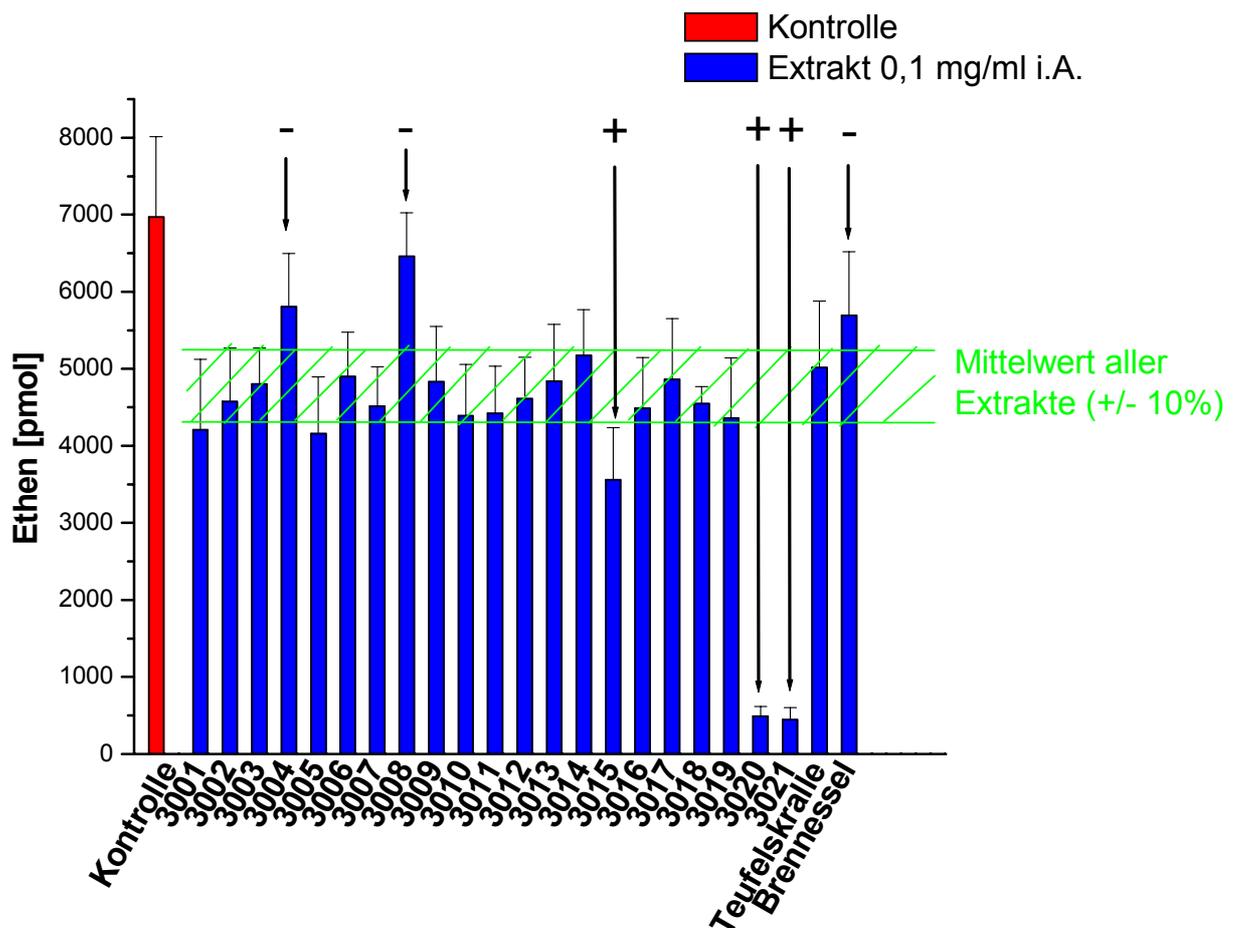


Abbildung 35 Einfluß der Einzelextrakte (0,1 mg/ml) auf die Ethenfreisetzung im X/XOD-System. Der schraffierte Bereich stellt den Mittelwert aller Extrakte (ohne 3020 und 3021) +/- 10% dar.

#### 4.1.2.3 Hemmung der Xanthinoxidase

Nach der Untersuchung der antioxidativen Eigenschaften der verschiedenen Extrakte, soll hier ermittelt werden, ob es sich um reine Radikalscavenger handelt oder ob eine Hemmung der XOD bereits die Bildung von ROS unterbindet. Zu diesem Zweck wird die X/XOD-Reaktion nach 10 min mit HCl abgestoppt. Der Stoffumsatz von Xanthin zu Harnsäure der Kontrollreaktion wird mit den übrigen Ansätzen verglichen. Die entstandene Harnsäure ist ein Maß der XOD-Aktivität. Wird deutlich weniger Harnsäure gebildet, so liegt eine Hemmung des Enzyms vor.

In Abbildung 36 werden beispielhaft zwei Chromatogramme dargestellt, wobei A den Grundumsatz zeigt und B eine Hemmung des Stoffumsatzes wiedergibt.

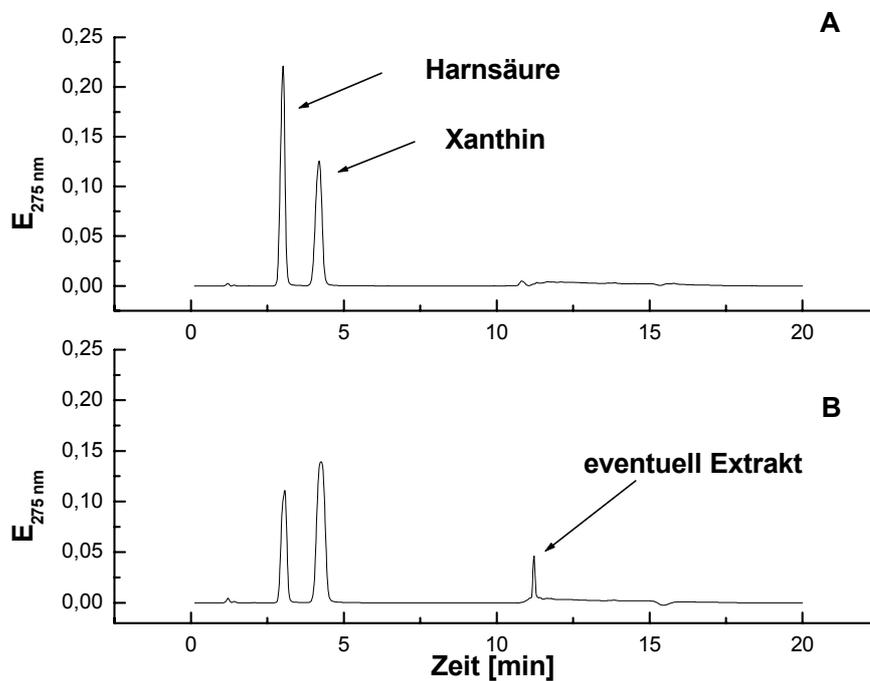


Abbildung 36 Chromatogramme der Stoffe Xanthin und Harnsäure nach einer abgestoppten XOD-Reaktion. A: Grundumsatz, B: Hemmung des Enzyms

Wie der Abbildung 37 deutlich zu entnehmen ist, hemmt weder ein Extrakt, noch Salicylsäure (0,05 mg/ml) die XOD. Eine Ausnahme bilden 3020 und 3021. Die Grundreaktion der XOD entspricht einer Peakfläche (Xanthin) von 1.153.000. Die beiden Extrakte 3020 und 3021 reduzieren diesen Umsatz auf 773.000 und 800.000.

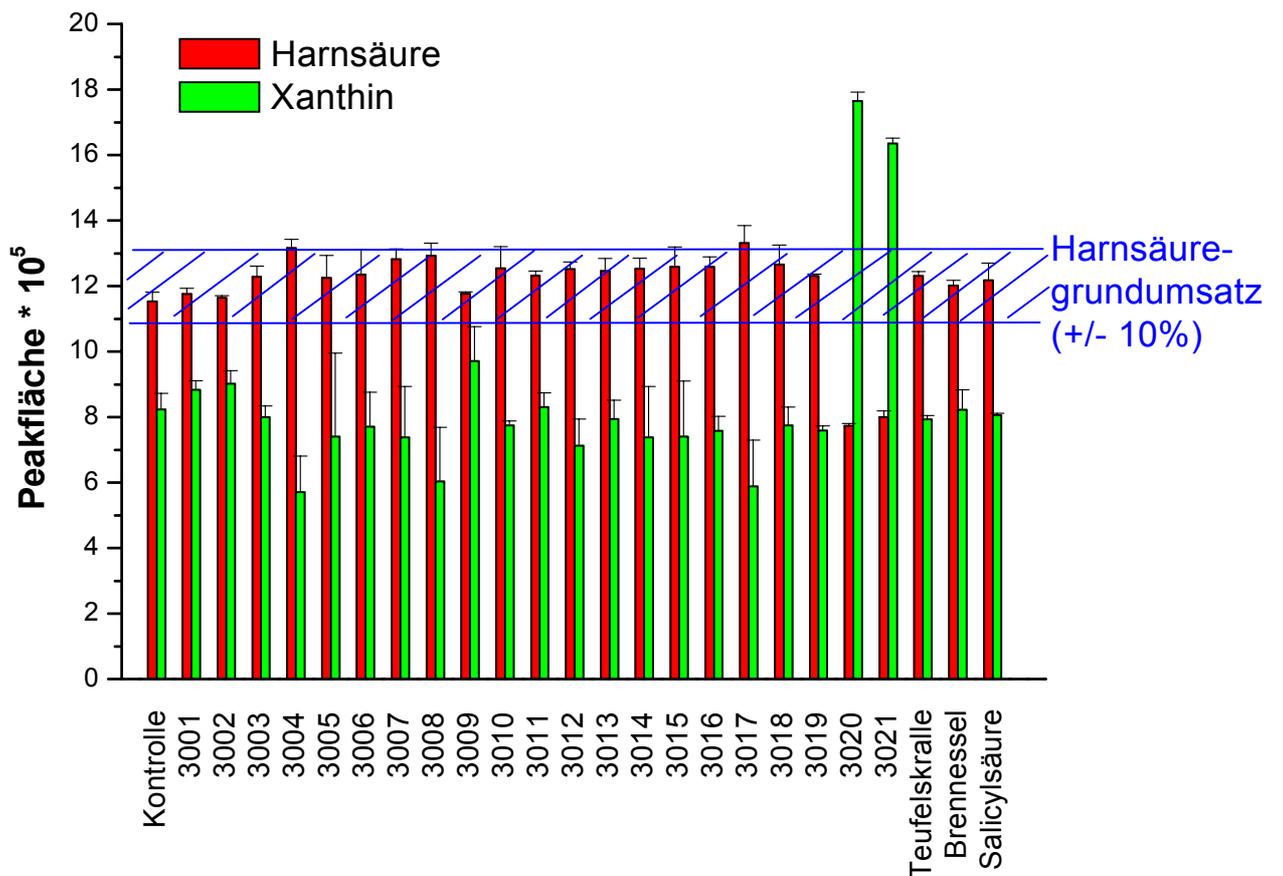


Abbildung 37 Umsatz von Xanthin zu Harnsäure durch XOD unter dem Einfluß von 3001-3021, Teufelskrallenextrakt, Brennesselextrakt und Salicylsäure (je 0,05 mg/ml). Der schraffierte Bereich stellt den Harnsäuregrundumsatz als Mittelwert der Kontrolle und aller Extrakte (ohne 3020 und 3021) +/- 10% dar.

### 4.1.3 Extraktanalytik

#### 4.1.3.1 Bestimmung des Gerbstoff- und Gesamtsalicingehalts

Zur genaueren Einordnung und Bewertung der oben beschriebenen Wirkungen der *Salix*-Extrakte ist es unabdingbar, eine möglichst umfassende und aussagekräftige Analyse durchzuführen.

Von der Firma Steigerwald Arzneimittelwerke liegen folgende Daten über die verwendeten Extrakte vor:

Tabelle 5      Angaben über Gesamtpolyphenolgehalt (Folin-Test mit Pyrogallol-äquivalenten) und Gesamtsalicin der einzelnen *Salix*-Extrakte

Code Nr.	Bemerkungen	Salicine [%] (w/w)	Gesamtpolyphenolgehalt [%] (w/w)
3001		25,9	15
3002		25,9	15,3
3003		24,2	19,3
3004		8,0	3,9
3005		23,6	11,4
3006		24,0	15,0
3006	Toluol		28,1
3006	Ethylac.		29,7
3006	Butanol		10,7
3006	Ethanol		4,0
3006	H <sub>2</sub> O		5,4
3007		30,6	3,81
3008		-	3,9
3009		26,7	4,6
3010		24,0	10,0
3011		24,8	9,8
3012		24,2	14,2
3013		10,9	5,7
3014		6,7	4,0

Code Nr.	Bemerkungen	Salicine [%] (w/w)	Gesamtpolyphenolgehalt [%] (w/w)
3015		7,1	3,1
3016	<i>Salix purp.</i>	20,9	13,2
3017	<i>Salix purp.</i>	16,2	10,0
3018		20,9	16,3
3019		16,6	8,8
3020		-	25,0
3021		-	25,5

Der Gesamtsalicingehalt der verschiedenen Extrakte variiert erheblich (Tabelle 5). Der Auszug 3014 weist lediglich einen Anteil von 6,7% auf, wohingegen 3007 mit 30,6% den höchsten Wert vorzuweisen hat. Für einen Großteil der Extrakte berechnet sich ein Gesamtsalicingehalt zwischen 21% und 26%.

Der Anteil an Polyphenolen liegt zwischen 3,1% und 19,3%. Eine Ausnahme stellen die beiden Extrakte 3020 und 3021 mit 25,0% bzw. 25,5% dar. Innerhalb der angegebenen Eckpunkte kommt es ebenfalls zu einer großen Streuung, so daß selbst bei gleichem Extraktionsmittel keine präzise Voraussage über die Polyphenolgehalte gemacht werden kann.

#### 4.1.3.2 Inhaltsstoffanalytik

Eine genauere Analytik der Extrakte ist aufgrund der begrenzten Aussagekraft der Ergebnisse aus 4.1.3.1 unabdingbar. Aus diesem Grund wird von jedem Extrakt eine unbehandelte, eine sauer und eine alkalisch hydrolysierte Probe mittels HPLC auf ihre Inhaltsstoffe hin untersucht. Im folgenden werden ausgewählte Chromatogramme wiedergegeben. Es handelt sich hierbei um Darstellungen der Extrakte 3004, 3008, 3015, 3020 und 3021, d.h. um Proben, die in den Testsystemen von X/XOD als besonders gut oder schlecht verifiziert wurden. Zusätzlich werden Chromatogramme von 3006, 3007 und 3009, d.h. all jener Extrakte, die zur Hemmung der Hyaluronsäuredepolymerisation eingesetzt wurden, abgebildet. Eine Gegenüberstellung der Analytik der Unterfraktionen von 3006 wird ebenfalls wiedergegeben.

Die aufgezeichneten Chromatogramme der *Salix*-Extrakte können grundsätzlich folgendermaßen strukturiert werden (Tabelle 6): In den ersten 14 min wird keine Referenzsubstanz detektiert. Zwischen Minute 14 und 18 werden Salicin und Saligenin gemessen. Phenolsäuren, wie Kaffeesäure, Flavan-3-ole, wie Catechin, aber auch Salicylsäure weisen Retentionszeiten zwischen 18 und 37 min auf. Flavonoidglycoside eluieren von 37 bis 47 min, wie z.B. Rutin mit 39,2 min. Alle eingesetzten Aglycone konnten erst nach diesem Zeitpunkt, d.h. ab Minute 47 (Quercetin, Luteolin, Kämpferol, Naringenin) gemessen werden.

Tabelle 6 Strukturierung der *Salix*-Chromatogramme nach Retentionszeiten und Stoffgruppen

Retentionszeit [min]				
0-14	14-18	18-37	37-47	47-57
-	Salicin Saligenin	Phenolsäuren Flavan-3-ole Salicylsäure	Flavonoid- glycoside	Flavonoide (Aglycone)

Nach einer sauren Hydrolyse ist immer eine größere Zunahme der Substanzen im Bereich von 47 bis 57 min zu verzeichnen als bei einer alkalischen Hydrolyse. Gleichzeitig nimmt die Fläche der Peaks mit einer Retentionszeit von 25 bis 40 min im Sauren deutlicher ab als im Alkalischen. Eine sauer durchgeführte Hydrolyse ist in Bezug auf Flavonoidglycoside als effektiver zu bewerten (Abbildung 38). Ein eindeutiger Einfluß sowohl der sauren als auch der alkalischen Hydrolyse auf den Salicingehalt ist nicht feststellbar.

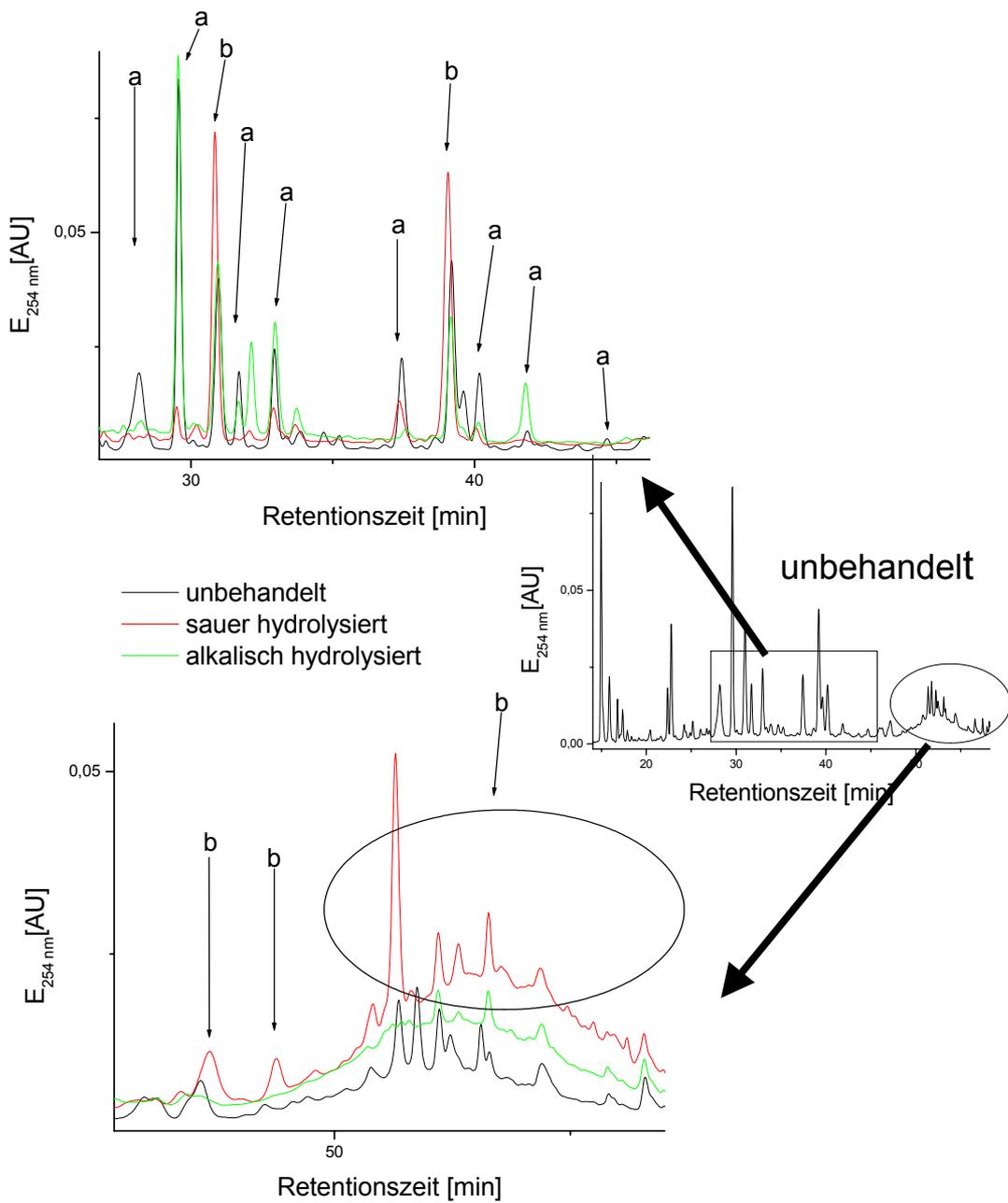


Abbildung 38 Einfluß der sauren und alkalischen Hydrolyse auf die Inhaltsstoffe bei *Salix*-Extrakten am Beispiel von 3001. a = Peak nimmt nach saurer Hydrolyse deutlich an Höhe und Fläche ab; b = Peak nimmt nach saurer Hydrolyse deutlich an Höhe und Fläche zu

### Vergleich von 3004, 3008, 3015, 3020 und 3021

Grundsätzlich konnten alle Referenzsubstanzen (siehe Material und Methoden) in den *Salix*-Extrakten gefunden werden. Jedoch enthält nicht jeder Auszug alle Reinstoffe, und die gefundenen Konzentrationen sind ebenfalls unterschiedlich. Die Extrakte 3004 und 3008 weisen wenige Peaks im Bereich der Flavonoide auf. Hydrophile Stoffe (Retentionszeit von 0 bis 5 min) sind in diesen beiden Auszügen deutlich angereichert. Im Vergleich zum Extrakt 3015 zeigen sie ebenfalls bei Retentionszeiten um die 30 min deutlich weniger Peaks (Abbildung 39). In diesem Bereich wird z.B. Ferulasäure detektiert. Nach saurer Hydrolyse nehmen viele dieser Peaks an Höhe ab, und eine Extinktionszunahme im Bereich nach 47 min ist zu verzeichnen. Insbesondere Naringenin liegt nun massiv im Extrakt 3015 vor. Dieser Effekt kann bei 3004 und 3008 nicht gemessen werden (Abbildung 40). Beim Betrachten des Inhaltsstoffspektrums der identifizierten Substanzen zeigt sich kaum ein Unterschied. Der Extrakt 3015 enthält etwa doppelt soviel Salicylsäure und Catechin. Naringenin konnte nur in diesem Auszug detektiert werden (Tabelle 7).

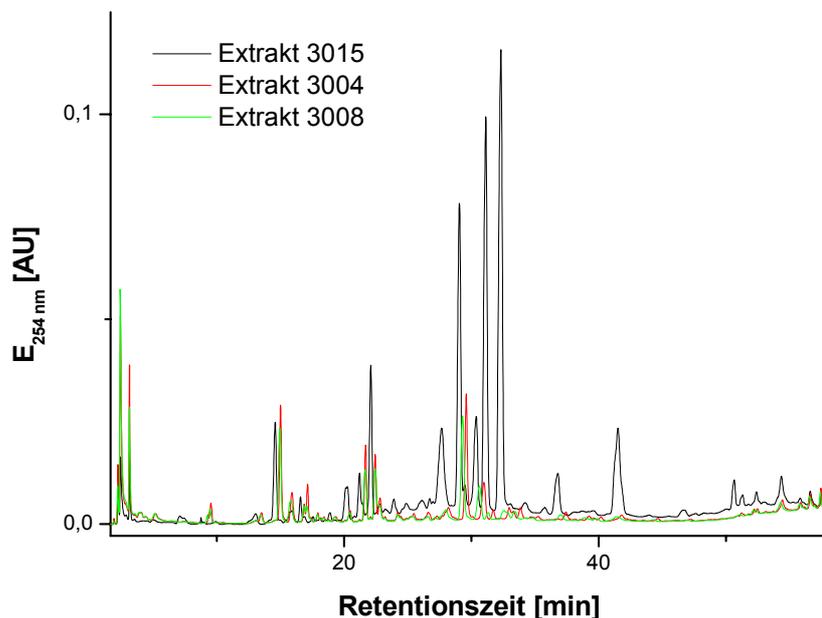


Abbildung 39 Chromatogramme der unbehandelten Extrakte 3004, 3008 und 3015

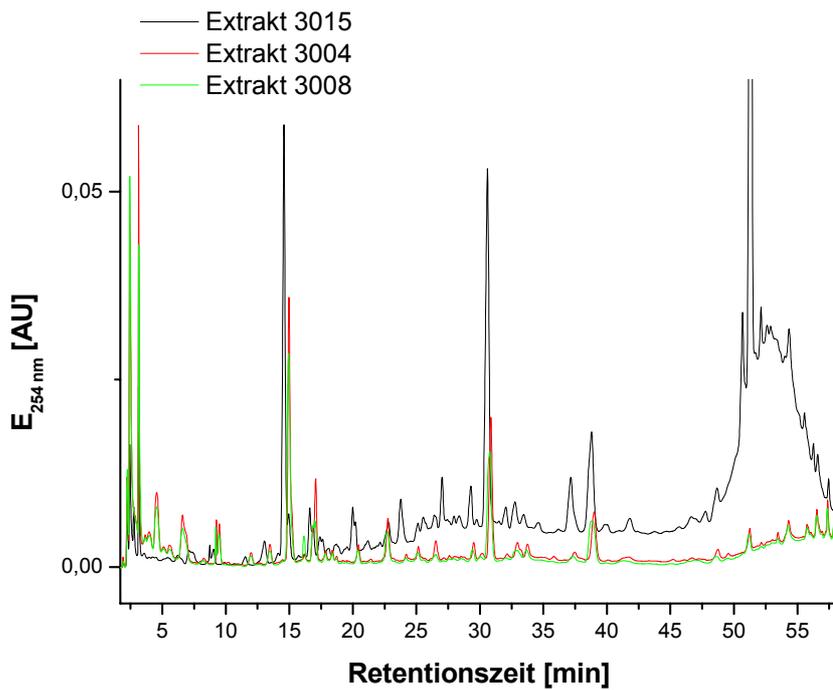


Abbildung 40 Chromatogramme der Extrakte 3004, 3008 und 3015 nach saurer Hydrolyse

Tabelle 7 Inhaltsstoffvergleich der Extrakte 3004, 3008 und 3015

Substanz [mg/ml]	Extrakt 3004	Extrakt 3008	Extrakt 3015
Salicin	0,16	0,16	0,17
Saligenin	0,05	0,05	0,05
Salicylsäure	0,04	0,04	0,11
Chlorogensäure	0,04	n.d.	0,04
Kaffeesäure	0,04	0,04	0,05
Ferulasäure	0,04	0,04	0,04
Catechin	0,06	0,05	0,1
Epicatechin	0,06	0,05	0,05
Isoquercitrin	n.d.	0,01	0,01
Luteolin	n.d.	n.d.	-
Naringenin	n.d.	n.d.	0,02
Quercetin	0,02	0,02	0,02
Kämpferol	-	-	-

n.d. nicht detektiert, - nicht quantifizierbar

Die Extrakte 3020 und 3021 sind nahezu identisch in ihren Chromatogrammen. 3021 hat bei einigen Substanzen jedoch eine höhere Konzentration aufzuweisen, z.B.

beim Peak mit der Retentionszeit 18,5 min (Abbildung 41). Nach einer Retentionszeit von 13,5 min wird eine unbekannte Substanz detektiert, die eine Hauptkomponente dieser Auszüge darstellt.

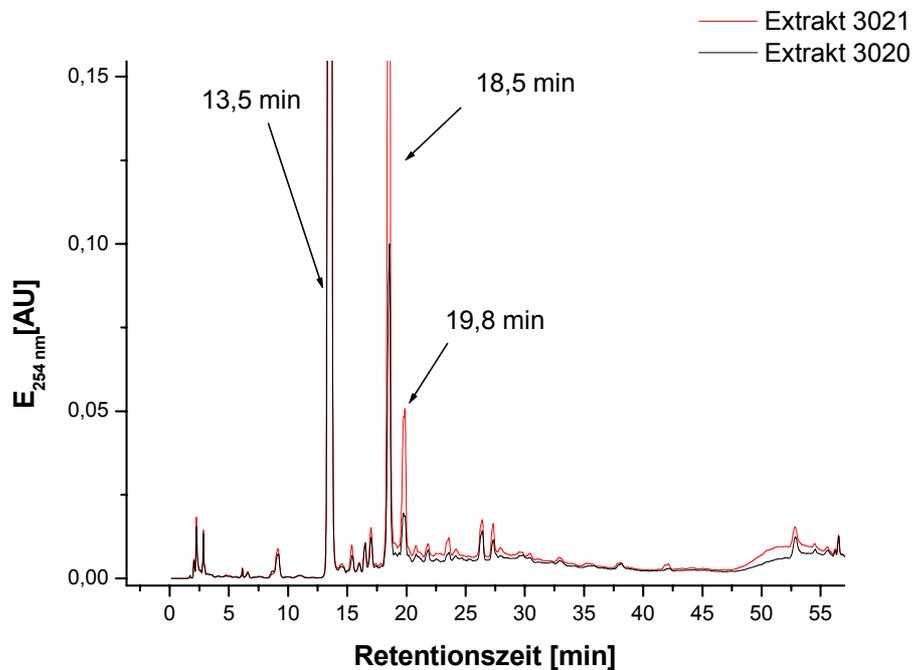


Abbildung 41 Chromatogramm der unbehandelten Extrakte 3020 und 3021

Da sich beide Chromatogramme nach Hydrolyse ebenfalls nur geringfügig unterscheiden, wird hier nur das Chromatogramm von 3021 abgebildet (Abbildung 42). Die beiden Peaks bei 18,5 min und 19,8 min verschwinden völlig, wohingegen bei beiden Arten der Hydrolyse Epicatechin stark ansteigt. Der Hauptinhaltsstoff mit einer Retentionszeit von 13,5 min erweist sich der Hydrolyse gegenüber als resistent.

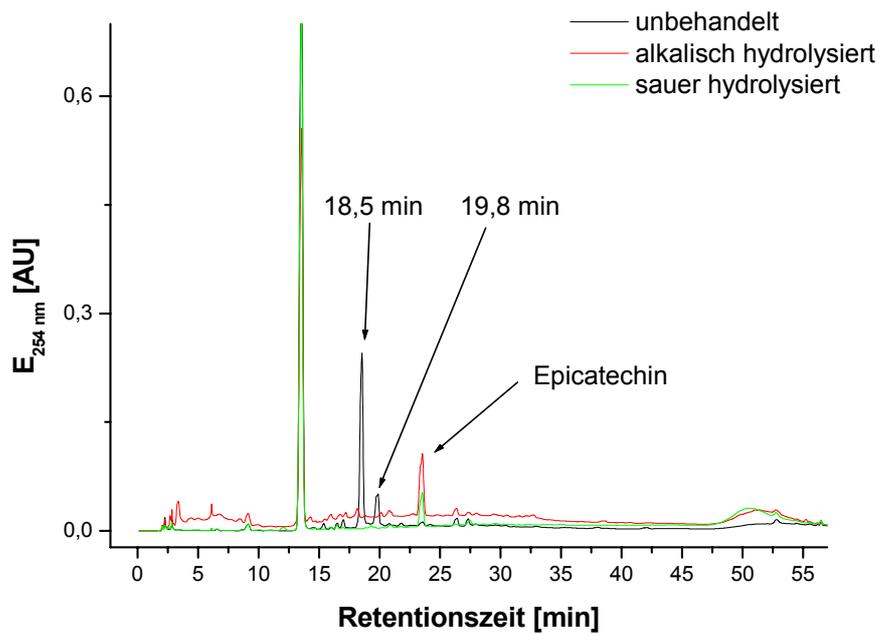


Abbildung 42 Chromatogramm des Extraktes 3021 unbehandelt und nach saurer bzw. alkalischer Hydrolyse

#### Vergleich von 3006, 3007 und 3009

Alle drei Extrakte wurden auf ihre Hemmwirkung während der oxidativen Hyaluronsäuredepolymerisation untersucht. Da sie keine signifikanten Unterschiede zeigen, obwohl 3009 ethanolisch und 3006 bzw. 3007 wässrig extrahiert wurden, wird das Inhaltsstoffspektrum genauer untersucht.

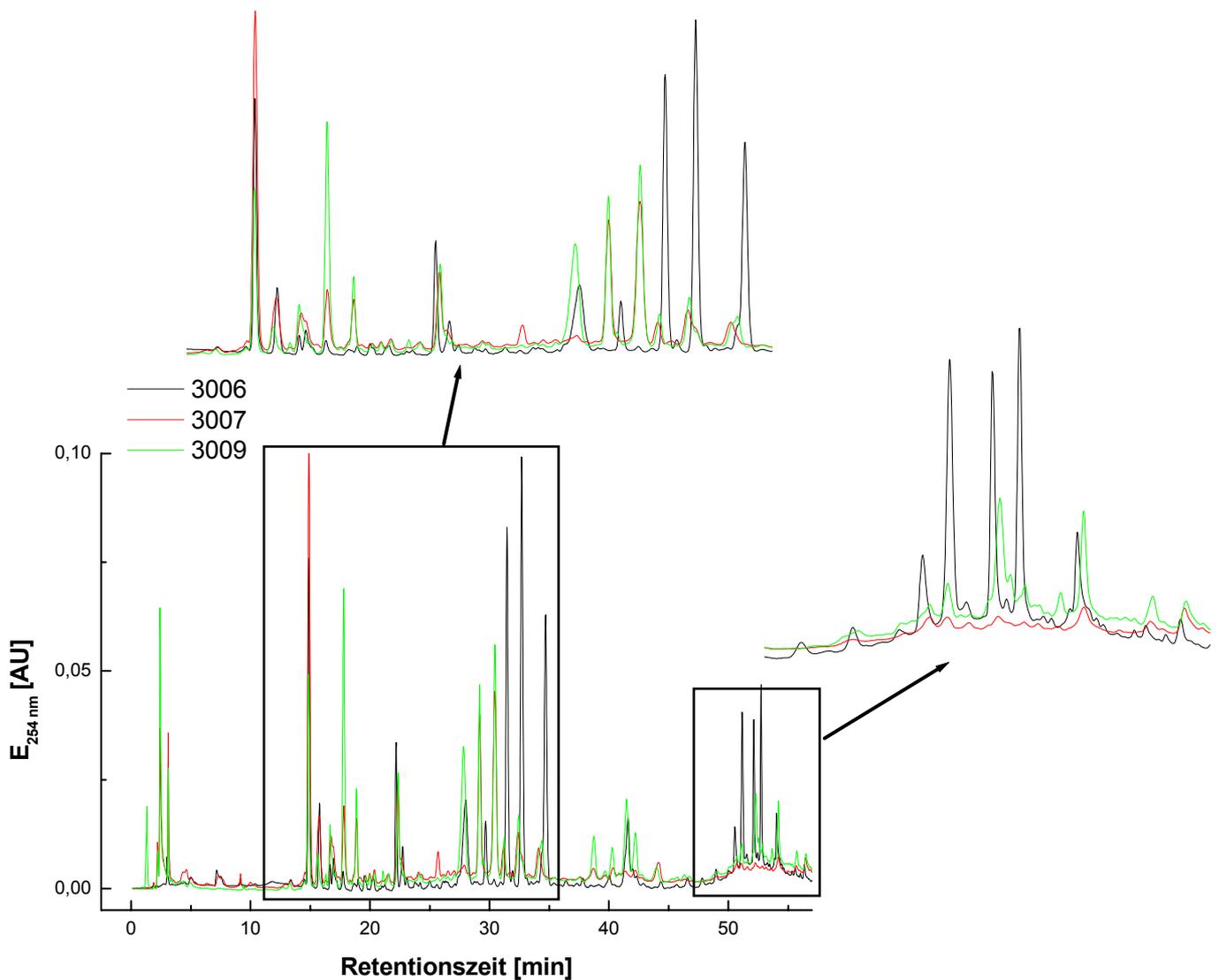


Abbildung 43 Chromatogramme der unbehandelten Extrakte 3006, 3007 und 3009

Das Chromatogramm von 3009 weist insbesondere im Bereich 0 – 5 min (sehr hydrophil) deutlich mehr und größere Peaks auf (Abbildung 43). Bei Retentionszeiten von 18 – 37 min zeigt v.a. 3006 einige auffällig große Peaks. Ein ähnliches Ergebnis wird auch im Bereich von 47 – 57 min verzeichnet. Im Zeitraum von 37 – 47 min kann Extrakt 3009 einige deutlich größere Peaks im Vergleich zu 3006 und 3007 produzieren. Ein Unterschied der drei Extrakte bei den Referenzsubstanzen ist v.a. bei Salicin detektierbar, wobei die Gehalte von 3009 über 3006 hin zu 3007 steigen (Tabelle 8).

Tabelle 8 Inhaltsstoffvergleich der Extrakte 3006, 3007 und 309

Substanz [mg/ml]	Extrakt 3006	Extrakt 3007	Extrakt 3009
Salicin	0,34	0,59	0,26
Saligenin	0,06	0,1	0,05
Salicylsäure	0,04	n.d.	0,04
Chlorogensäure	0,04	0,04	0,04
Kaffeensäure	0,04	0,04	0,04
Ferulasäure	0,04	0,04	0,05
Catechin	0,06	0,06	0,06
Epicatechin	0,05	0,04	0,05
Rutin	n.d.	0,03	0,03
Isoquercitrin	0,01	0,01	0,01
Luteolin	-	-	-
Naringenin	0,06	0,02	0,02
Quercetin	0,02	0,02	0,02
Kämpferol	-	-	0,0004

n.d. nicht detektiert, - nicht quantifizierbar

#### Vergleich der Unterfraktionen von 3006

Zur genaueren Analyse der Unterfraktionen von 3006 wurden von der Firma Steigerwald ebenfalls HPLC-Analysen bereitgestellt. Durchgeführt wurden die Analysen von Dr. K. Berger-Büter vom Institut für pharmazeutische Biologie der Universität Basel. Die entsprechenden Daten sind in Abbildung 44 bis Abbildung 46 dargestellt.

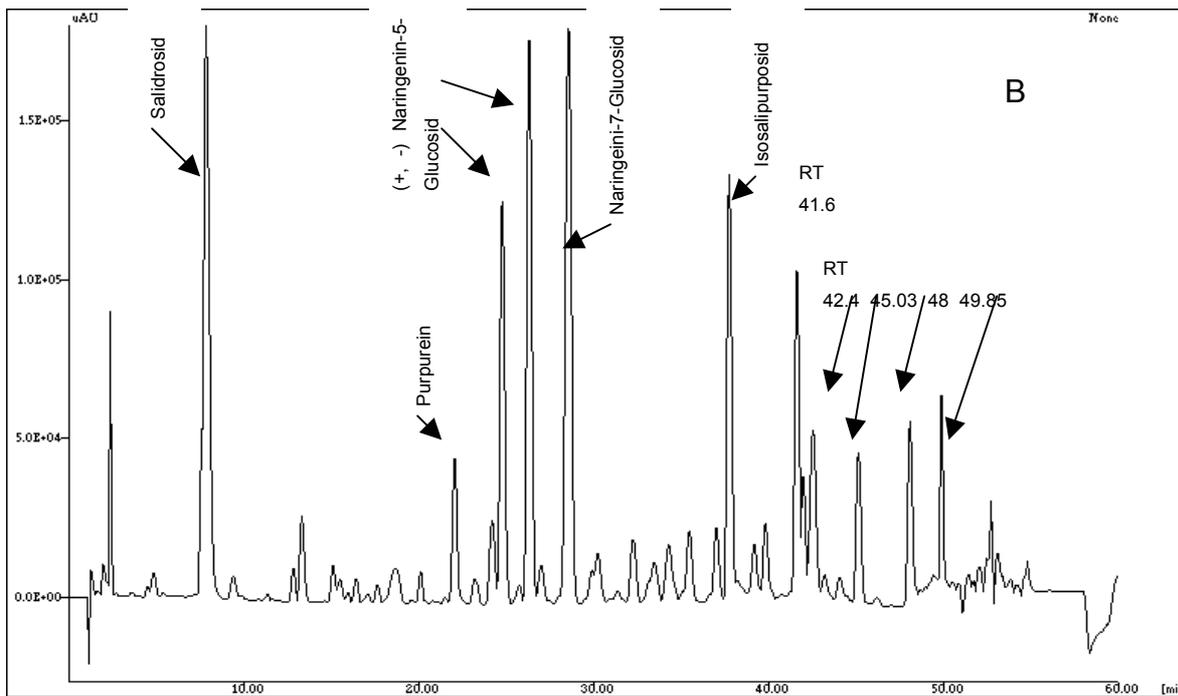
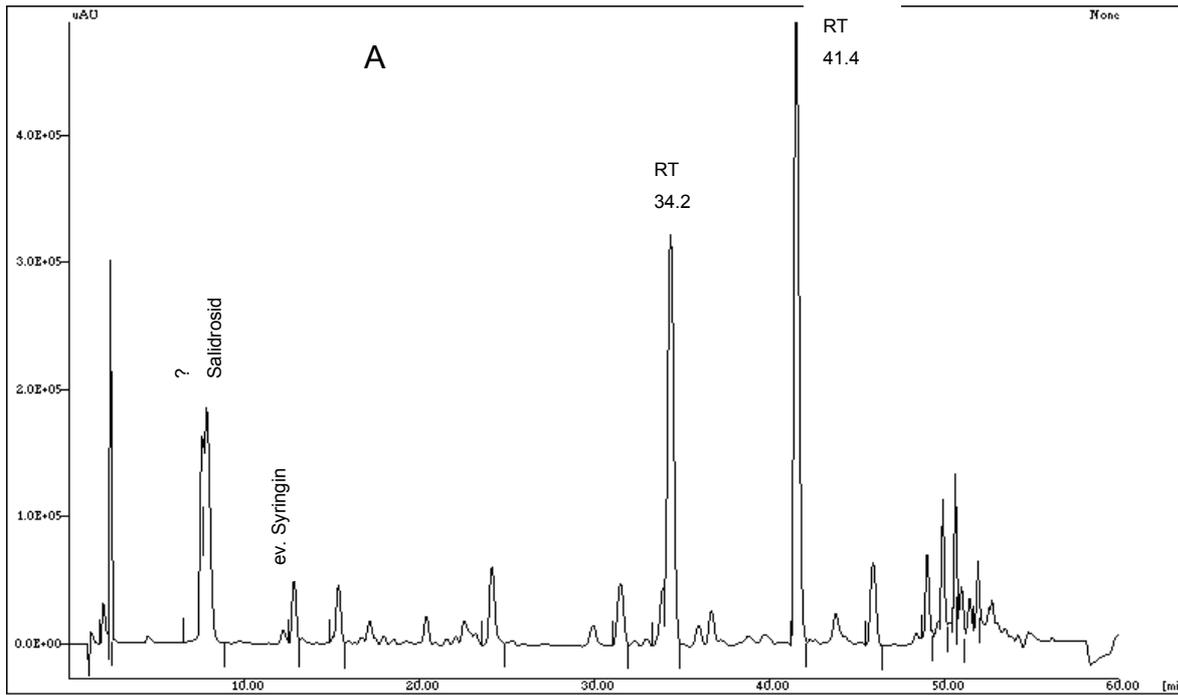


Abbildung 44 Chromatogramme von 3006<sub>Toluol</sub> (A) und 3006<sub>Ethylacetat</sub> (B) aufgenommen bei 254 nm (HPLC-Methode nach Shao, 1991)

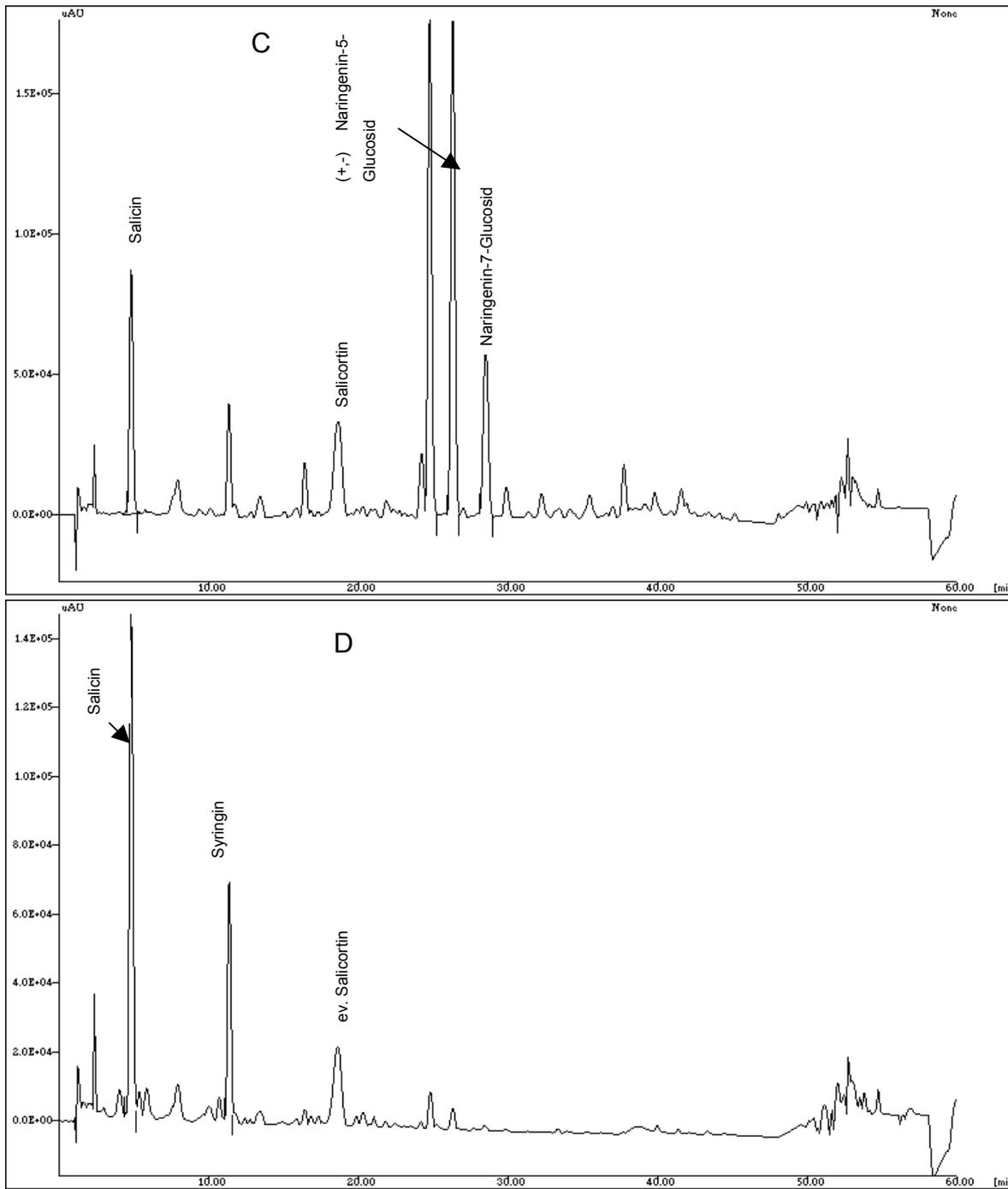


Abbildung 45 Chromatogramme von 3006<sub>Butanol</sub> (C) und 3006<sub>Ethanol</sub> (D) aufgenommen bei 254 nm (HPLC-Methode nach Shao, 1991)

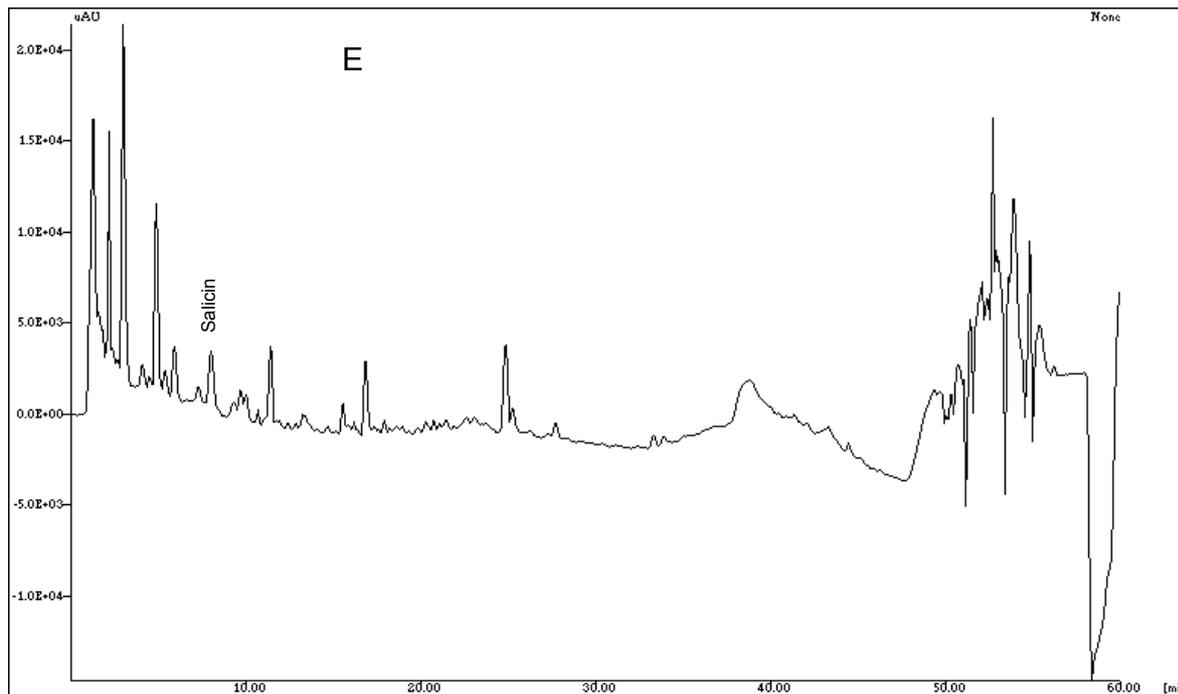


Abbildung 46 Chromatogramm von 3006<sub>Wasser</sub> (E) aufgenommen bei 254 nm (HPLC-Methode nach Shao, 1991)

Von den Unterfraktionen konnten insgesamt nur wenige Peaks in deren Chromatogrammen (Abbildungen 44 - 46) identifiziert werden. Besonders deutlich wird dies bei Chromatogramm A von 3006<sub>Toluol</sub>. Es zeigt die größten Peaks aller dargestellten Chromatogramme, aber kein einziger konnte zweifelsfrei einer bestimmten Referenzsubstanz zugeordnet werden. Die Fraktion enthält zwei Hauptkomponenten mit Retentionszeiten von 34,2 min und 41,4 min. Sowohl 3006<sub>Toluol</sub> als auch 3006<sub>Ethylacetat</sub> enthalten Substanzen, die sich über den ganzen Verlauf des Chromatogramms verteilen, d.h. die Inhaltsstoffe sind nicht auf den hydrophoben Bereich beschränkt. Von 3006<sub>Butanol</sub> über 3006<sub>Ethanol</sub> bis 3006<sub>Wasser</sub> nimmt der Gehalt an Stoffen mit späteren Retentionszeiten, d.h. hydrophoberen Eigenschaften, immer deutlicher ab. 3006<sub>Ethanol</sub> besitzt den höchsten Gehalt an Salicin, 3006<sub>Butanol</sub> noch halb so viel und 3006<sub>Wasser</sub> weist noch geringe Restmengen auf. In den Toluol- und Ethylacetatunterfraktionen liegt dieses Salicylsäurederivat nicht vor.

## Zusammenfassung

Die hier durchgeführten Versuche zeigen, daß *Salix*-Extrakte gute Radikalfänger-eigenschaften gegenüber Superoxid- und Hydroxylradikalen besitzen. Alle 21 Extrakte hemmen mehr oder weniger stark die Oxidation von Indikatormolekülen im X/XOD-System. Eine Hemmung der XOD-Aktivität konnte nur für 3020 und 3021 ermittelt werden. Salicylsäure, Brennesselextrakt und Teufelskrallenextrakt wiesen nur ein geringes antioxidatives Potential auf.

Es konnte zusätzlich gezeigt werden, daß *Salix*-Extrakte und Salicylsäure die oxidative Hyaluronsäuredepolymerisation konzentrationsabhängig hemmen. Der zum Vergleich eingesetzte Teufelskrallenextrakt wirkte ebenfalls protektiv, aber deutlich schwächer.

Zwischen den Extrakten konnten deutliche Unterschiede im Gesamtsalicin- und Gesamtpolyphenolgehalt bestimmt werden. Durch eine genauere Inhaltsstoffanalyse, insbesondere der sich in der antioxidativen Wirkung im X/XOD-System stark unterscheidenden Extrakte 3004, 3008 und 3015, wurden weitere Unterschiede in der Extraktzusammensetzung gemessen. 3015, der einen größeren Anteil an Polyphenolen aufweist, zeigt im X/XOD-System im Vergleich zu 3004/3008 die bessere Wirkung.

Die Unterfraktionen von 3006 zeigen eine unterschiedliche antioxidative Wirkung im X/XOD-System. Die beiden lipophilsten Fraktionen fangen das Superoxidradikal am effektivsten ab. Sie weisen zusätzlich einen hohen Anteil an Stoffen mit einer späten Retentionszeit auf.

Die Extrakte 3006, 3007 und 3009 unterscheiden sich in ihrem Inhaltsstoffspektrum weniger deutlich als die bisher beschriebenen Auszüge.

## **4.2 Lutein und Lycopin als Antioxidantien in einem Arteriosklerosemodell**

Die kupferinduzierte LDL-Oxidation stellt ein biochemisches Testsystem zur Evaluierung verschiedener Antioxidantien dar. Ergebnisse dieses Testsystems geben Hinweise auf die Wirksamkeit von Antioxidantien beim Schutz vor Arteriosklerose.

Gemessen wird einerseits die Bildung konjugierter Diene an mehrfach ungesättigten Fettsäuren, die zu einer merklichen Erhöhung der Extinktion bei 234 nm führt (Esterbauer et al., 1989). Je später diese Propagationsphase eintritt, desto länger dauert die Lag-Phase. Die eingesetzten und die endogenen Antioxidantien schützen während dieser Zeit LDL vor Lipidperoxidation. Die Wirkung von zugesetzten Stoffen wird anhand der Lag-Phasenverlängerung beurteilt. Weist diese Zeit ein negatives Vorzeichen auf, entspricht dies einem prooxidativem Effekt, umgekehrt bedeutet ein positives Vorzeichen einen antioxidativen Effekt. Große Lag-Phasenverlängerungen sind gleichbedeutend mit deutlichen protektiven Eigenschaften der Stoffe vor LDL-Oxidation im Lipidkern.

Andererseits kann die Abnahme der Fluoreszenzintensität der Aminosäure Tryptophan gemessen werden. Diese ist Bestandteil des ApoB100. Eine Oxidation des Proteinteils von LDL geht mit der Abnahme der Fluoreszenz einher, da mehr und mehr Tryptophan oxidiert wird. Bei diesem Prozeß verliert die Aminosäure ihre Eigenschaft zu fluoreszieren. Je länger die späte Proteinoxidation verzögert werden kann, desto wirksamer ist das eingesetzte Antioxidans. Tritt die späte Proteinoxidation jedoch früher ein, so wirkt der Stoff prooxidativ.

Mit Hilfe dieser beiden Meßverfahren kann zwischen der Oxidation am Proteinteil und am Lipidkern von LDL deutlich unterschieden werden. Dies läßt eventuell Rückschlüsse auf den Wirkungsmechanismus der Testsubstanzen zu.

Bei allen folgenden Abbildungen in diesem Kapitel, die Originalmessungen der Bildung konjugierter Diene im LDL zeigen, wurde der Kurvenverlauf jeder Testsubstanz auf einen einheitlichen Anfangswert angepaßt. Dies ist eine zulässige Datenkorrektur, da es sich um eine Parallelverschiebung der Kurven an der Y-Achse handelt. Der Eintritt der Lag-Zeit wird dadurch nicht verändert.

## 4.2.1 LDL-Oxidation unter Zugabe von Lycopin oder Lutein

### Lycopin bzw. Lutein in kristalliner Form

Zunächst wird untersucht, ob Lutein und Lycopin in kristalliner Form Wirkung zeigen. Zu diesem Zweck werden die beiden Carotinoide in einer PBS-Suspension dem Reaktionsansatz zugesetzt. Abbildung 47 läßt erkennen, daß nur geringe Unterschiede im Beginn der Lag-Phasen auftreten. Diese minimale Differenz liegt aber innerhalb der Varianz des Testsystems und wird deshalb nicht als pro-/antioxidativer Effekt betrachtet. Hinzu kommt, daß diese leichten Schwankungen um die Kontrolle keine einheitliche Tendenz aufwiesen.

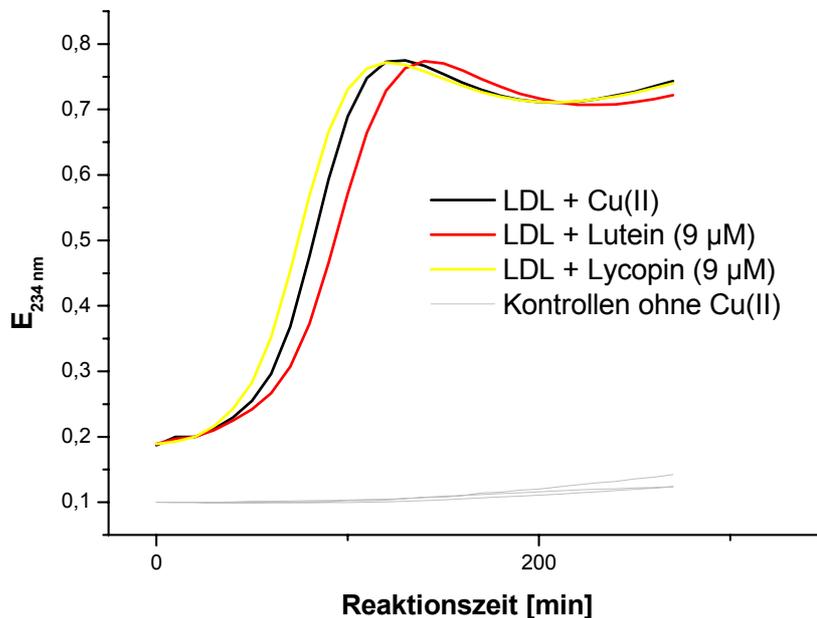


Abbildung 47 Bildung konjugierter Diene in LDL-Proben unter Zugabe von Lutein (kristallin) oder Lycopin (kristallin) als Suspension in PBS

### Lycopin bzw. Lutein als Solubilisat

Im Folgenden werden die beiden Carotinoide in Form eines Solubilisates eingesetzt. Diese Formulierung erlaubt es, alle Experimente ohne den Zusatz eines organischen Lösungsmittels durchzuführen. Der Emulgator SMO80 (Polyoxyethylen-20-Sorbitanmonooleat) führt zu einer klaren Lösung der Carotinoide im hydrophilen Reaktionsmilieu. Der Einfluß von SMO80 ist in Abbildung 48 dargestellt. Mit steigender Konzentration im Ansatz verändert sich auch die Kinetik der Bildung konjugierter Diene. Es kommt zu einer Reduzierung der Dienbildungsrate, d.h. die

Steigung der Tangente während der Propagationsphase nimmt ab. SMO80 greift demzufolge ins Reaktionsgeschehen ein und muß somit immer als Referenz verwendet werden.

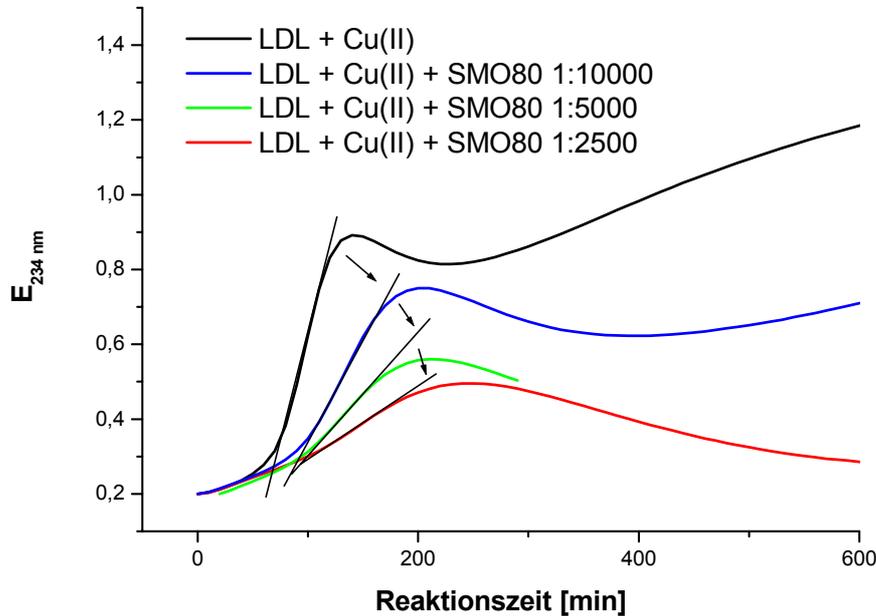


Abbildung 48 Bildung konjugierter Diene in LDL-Proben unter Zugabe von SMO80

Werden die beiden Carotinoide in solubilisierter Form dem Reaktionsansatz zugesetzt, dann zeigt Lutein im Vergleich zur SMO80-Kontrolle eine konzentrationsabhängige Verlängerung der Lag-Phase (Abbildung 49). Sie beträgt 23 bzw. 42 min für eine 0,5  $\mu\text{M}$  bzw. 1  $\mu\text{M}$  Luteinlösung. Lycopin weist in der wasserlöslichen Formulierung keine deutliche Verschiebung der Lag-Zeit (9 min) auf.

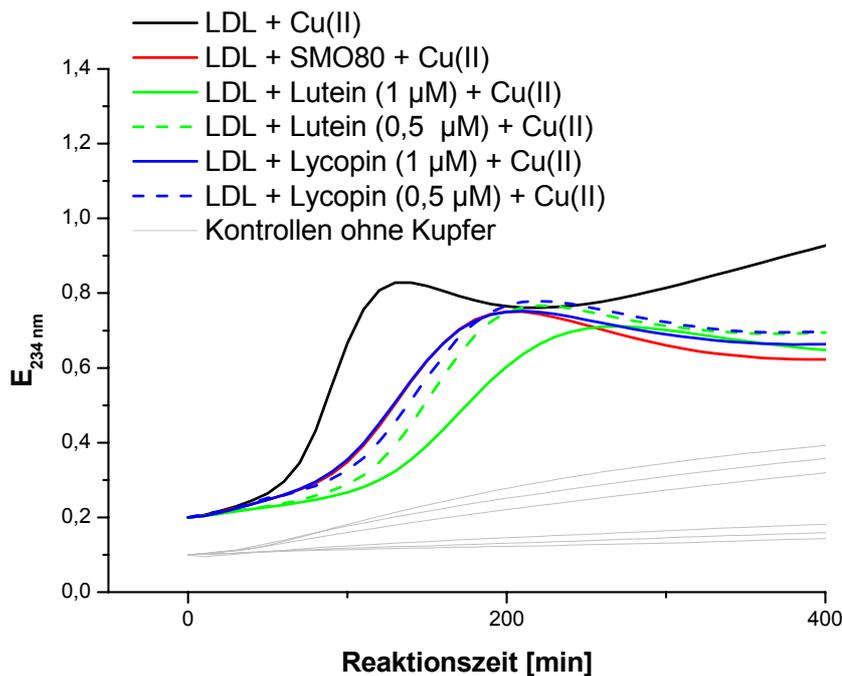


Abbildung 49 Bildung konjugierter Diene in LDL-Proben unter Zugabe von Lutein- bzw. Lycopinsolubilisaten

#### 4.2.2 LDL-Oxidation nach Vorinkubation des Plasmas mit Lycopin bzw. Lutein

##### Lycopin bzw. Lutein in kristalliner Form

Um LDL-Partikel vor der Isolierung mit Lycopin oder Lutein zusätzlich anzureichern, wird Plasma mit den entsprechen Substanzen für 90 min bei 37 °C inkubiert. Der Grad der Anreicherung kann durch die Wahl der Carotinoid-Konzentration beeinflusst werden. Trotzdem ist der Beladungsgrad nur bedingt reproduzierbar, da sich diese Substanzen auf alle Lipoproteine im Plasma verteilen. Letztendlich wird LDL immer unterschiedlich stark mit den Testsubstanzen angereichert. Dieser Umstand verdeutlicht die Notwendigkeit einer LDL-Analyse hinsichtlich lipophiler Antioxidantien, insbesondere der angereicherten Substanzen. Das bedeutet, LDL wird auf endogene Stoffe, wie  $\alpha$ -Tocopherol, Q<sub>10</sub>,  $\beta$ -Carotin, Lutein oder Lycopin, hin untersucht. Gleichzeitig kann der Anreicherungsgrad der Testsubstanz ermittelt werden.

Der Versuch, die beiden Carotinoide unter Verwendung der kristallinen Form in LDL anzureichern, schlug fehl. Die beiden Carotinoide waren dem Plasma als Suspension zugesetzt worden, so daß eine Konzentration von max. 1,66 mM entstand. Weder ein erhöhter Lutein- noch Lycopinspiegel waren im LDL meßbar. Die Oxidationsanfälligkeit, gemessen mittels Dienkonjugation, wurde im Falle des Luteins leicht erhöht. Bei Lycopin waren die Veränderungen sowohl bei der Messung der Dienkonjugation als auch bei der Abnahme der Tryptophanfluoreszenz zu gering, als daß sie aussagekräftig wären (Abbildung 50 und Abbildung 51).

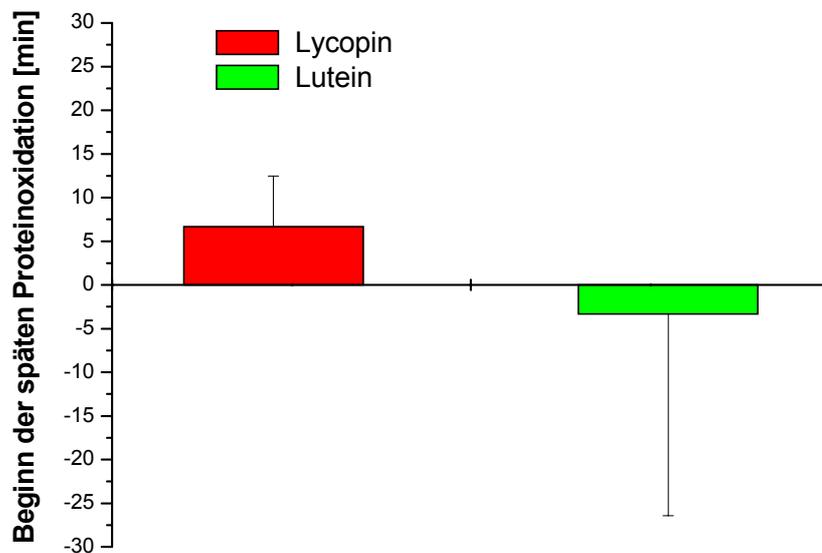


Abbildung 50 Abnahme der Tryptophanfluoreszenzintensität in LDL-Proben nach Inkubation des Plasmas mit Lycopin oder Lutein (beide kristallin)

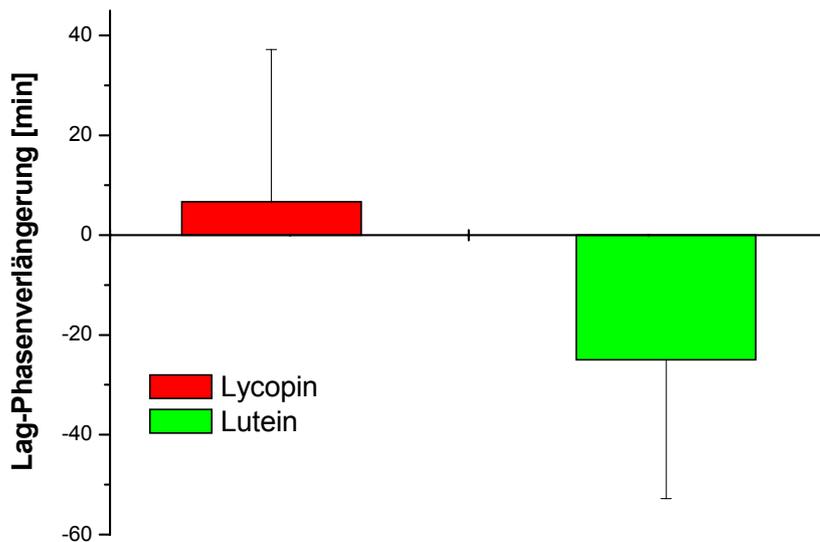


Abbildung 51 Bildung konjugierter Diene in LDL-Proben nach Inkubation des Plasmas mit Lycopin oder Lutein (beide kristallin)

#### Lycopin bzw. Lutein als Solubilisat

Eine Verwendung der Lutein- oder Lycopinsolubilisate bei der Inkubation des Plasmas wirft die Frage auf, ob der Emulgator an sich bereits einen Einfluß ausübt. Aus diesem Grund wird Plasma (2,7 ml) mit SMO80 (0,3 ml) in verschiedenen Konzentrationen (1:20, 1:100, 1:200) inkubiert und die Auswirkungen auf die Oxidierbarkeit des daraus isolierten LDL gemessen. Beim Betrachten des Kurvenverlaufs in Abbildung 52 fällt auf, daß ab einer 1:100 Verdünnung von SMO80 keine Veränderung der Reaktionskinetik, insbesondere der Bildungsrate an konjugierten Dienen, zu verzeichnen ist. Aus diesem Grund wird in allen folgenden Versuchen, die eine Inkubation des Plasmas mit Solubilisaten beinhalten, keine geringere Verdünnung als 1:100 verwendet.

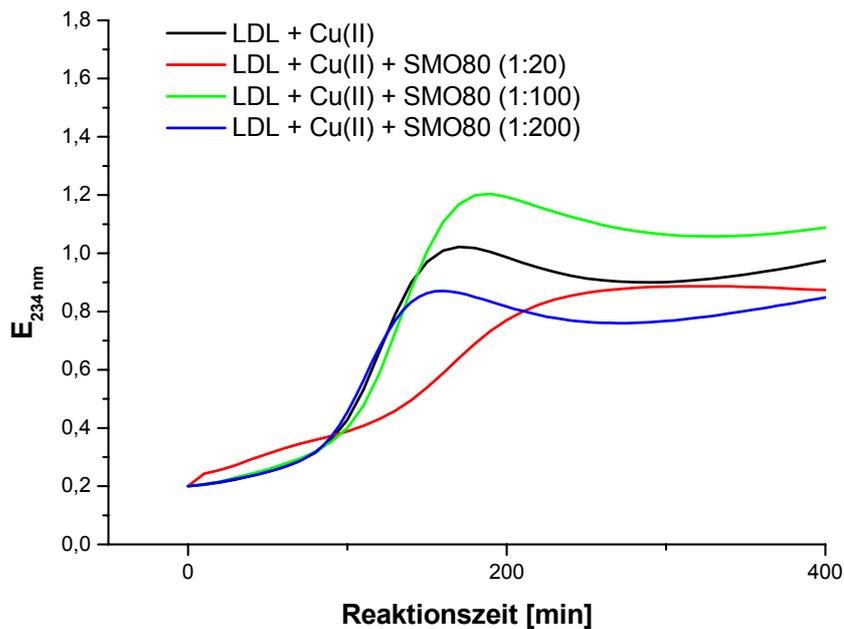


Abbildung 52 Bildung konjugierter Diene in LDL-Proben nach Inkubation des Plasmas mit verschiedenen SMO80-Konzentrationen

Unter Verwendung der Lycopin- oder Luteinsolubilisate konnte das entsprechende Carotinoid jeweils erkennbar in LDL angereichert werden. Lutein (Anreicherungsfaktor  $5,4 \pm 2,7$ ) wies aber im Gegensatz zu Lycopin (Anreicherungsfaktor  $2,0 \pm 0,8$ ) einen besseren Grad der Beladung auf. Die Lag-Phasenverlängerung fiel insgesamt sehr gering aus und belief sich im Mittel bei Lutein auf  $8,1 \text{ min} \pm 6,8 \text{ min}$  und bei Lycopin auf  $9,8 \text{ min} \pm 6,8 \text{ min}$  (Abbildung 53). Auffällig ist, daß Lycopin trotz eines geringeren Gehaltes im LDL eine minimal längere oder gleiche Lag-Phase wie Lutein verursacht. Die geringen Verzögerungen liegen aber alle im Bereich der Varianz des Testsystems. Ein eindeutiges antioxidatives Verhalten der beiden Carotinoide konnte demnach nicht nachgewiesen werden.

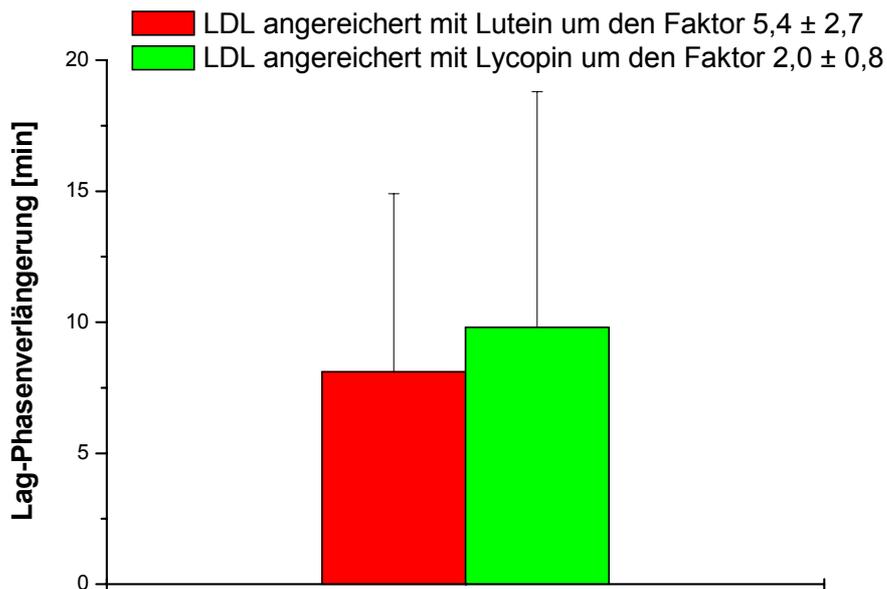


Abbildung 53 Gemessene Lag-Phasenverlängerung während der kupferinduzierten LDL-Oxidation (Plasma mit Lycopin- oder Luteinsolubilisaten vorinkubiert)

Wird die Abnahme der Fluoreszenz an Tryptophan des ApoB 100 während der Oxidation gemessen, so verursacht eine Beladung mit den erwähnten Carotinoiden keine deutliche Verzögerung der späten Proteinoxidation. Diese tritt bei Lycopin-angereicherten LDL nach  $-7 \text{ min} \pm 5,8 \text{ min}$  ein und im Fall des Lutein-angereicherten LDL nach  $16 \text{ min} \pm 13 \text{ min}$ . Es kann hier nicht von antioxidativem Verhalten der beladenen LDL-Fraktionen gesprochen werden. Beispielhaft wird eine Messung mit Lutein-angereicherten LDL in Abbildung 54 dargestellt.

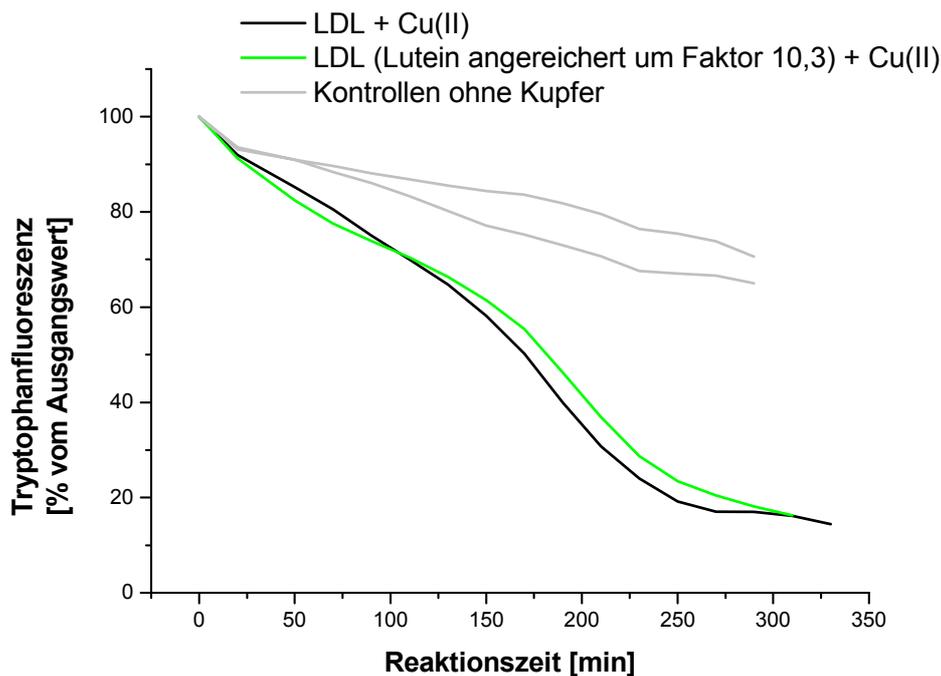


Abbildung 54 Abnahme der Tryptophanfluoreszenz in LDL-Proben. Plasma mit und ohne Luteinsolubilisat vorinkubiert

#### Kombination von Lutein- bzw. Lycopin-angereichertem LDL mit Rutin

Die Kombination eines lipophilen Antioxidans mit einem hydrophilen ergibt sehr häufig gute Resultate im Bezug auf die antioxidative Aktivität der beiden Einzelsubstanzen (Fuhrmann et al., 2000, Zhu et al., 2000). Auch unsere Arbeitsgruppe konnte bereits bei der LDL-Oxidation, insbesondere bei Verwendung von Rutin in Kombination mit anderen Substanzen, das antioxidative Verhalten verbessern (Milde et al., 2004). Im Rahmen dieser Arbeit wurde deshalb das Flavonoid Rutin, ein Quercetinglycosid, als Beispiel für ein hydrophiles Antioxidans gewählt. Dieses wird dem Ansatz kurz vor dem Reaktionsstart in Wasser gelöst zugegeben, also nicht mit dem Plasma vorinkubiert. Dort würde es an HSA binden und bei der LDL-Isolierung abgetrennt. Rutin hemmt die kupferinduzierte LDL-Oxidation konzentrationsabhängig. Bereits bei  $0,5 \mu\text{M}$  wird die Bildung konjugierter Diene leicht verzögert. Ab einer Konzentration von  $7,5 \mu\text{M}$  liegt die Propagationsphase außerhalb des Meßzeitraums von 1000 min (Abbildung 55).

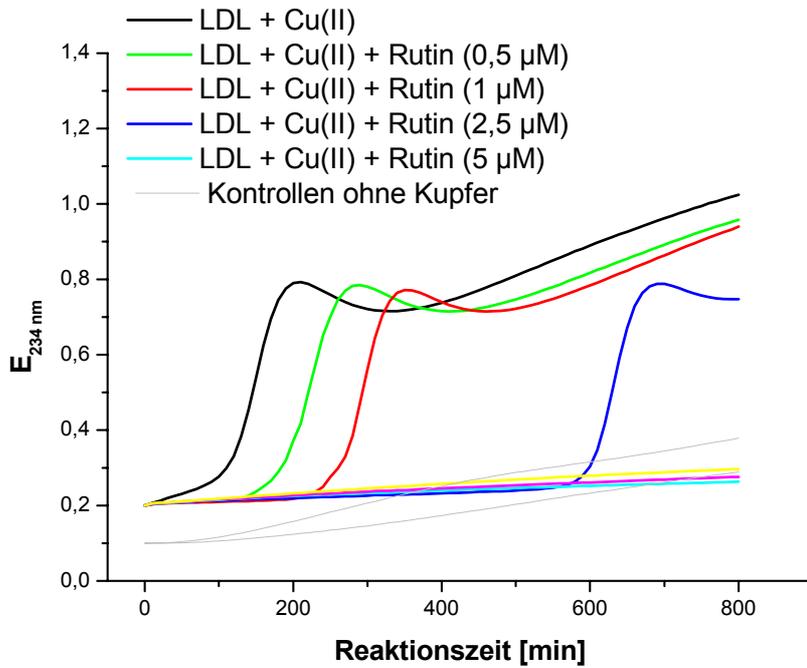


Abbildung 55 Kupferinduzierte Bildung konjugierter Diene in LDL-Proben unter dem Einfluß verschiedener Rutinkonzentrationen

Im Bereich von 0 - 5 μM konnte ein linearer Zusammenhang zwischen der gemessenen Lag-Phasenverschiebung und der eingesetzten Rutinkonzentration gemessen werden (Abbildung 56).

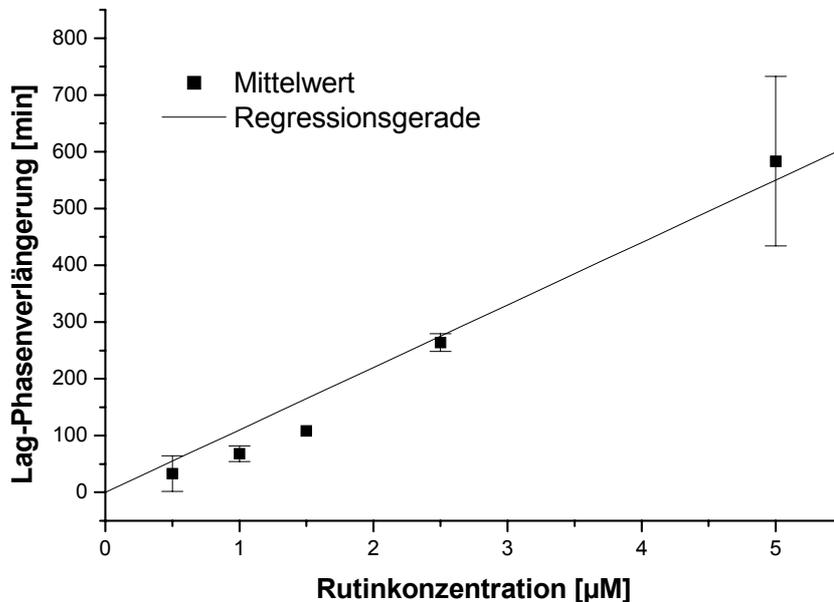


Abbildung 56 Ermittelte Lag-Phasenverlängerung verschiedener Rutinkonzentrationen während der kupferinduzierten LDL-Oxidation

Bei Betrachtung des kupferinduzierten Oxidationsverhaltens von LDL am ApoB 100 unter Rutineinfluß, zeigt sich ebenfalls eine konzentrationsabhängige Hemmung. Die Abnahme der Tryptophanfluoreszenzintensität kann bei einer Rutinkonzentration von 2,5  $\mu\text{M}$  um nahezu 350 min verzögert werden. Die geringste Konzentration (0,5  $\mu\text{M}$ ) hat keine sichtbaren Konsequenzen (Abbildung 57).

Der Proteinanteil von LDL ist vor oxidativen Schäden ähnlich gut durch Rutin geschützt wie der Lipidkern vor Lipidperoxidation.

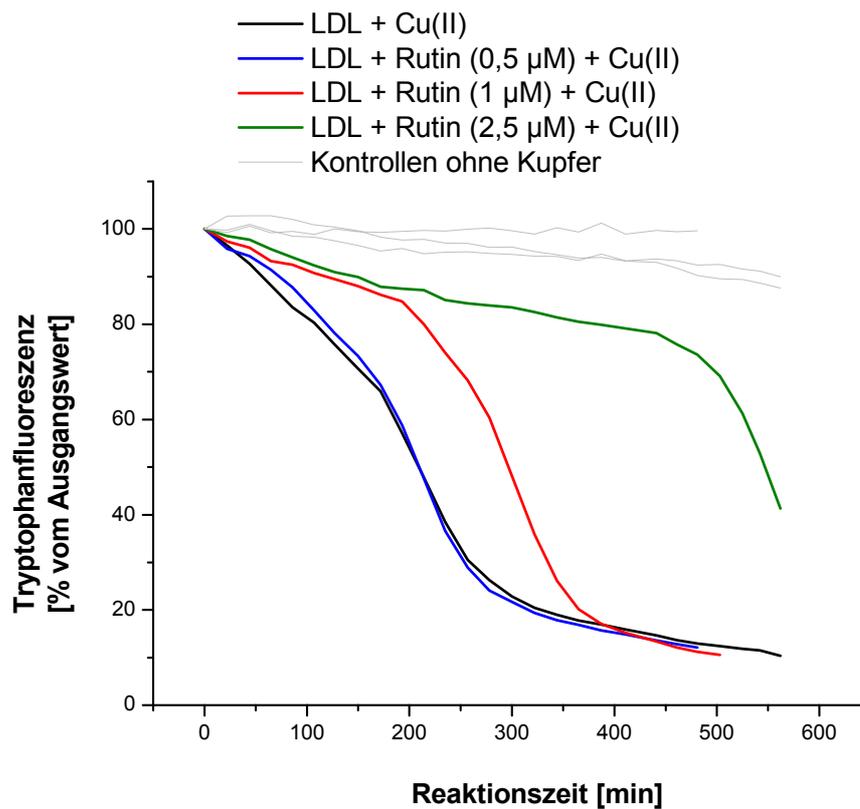


Abbildung 57 Abnahme der Tryptophanfluoreszenzintensität in LDL-Proben unter dem Einfluß verschiedener Rutinkonzentrationen

Wird mit Lycopin angereichertes LDL mit Rutin im Ansatz versetzt, so kommt es zu einem überadditiven Oxidationsschutz. Beispielhaft ist dies in Abbildung 58 dargestellt. Lycopin wurde hier um den Faktor 1,7 angereichert. Die übrigen endogenen Antioxidantien variieren zwischen den Proben nur geringfügig (Tabelle 11). Wie Tabelle 9 zu entnehmen ist, kann die errechnete Lag-Phasenverlängerung deutlich überschritten werden. Dieser Wert läge bei 240 min (1  $\mu\text{M}$  Rutin) bzw. 481 min (2,5  $\mu\text{M}$  Rutin), tatsächlich werden aber 303 min  $\pm$  28 min bzw. 538 min  $\pm$  41 min ermittelt.

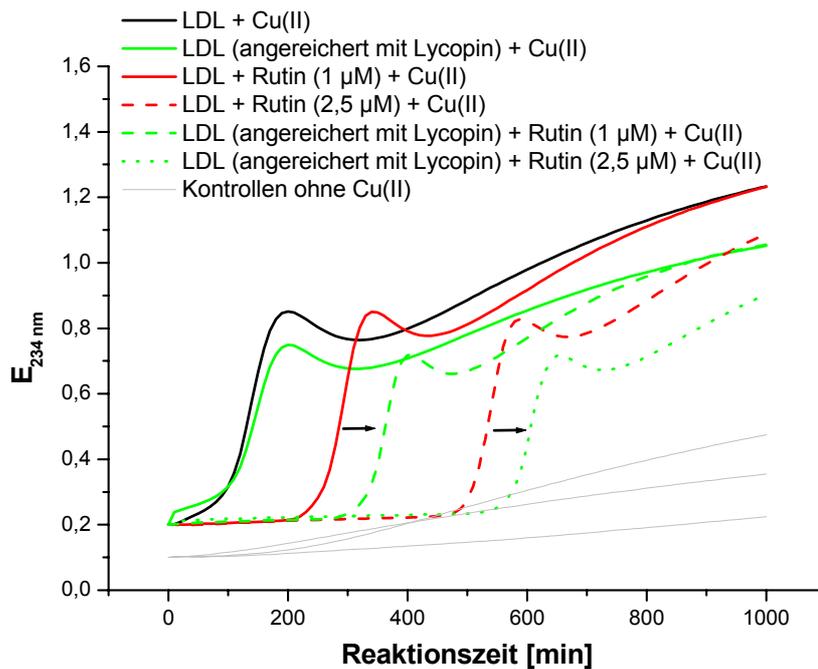


Abbildung 58 Bildung konjugierter Diene in LDL und mit Lycopin angereicherterem LDL unter dem Einfluß verschiedener Rutinkonzentrationen

Tabelle 9 Lag-Phasenverlängerung von LDL und Lycopin-angereicherterem LDL unter dem Einfluß verschiedener Rutinkonzentrationen

Probe	errechnete Lag-Zeit [min]	gemessene Lag-Zeit [min]
Kontroll-LDL	-	100 ± 2.8
LDL + Rutin [1 µM]	-	242 ± 17.0
LDL (angereichert mit Lycopin)	-	107 ± 12.7
LDL (angereichert mit Lycopin) + Rutin [1 µM]	249	303 ± 28.3
LDL + Rutin [2.5 µM]	-	474 ± 32.5
LDL (angereichert mit Lycopin) + Rutin [2.5 µM]	481	538 ± 41.0

Ein ähnliches Bild zeigt sich im Fall des mit Lutein angereichertem LDL. Hier ist der überadditive Effekt sogar noch deutlicher ausgeprägt. In den Abbildung 59 und Abbildung 60 handelt es sich um dieselbe LDL-Charge. Lutein wurde um den Faktor 5,5 angereichert. Die Gehalte der endogen vorhandenen Antioxidantien variieren zwischen den Proben nur geringfügig (Tabelle 11). Die rechnerische Lag-Phasenverlängerung liegt bei 305 min (1  $\mu$ M Rutin) bzw. 559 min (2,5  $\mu$ M Rutin). Die tatsächliche Verlängerung der Lag-Phase wird aber mit 379 min  $\pm$  11 min bzw. mit 690 min  $\pm$  5 min gemessen (Tabelle 10). Der überadditive Effekt ist im Falle des Lutein-angereicherten LDL ausgeprägter als bei mit Lycopin angereicherten Fraktionen.

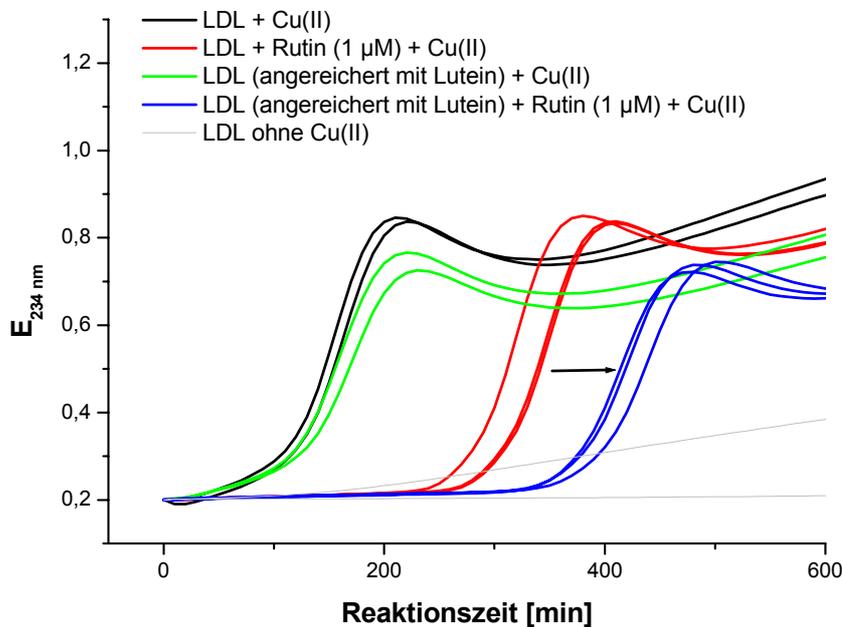


Abbildung 59 Bildung konjugierter Diene in LDL und mit Lutein angereichertem LDL mit und ohne Rutin (1  $\mu$ M). Darstellung mehrerer Parallelen einer Probe

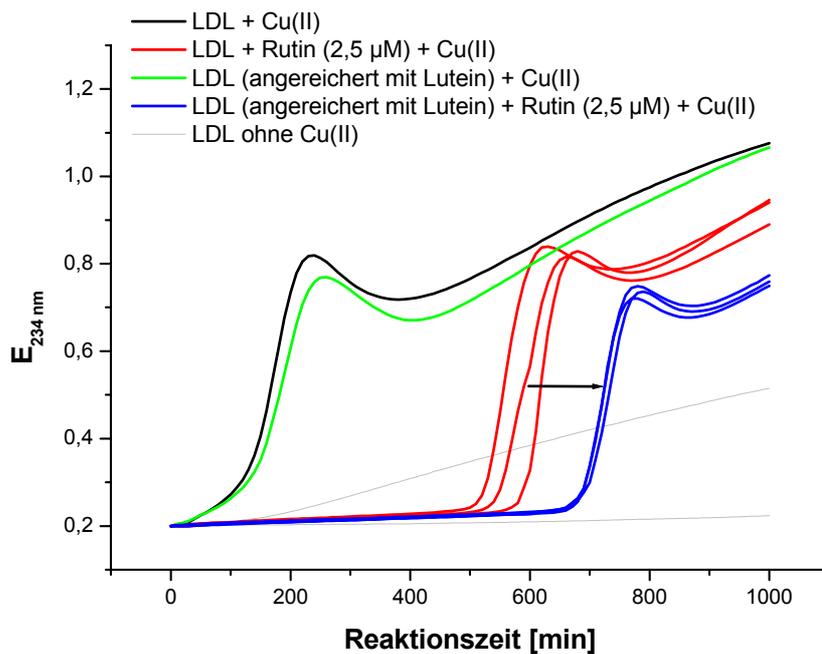


Abbildung 60 Bildung konjugierter Diene in LDL und mit Lutein angereicherterem LDL mit und ohne Rutin (2,5 µM). Teilweise Messung mehrerer Parallelen einer Probe

Tabelle 10 Lag-Phasenverlängerung von LDL und mit Lutein angereicherterem LDL unter dem Einfluß verschiedener Rutinkonzentrationen

Probe	errechnete Lag-Zeit [min]	gemessene Lag-Zeit [min]
Kontroll-LDL	-	115 ± 6
LDL + Rutin [1 µM]	-	299 ± 17
LDL (angereichert mit Lutein)	-	121 ± 7
LDL (angereichert mit Lutein) + Rutin [1 µM]	305	379 ± 11
LDL (angereichert mit Lutein)	-	138
LDL (angereichert mit Lutein) + Rutin [2.5 µM]	559	690 ± 5

Tabelle 11 Angaben über den Gehalt an endogenen Antioxidantien von LDL-Proben, die in Kombination mit Rutin eingesetzt wurden.

Substanz	Gehalt [mol/mol LDL]	sd
Lutein	0.9	0.2
$\alpha$ -Tocopherol	11.6	2.1
Lycopin	0.9	0.3
$\beta$ -Carotin	0.5	0.1
Q10	0.3	0.1

Nachdem die Kombination von Rutin und Lutein- bzw. Lycopin-beladenem LDL einen synergistischen Schutz des Lipidkerns verursacht, wird die Abnahme der Tryptophanfluoreszenz am ApoB 100 gemessen. Ein additiver Effekt zwischen Rutin und Carotinoid-angereichertem LDL kann erkannt werden (Abbildung 61).

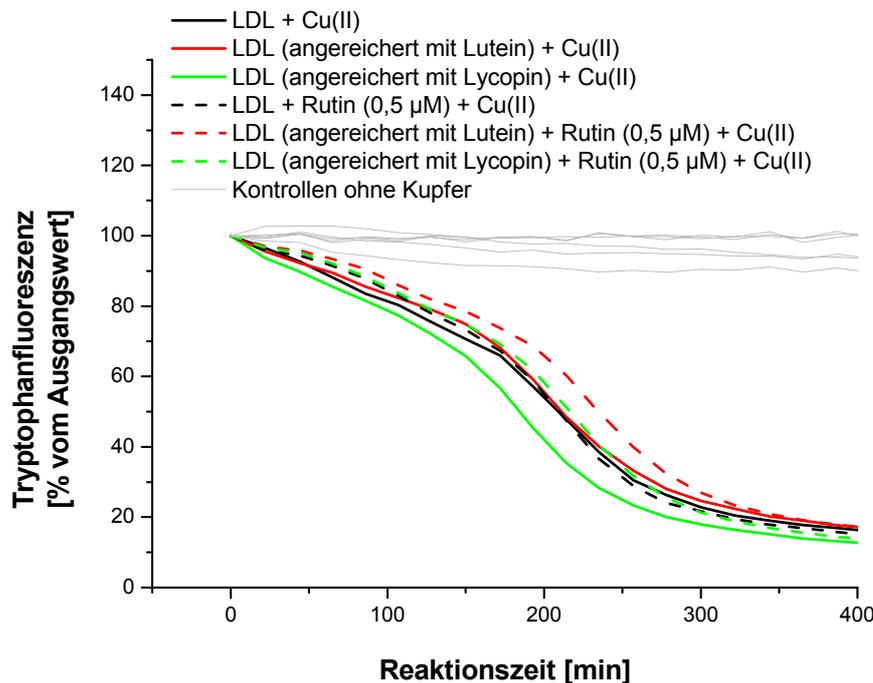


Abbildung 61 Abnahme der Tryptophanfluoreszenz bei LDL, Lutein- und Lycopin-angereichertem LDL in Kombination mit Rutin

Lutein wurde um den Faktor 5 und Lycopin um den Faktor 1,2 angereichert. Ein leicht prooxidatives Verhalten im Falle des Lycopins wird zu einem neutralen und eine

neutrale Aktivität bei Lutein wird in Kombination mit Rutin zu einer leicht antioxidativen umgewandelt. Die Gehalte der endogen vorhandenen Antioxidantien variieren zwischen den Proben nur geringfügig (Tabelle 12).

Tabelle 12 Angaben über den Gehalt an endogenen Antioxidantien der LDL-Proben, die in Kombination mit Rutin eingesetzt wurden und deren Bildung konjugierter Diene gemessen wurde.

Substanz	Gehalt [mol/mol LDL]	sd
Lutein	1.3	0.7
$\alpha$ -Tocopherol	12.4	2.1
Lycopin	0.9	0.1
$\beta$ -Carotin	0.6	0.1
Q <sub>10</sub>	0.3	0.0

## Zusammenfassung

Die Zugabe von Lycopin in den Reaktionsansatz zeigte kein antioxidatives Verhalten. Im Falle des Luteins war nur bei Verwendung der solubilisierten Formulierung eine geringe Lag-Phasenverschiebung zu verzeichnen.

Lutein und Lycopin konnten durch Inkubation des Plasmas vor der LDL-Isolierung unter Verwendung ihrer kristallinen Form nicht in LDL angereichert werden. Bei Gebrauch eines Solubilisats wurden beide in LDL mit erhöhten Werten nachgewiesen. Veränderungen im Status der endogen vorhandenen Antioxidantien im LDL, mit Ausnahme des anzureichernden Carotinoids, konnten durch die Vorinkubation des Plasmas nicht festgestellt werden.

Eine Erhöhung der Oxidationsresistenz von LDL konnte aber weder am Protein- noch am Lipidteil gemessen werden. Die ermittelten Verlängerungen sowohl der Lag-Zeit als auch der späten Proteinoxidation waren zu gering.

Eine synergistische Lag-Phasenverlängerung tritt bei der Lipidperoxidation, aber nicht bei der Proteinoxidation auf, sobald dem Ansatz das Flavonoid Rutin zugesetzt wird.

## 5 Diskussion

### 5.1 *Salix*-Extrakte als Antioxidantien in Arthritismodellen

*Salix*-Extrakte müssen laut Europäischem Arzneibuch von 2002 mindestens 1,5% Salicylsäurederivate (berechnet als Salicin) aufweisen. Salicylsäure liegt in den Extrakten aber meist gebunden in Form von Salicin oder Phenolglycosiden vor. Salicin wird durch die Darmflora in Glucose und Saligenin gespalten. Dieses wird resorbiert und im Blut oder in der Leber zu Salicylsäure oxidiert (Steinegger und Hövel, 1972). Möglicherweise erfolgt die Saligeninoxidation aber auch bereits in der Darmflora (Wagner, 2003). Im Blut wird nahezu ausschließlich freie Salicylsäure nachgewiesen (Schmid et al., 2001). Diese wird für die analgetische und anti-inflammatorische Wirkung von *Salix*-Extrakten verantwortlich gemacht und dient deshalb zur Standardisierung.

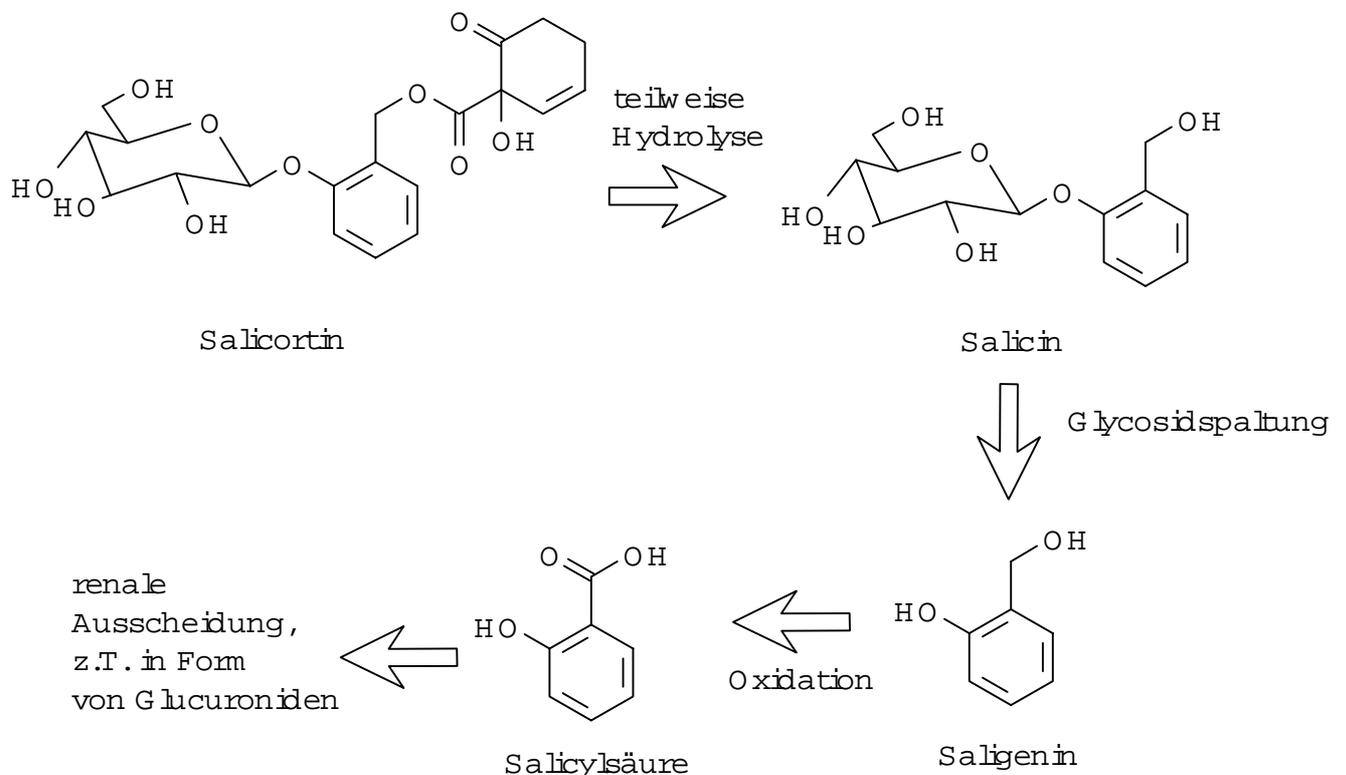


Abbildung 62 Metabolismus von Salicortin bzw. Salicin

## Ist der Gesamtsalicinwert eines *Salix*-Extrakts ein geeignetes Maß zur Standardisierung?

Ziel dieser Arbeit war es zunächst, festzustellen, ob es einen Zusammenhang zwischen dem Gesamtsalicingehalt verschiedener Weidenrindenextrakte und der Wirksamkeit in pathologisch relevanten, biochemischen Testsystemen gibt. Zu diesem Zweck wurden 21 verschiedene *Salicis cortex*-Extrakte untersucht.

Das X/XOD-System stellt pathologische Bedingungen während Ischämie und Reperfusion *in vitro* nach. Es konnten in diesem System Radikalfängereigenschaften aller Extrakte gegenüber Hydroxyl- (KMB-Spaltung) und Superoxidradikalen (Hydroxylaminoxidation) nachgewiesen werden. Eine Ausnahme stellt Extrakt 3008 bei der KMB-Oxidation dar. Ein Großteil der *Salix*-Extrakte unterschied sich in seiner antioxidativen Wirkung nicht. Der auffällig gute Effekt der Extrakte 3020 und 3021 läßt sich auf eine Hemmung der XOD zurückführen. Beide Auszüge sind im Labormaßstab hergestellte Chargen. Bei allen weiteren Betrachtungen spielen sie deshalb keine Rolle mehr, da sie nicht repräsentativ für im Produktionsmaßstab hergestellte *Salix*-Extrakte sind.

Salicylsäure selbst hemmt die XOD nicht, zeigt aber auch im X/XOD-System keine antioxidative Wirkung.

Der Extrakt 3015 sticht aus der Masse der durchschnittlichen Extrakte hervor, da er immer eine signifikant bessere Wirkung aufweist. Die Extrakte 3004 und 3008 dagegen zeigen stets eine signifikant schlechtere antioxidative Aktivität. Aufgrund der unterschiedlichen Wirkungen wurden diese drei Auszüge bezüglich ihrer Inhaltsstoffe näher untersucht.

Der Anteil an Gesamtsalicinen schwankt innerhalb aller Extrakte zwischen 6,7% bis max. 30,6%. Eine Korrelation zwischen Salicingehalt und Wirksamkeit im X/XOD-System konnte aber nicht hergestellt werden. Dies gilt sowohl für die Radikalfängereigenschaften gegenüber Superoxid- als auch Hydroxylradikalen. Unmittelbar deutlich wird dies beim Vergleich der Extrakte 3004 und 3015. Beide Gesamtsalicinwerte betragen 8% und liegen damit im unteren Bereich aller untersuchten Extrakte. Sie unterscheiden sich aber massiv in ihrer Wirkung. 3015 weist die beste antioxidative Wirkung aller Extrakte ohne Enzymhemmung auf. Der Extrakt unterdrückt sowohl die Nitritbildung als auch die Ethenfreisetzung jeweils um ca. 60% bzw. 50%. 3004 hingegen gehört zu den Extrakten mit der schlechtesten antioxidativen Wirkung. Die KMB-Spaltung wird lediglich um 17% und die

Hydroxylaminoxidation um 38% gehemmt. Diese Ergebnisse weisen bereits darauf hin, daß nicht die Salicinwerte allein für die antioxidative Wirkung verantwortlich sind. Untermauert wird diese Theorie durch Resultate aus der oxidativen Hyaluronsäuredepolymerisation. Salicylsäure zeigt hier die schlechtesten protektiven Eigenschaften aller untersuchten Substanzen. Gemessen wird dies an der Steigung der Regressionsgeraden zwischen verbliebener Peakhöhe nach oxidativem Angriff und eingesetzter Probenkonzentration. Bei einem Vergleich der rechnerisch verbleibenden nativen Hyaluronsäure bei 0,05 mg/ml Testsubstanz anhand der ermittelten Regressionsgleichungen ergibt sich folgendes Bild (Tabelle 13):

Tabelle 13      Verbliebene native Hyaluronsäure nach oxidativer Depolymerisation bei 0,05 mg/ml Testsubstanz i.A. errechnet anhand der Regressionsgleichungen aus Tabelle 4 und dazugehörige Gesamtsalicinwerte.

Substanz	3006	3007	3009	Salicylsäure
verbliebene native Hyaluronsäure [%]	77	69	81	53
Gesamtsalicinwert [%]	24,0	30,6	26,7	

Der Gesamtsalicinwert dieser Extrakte liegt zwischen 24,0% und 30,6%. Sie enthalten zudem auch fast keine freie Salicylsäure, sondern hauptsächlich die antioxidativ weniger wirksamen Glycoside (Wagner et al., 2003). Es müssen somit andere Substanzen vorhanden sein, die für die protektive Wirkung der Extrakte in diesem Testsystem verantwortlich sind.

Weitere Hinweise auf die Richtigkeit dieser Hypothese liefern Messungen von Schmid et al. (2001) an Patienten nach oraler Gabe von Weidenrindenextrakten. Es konnte gezeigt werden, daß nach 240 mg Salicineinnahme die resultierende AUC der im Plasma detektierten Salicylsäurederivate bioäquivalent zur AUC nach Gabe von 87 mg Acetylsalicylsäure ist. Aus diesem Grund sind die nach Einnahme therapeutischer Dosen Weidenrindenextrakt (240 mg) erzielten Salicylatblutspiegel zu niedrig, um eine analgetische Wirkung zu erhalten (Wagner et al., 2003). Diese werden erst ab einer Acetylsalicylsäure-Dosis von 325 mg – 1500 mg erzielt (Krüger, 2000). Eine analgetische Wirkung tritt aber bei vielen Patienten nach der empfohlenen Tagesdosis von 240 mg Weidenrindenextrakt (laut European Scientific

Cooperative on Phytotherapy) trotzdem ein. Die Salicylsäure kann deshalb nicht allein ausschlaggebend sein, und andere Substanzen müssen an der schmerzlindernden Wirkung beteiligt sein.

Fiebich und Chrubasik (2004) wiesen für einen *Salix*-Extrakt eine potente Hemmung der Freisetzung von PGE<sub>2</sub> und Zytokin *in vitro* nach, wohingegen Salicin oder Salicylsäure bei äquivalenter Konzentration keine oder nur eine geringe Wirkung zeigten. Welche anderen Inhaltsstoffe an der analgetischen und antirheumatischen Wirkung beteiligt sein könnten, steht bisher noch nicht fest. Ebenso ist die Frage nach den zugrundeliegenden Wirkmechanismen noch ungenügend geklärt. In Frage kommen Flavonoide, wie Quercetin und dessen Derivate, oder Catechine, die in Weiden in hohen Dosen vorkommen (Wichtel, 1997). Für Rutin, Quercetin, Isoquercitrin und zwei Kämpferolglycoside konnte an Mäusen eine signifikante Antinozizeption in einem Essigsäure-, Formalin- und Capsaicin-ausgelösten Nozizeptionstest gemessen werden (Calixto et al., 2000).

Mögliche Rückschlüsse können eventuell aus dem Verhalten der Unterfraktionen von Extrakt 3006 im X/XOD-System gewonnen werden. Die Butanol- und Wasser-Unterfraktionen zeigen keinen Unterschied zum Gesamtextrakt in ihrer Radikalfängereigenschaft gegenüber Superoxidradikalen. Es müssen also hydrophile Stoffe vorhanden sein, die gute antioxidative Aktivitäten aufweisen. Der ethanolisch gewonnene Auszug zeigt dagegen eine deutlich schlechtere Wirkung als 3006. Dies wirft die Frage auf, ob dieses Extraktionsmittel bei *Salix*-Extrakt-Produkten in dem Ausmaß zum Einsatz kommen sollte, wie das heute der Fall ist. Viele der auf dem Markt befindlichen Produkte (Assplant<sup>®</sup>, Assalix<sup>®</sup>, Rheumtab Salicis<sup>®</sup>, Salix Bürger<sup>®</sup>) verwenden 70% Ethanol zur Extraktion (Angaben der Hersteller). Die Toluol- und Ethylacetat-Fraktionen zeigen ein deutlich erhöhtes antioxidatives Potential im Vergleich zum Gesamtextrakt. Die Hauptwirkung in diesem Testsystem scheint also von den lipophileren Substanzen des Gesamtextraktes auszugehen. Aus produktionstechnischen Gründen ist es leider nicht möglich den Anteil der einzelnen Unterfraktionen am Gesamtextrakt 3006 genau zu ermitteln, da sich beim Wechsel der Extraktionsmittel immer Mischphasen einstellen, die verworfen werden müssen. Deshalb konnten die Unterfraktionen auch nicht gemäß ihrem Anteil in 3006 eingesetzt werden, sondern wurden alle in gleichen Konzentrationen getestet. Hierdurch wird die Dateninterpretation deutlich erschwert. Die vorliegenden Chromatogramme zu den Unterfraktionen belegen aber, daß in den Toluol- und

Ethylacetat-Fractionen kein Salicin vorhanden ist. Der Anteil an Flavonoiden, soweit identifiziert, und ähnlich lipophilen Substanzen ist hier am höchsten. Der Auszug mittels Butanol nimmt eine Zwischenposition ein. Flavonoide sind noch in Restmengen zu finden und Salicin ist bereits vorhanden, wenngleich nicht in dem Ausmaß wie im ethanolischen Extrakt. Dieser zeigt vor allem Salicin und in kleineren Mengen Syringin und Salicortin als Inhaltsstoffe. Der Restextrakt, der mit Wasser gewonnen wurde, beinhaltet so gut wie keine Flavonoide mehr, hingegen die meisten Inhaltsstoffe im sehr hydrophilen Bereich. Die antioxidativ wirkenden Verbindungen müssen v.a. im lipophileren oder im sehr hydrophilen Bereich zu finden sein. Salicin kann auf jeden Fall aufgrund des schlechten Abschneidens des ethanolischen Extraktes die Wirksamkeit von *Salix*-Extrakten im X/XOD-System nicht erklären und ist deshalb als Leitsubstanz weitgehend ungeeignet. Die durchgeführten HPLC-Analysen der Einzelextrakte bestätigen diese Ergebnisse. So sind z.B. die Extrakte 3004 und 3008 wesentlich ärmer an lipophileren Stoffen, als der antioxidativ wirksamere Extrakt 3015. Zusätzlich könnten viele unbekannte Peaks in den Chromatogrammen der unbehandelten Extrakte mit einer Retentionszeit um 30 min Glycoside verschiedener Flavonoide sein, die nach Hydrolyse in ihre Aglycone aufgespalten werden. Dies würde dann die deutliche Zunahme in Extinktion und Zahl der Peaks, insbesondere bei 3015, im Bereich ab 47 min nach saurer Hydrolyse erklären. Die Unterschiede werden also v.a. bei Polyphenolen, wie Catechinen und anderen Flavonoiden, deutlich.

Beispielhaft wurde deshalb die Radikalfängereigenschaft von Flavonoiden anhand von Catechin untersucht. Catechin ist ein Bestandteil von *Salicis cortex*-Extrakten (Wichtel, 1997) und konnte in allen eingesetzten *Salix*-Auszügen, mit Ausnahme der Unterfraktionen, nachgewiesen werden. Es hemmt die Nitritbildung im X/XOD-System sehr effektiv, vergleichbar den Extrakten 3020 und 3021. Catechin hat keinen Einfluß auf die XOD-Aktivität (Cos et al., 1998). Diese Daten lassen den Schluß zu, daß an der antiinflammatorischen Wirkung von *Salix*-Extrakten Substanzen, wie z.B. Flavonoide, beteiligt sind. ROS treten bei allen entzündlichen Reaktionen im Körper auf (siehe Einleitung) und Flavonoide sind mittlerweile für ihre hervorragenden antioxidativen Eigenschaften in verschiedensten biochemischen Testsystemen bekannt (Duthi und Crozier, 2000, Fukumoto und Mazza, 2000, Heijnen et al., 2002, Nakatani, 2000, Nijveldt et al., 2001, Pietta, 2000, Rice-Evans et al., 1996).

### Bestimmung von Gesamtpolyphenolgehalten mit Hilfe des Folin-Tests

Als eine weitverbreitete Methode zur Bestimmung des Gesamtpolyphenolgehalts gilt der Folin-Test (Singleton et al., 1998). Als Standard wird häufig Gallussäure oder wie in dieser Arbeit Pyrogallol eingesetzt (Al-Awwadi et al., 2004, Campanella et al., 2004, Gahler et al., 2003). Werden Stoffgemische, wie z.B. *Salix*-Extrakte, analysiert, so wird vorausgesetzt, daß sie untereinander kaum variieren und daß alle Polyphenole in gleicher Intensität mit dem Farbreagens reagieren. Dies ist aber bei vielen Extrakten nicht der Fall.

Beim Betrachten der Chromatogramme aus der Inhaltsstoffanalytik wird sofort die Heterogenität der Auszüge deutlich. Wie auch von Singleton et al. (1998) gezeigt, reagieren verschiedene Phenole unterschiedlich intensiv. Dies hängt beispielsweise von der Anzahl der freien Hydroxylgruppen ab. Aber auch viele andere reduzierende Substanzen, wie z.B. Sulfit, Ascorbinsäure oder Tyrosin können in diesem Test zu falsch positiven Ergebnissen führen. So ist es auch nicht weiter verwunderlich, daß die Angaben zu den Polyphenolwerten der einzelnen *Salix*-Extrakte in keinsten Weise mit der antioxidativen Wirkung in den Testsystem korrelieren. Gerade Polyphenole sind aber für ihre hervorragenden Radikalfängereigenschaften bekannt (Heijnen et al., 2002, Pietta, 2000, Rice-Evans et al., 1996). Besonders deutlich wird die Diskrepanz an den Auszügen 3004 und 3015, die beide einen Gesamtpolyphenolwert in Pyrogalloläquivalenten von 8% haben. 3004 besitzt eine der geringsten antioxidativen Aktivitäten, 3015 hingegen die beste der nicht-enzymhemmenden Extrakte im X/XOD-System.

Der Folin-Test zur Bestimmung der Gesamtpolyphenole ist hervorragend zur Analyse oder Standardisierung von in sich homogenen Gemischen geeignet. Bei sehr heterogenen Extrakten, wie in dieser Arbeit verwendet, ist er aber ungeeignet.

### Wirken *Salix*-Extrakte nur über eine COX-Hemmung?

Weidenrindenextrakte werden seit jeher zur Behandlung von Fieber, Schmerzen und rheumatischen Beschwerden eingesetzt (Hiller und Melzig, 2000, Krüger, 2000). Der genaue Wirkmechanismus ist aber noch immer ungeklärt, so daß ein weiterer Aspekt dieser Arbeit das Aufzeigen neuer möglicher Mechanismen war. Für die Hauptwirkung von *Salix*-Extrakten wird Salicylsäure durch seine unspezifischen COX-Hemmung verantwortlich gemacht (Calixto et al., 2000, Krüger, 2000). Neuere Untersuchungen zeigen, wie oben bereits erwähnt, eine *in vitro* Hemmung der

Zytokin- und PGE<sub>2</sub>-Freisetzung durch *Salix*-Extrakt, aber nicht durch Salicylsäure (Fiebich und Chrubasik, 2004), die *in vivo* bisher noch nicht bestätigt werden konnte (Wagner et al., 2003).

Zur Bestimmung des antioxidativen Potentials von *Salix*-Extrakten wurden sie in biochemischen Systemen getestet. Dieses Potential stellt einen Teilaspekt der antiinflammatorischen Fähigkeiten dar, weil ROS an allen entzündlichen Erkrankungen maßgeblich beteiligt sind (siehe Einleitung).

Das X/XOD-System soll pathologische Bedingungen während Ischämie und Reperfusion *in vitro* reproduzieren. Bei rheumatischen Erkrankungen kommt es in betroffenen Gelenken unter Belastung zu einer druckinduzierten Ischämie, die bei Entspannung in Reperfusion übergeht (Blake, 1997). Die Xanthindehydrogenase liegt dann als XOD vor, die auch in humanen Endothelzellen des Synoviums gefunden wurde (Allen et al., 1987, Stevens et al., 1992). Wie oben bereits erwähnt, konnten eindeutige Radikalfängereigenschaften vieler *Salix*-Extrakte gegenüber Hydroxyl- (KMBSpaltung) und Superoxidradikalen (Hydroxylaminoxidation) bestimmt werden. Diese Befunde gehen einher mit zwei Veröffentlichungen von Rohnert et al. (1998). Salicylsäure zeigte bei den eingesetzten Konzentrationen keine Wirkung.

Eine Hemmung der XOD kommt bei Weidenrindenextrakten nicht zum Tragen, mit Ausnahme der Extrakte 3020 und 3021. Beide reduzieren den Grundumsatz von Xanthin um ca. 1/3. Sie weisen in ihren Chromatogrammen einen Hauptinhaltsstoff bei einer Retentionszeit von 13,5 min auf, der in allen anderen Extrakten in dieser hohen Konzentration nicht zu finden ist. Diese Substanz, vermutlich ein Aglycon, könnte für die Hemmung der XOD-Aktivität ausschlaggebend sein. Solche Weidenrindenextrakte könnten so durch veränderte Wirkmechanismen zu einer effektiveren Therapie bei rheumatischen Beschwerden beitragen. Die beiden im Labormaßstab hergestellten Extrakte spielen aber bei den weiteren Betrachtungen keine Rolle mehr, da sie nicht repräsentativ für im Produktionsmaßstab hergestellte Chargen sind.

Bei der Hydroxylaminoxidation fällt die Wirkung aller Extrakte etwas schlechter aus als im Vergleich zur KMB-Spaltung. Ein Grund könnte die unterschiedliche Enzymaktivität in beiden Systemen sein. Die verschiedenen reaktiven Sauerstoffspezies der beiden Nachweisreaktionen kommen ebenfalls als Erklärung in Frage. So wird bei der Hydroxylaminoxidation hauptsächlich die antioxidative Aktivität gegenüber Superoxidradikalen gemessen, da nur diese in der Lage sind aus

Hydroxylamin Nitrit zu bilden. Bei der KMB-Spaltung wird vornehmlich die Radikalfängereigenschaft gegenüber Hydroxylradikalen ermittelt. Diese werden über den Haber-Weiss-Mechanismus (Abbildung 9, S. 22) produziert und sind somit nur ein indirektes Produkt der XOD-Reaktion. Die Testsubstanzen können deshalb auch noch an anderen Stellen bei der Hydroxylradikalentstehung antioxidativ eingreifen, z.B. durch Komplexbildung von Übergangsmetallen oder durch Hemmung der Reduktion von Wasserstoffperoxid während der Fenton-Reaktion. Die eingesetzten Auszüge könnten demzufolge eine unterschiedliche Sensitivität gegenüber den beiden ROS aufweisen. Gleichzeitig läßt das System der KMB-Spaltung viel mehr antioxidative Angriffspunkte zu. Der antioxidativ beste Extrakt bei der Nitritbildung bleibt aber auch der effektivste bei der Ethenfreisetzung (3015). Umgekehrt gilt dies ebenso für die weniger wirksamen Extrakte 3004 und 3008.

In einem anderen Testsystem zur Arthritis wurden weitere *Salix*-Extrakte untersucht. Hyaluronsäure stellt einen Hauptbestandteil der Synovialflüssigkeit in Gelenken dar. Ihre primäre Aufgabe dort besteht im „Schmieren“, d.h. sie verhindert aufgrund ihrer hohen Viskosität den Abrieb des Gelenkknorpels und gewährleistet auf diese Weise eine lange und reibungslose Funktion der Gelenke (Trommer et al., 2003). Bei entzündlichen Erkrankungen, wie der rheumatoiden Arthritis, kann es durch ROS, freigesetzt aus aktivierten Leukozyten oder Makrophagen (Jahn et al., 1999, Li et al., 1997, Miller und Britigan, 1995, Wong et al., 1981), zur Depolymerisation, also einer Fragmentierung, einhergehend mit einem Verlust der Viskosität und des „Schmiereffekts“ kommen (Balazs, 1967). Schäden an den betroffenen Knorpeln und Knochen bleiben meist nicht aus (Lengfelder und Fink, 1987). Die Suche nach geeigneten Antioxidantien, um der oxidativen Depolymerisation entgegen zu wirken, wäre möglicherweise ein wichtiger Schritt bei der Therapie rheumatischer Erkrankungen. Ausreichend vorhandene und intakte Hyaluronsäure ist für solche Patienten essentiell. Dies wird daran deutlich, daß Hyaluronsäureinjektionen seit Jahren eine weitverbreitete Indikation darstellen (Engstrom-Laurent, 1997, Kuiper-Gertsma und Bijlsma, 2000, Marshall, 2003). Wie in der vorliegenden Arbeit gezeigt wurde, greifen sowohl *Salix*-Extrakte als auch Salicylsäure antioxidativ bei der Depolymerisation von Hyaluronsäure ein und schützen diese vor Fragmentierung. Der wirksamste *Salix*-Extrakt (3009) schützt etwa drei mal so gut wie Salicylsäure, gemessen an der Steigung der Regressionsgeraden zwischen nativer Hyaluronsäure nach oxidativem Angriff und eingesetzter Konzentration. Salicylsäure hat mit Abstand

den insgesamt geringsten Wirkungsgrad. Die beiden anderen eingesetzten Weidenrindenextrakte haben im Vergleich zur Salicylsäure einen doppelt so hohen Wirkungsgrad. Der Gesamtextrakt oder einige Inhaltsstoffe sind also in der Lage, die Viskosität der Synovialflüssigkeit bei oxidativem Streß aufrecht zu erhalten.

Zur besseren Einordnung der erzielten Effekte wurden andere Phytopharmaka, die bei gleicher Indikation Verwendung finden (Teufelskrallen- und Brennesselextrakt), eingesetzt. Teufelskrallenextrakte enthalten wirksame Iridoidglycoside und werden bei der unterstützenden Therapie von degenerativen Erkrankungen des Bewegungsapparates eingesetzt (Leblan et al., 2000, Monographie der Kommission E, 1989 und 1990, Wegener, 1999, Wegener und Lupke, 2003). Die Kommission E des ehemaligen Bundesgesundheitsministeriums hat auch das Brennesselkraut zur unterstützenden Behandlung bei rheumatischen Beschwerden empfohlen (Monographie der Kommission E, 1987, Wagner et al., 2003).

Im X/XOD-System hatte der Brennesselextrakt jeweils keine oder nur eine sehr geringe Aktivität gegen ROS gezeigt. Der Extrakt aus Teufelskralle zeigte hier im Vergleich zwar antioxidative Eigenschaften, stellte sich aber nicht als ein besonders potenter Radikalfänger heraus.

Aus meßtechnischen Gründen konnte nur der Einfluß von Teufelskrallenextrakt auf die oxidative Hyaluronsäuredepolymerisation ermittelt werden, da der Brennesselextrakt zu stark gefärbt ist und somit die Detektion der Hyaluronsäure bei 230 nm stört. Der Auszug aus Teufelskralle schützte Hyaluronsäure effektiver vor Fragmentierung als Salicylsäure.

Aufgrund der hier gewonnenen Daten können Brennesselextrakte keine echte Alternative zu *Salix*-Extrakten darstellen. Teufelskrallenextrakte weisen zumindest eine moderate Wirkung in beiden Testsystemen auf.

Insgesamt konnte gezeigt werden, daß die Auswirkungen einer enzymatisch katalysierten Entzündungsreaktion (X/XOD) deutlich gehemmt werden können. Falls Weidenrindenextrakte oder deren Komponenten bis in Gelenkspalten vordringen sollten, könnten sie dort zum einen das gesamte Entzündungsgeschehen durch Abfangen von ROS - zusätzlich zur COX-Hemmung - unterdrücken. Da diese Fähigkeit nicht auf Salicylsäure zurückgeführt werden kann, ist dies eine mögliche Erklärung für die guten analgetischen und antipyretischen Eigenschaften von *Salix*-Extrakten, trotz deren geringen Acetylsalicylsäureäquivalenten. Zusätzlich sind die in *Salix*-Extrakten vorhandenen Flavonoide auch in der Lage, die Aktivität von COX zu

hemmen (Pietta, 2000). Zum anderen wurde zum ersten Mal gezeigt, daß *Salix*-Extrakte und Salicylsäure die Hyaluronsäure vor oxidativer Depolymerisierung *in vitro* schützen können. Sollten entsprechende Komponenten an den Ort der Entzündung vordringen, so kann dies *in vivo* helfen, die Viskosität der Synovialflüssigkeit unter dem Einfluß von ROS zu erhalten. Dies kann ebenfalls einen neuen Wirkmechanismus bei der Behandlung von Rheumapatienten darstellen.

## **5.2 Lutein und Lycopin als Antioxidantien in einem Arteriosklerosemodell**

Carotinoide sind Pigmente, die hauptsächlich von Pflanzen synthetisiert werden und für den Menschen von essentieller Bedeutung sind. Nachdem in den vergangenen Jahren hauptsächlich  $\beta$ -Carotin intensiv auf seine antioxidativen und gesundheitsfördernden Eigenschaften hin untersucht worden ist (Bhavani und Kamini, 1998, Daga et al., 1997, Dagenais, 2000, Kudlova, 2000, Olson, 1999, Patrick, 2000, Totter, 1994), rücken nun andere Carotinoide mehr und mehr ins Blickfeld der Forschung. Insbesondere Lycopin und Lutein spielen bei Erkrankungen, wie Prostatakrebs (de la Taille et al., 2001, Heber 2002) oder altersbedingter Makuladegeneration (Alves-Rodrigues, 2002), eine entscheidende präventive Rolle. Epidemiologische Studien zeigen zudem einen umgekehrt proportionalen Zusammenhang zwischen dem täglichen Lycopin- bzw. Luteinkonsum und der Progression von Arteriosklerose (Dwyer et al., 2001, Rao, 2002, Rissanen et al., 2003). Diese Daten sind aber widersprüchlich zu Ergebnissen anderer Arbeitsgruppen, die hier keine Verbindung sehen (D'Odoricio, 2000, Klipstein-Grobusch, 2000).

Ziel dieser Arbeit war es, die Wirkung der beiden Carotinoide auf die kupferinduzierte LDL-Oxidation zu testen, um mögliche Anhaltspunkte für das Verhalten *in vivo* zu erlangen. Oxidiertes LDL spielt bei der Atherogenese eine entscheidende Rolle (Berliner und Heinecke, 1996, Chisholm und Steinberg, 2000, Heinecke, 1998, Steinberg, 1997, Witztum und Steinberg, 2001) und dient als *in vitro*-Modell für diese Erkrankung. Die beiden Carotinoide wurden dem Reaktionsansatz einerseits nach der LDL-Isolierung in Form einer Suspension oder eines Solubilisats zugesetzt. Andererseits wurde Plasma vor der LDL-Isolierung mit den beiden Formulierungen inkubiert, so daß sich im optimalen Fall Lutein oder Lycopin im LDL anreichert. Bei

der Variante der carotinoidreichen LDL-Fractionen wurde einigen Ansätzen zusätzlich ein hydrophiles Antioxidans (Rutin) zugesetzt.

Lycopin und Lutein wurden zunächst dem Reaktionsgeschehen kurz vor Start der LDL-Oxidation zugegeben. Es konnte gezeigt werden, daß die Carotinoide, unabhängig von der gewählten Formulierung, die Oxidationsresistenz von LDL nicht oder nur geringfügig (Luteinsolubilisat) begünstigen. Fuhrman et al. (2000) haben für Lycopin (50 µM) selbst bei Verwendung von Tetrahydrofuran als Lösungsmittel ebenfalls nur eine moderate Hemmung der Lipidperoxidation, gemessen durch TBARS und Lipidperoxide, während der LDL-Oxidation ermittelt. Eine Zugabe der Carotinoide, d.h. keine Anreicherung im LDL-Partikel, scheint auch vom Gesichtspunkt der Übertragbarkeit der Ergebnisse von *in vitro* auf *in vivo* Bedingungen wenig sinnvoll. Carotinoide kommen nicht frei im Plasma vor, sondern werden von Lipoproteinen oder Chylomikronen transportiert (Löffler und Petrides, 2003, Parker, 1996, Watzl und Bub, 2001). Für diese Arbeit ist es demzufolge von Bedeutung, daß Carotinoide im LDL-Partikel gebunden vorliegen.

Weiterhin konnte sowohl Lycopin als auch Lutein effektiv in LDL angereichert werden. Hierzu wurde Plasma mit den entsprechenden Solubilisaten vor der LDL-Isolierung inkubiert. Eine erhöhte Oxidationsresistenz, gemessen am Lipid- und Proteinteil der carotinoidreichen LDL-Partikel, konnte allerdings nicht registriert werden. Hininger et al. (2001) konnten die Lycopin- und Luteinspiegel über eine entsprechend ausgewählte Diät in LDL erhöhen. Eine Veränderung des Oxidationsverhaltens während der kupferinduzierten LDL-Oxidation konnten sie aber ebenfalls nicht feststellen. Viele Arbeiten zu diesem Thema brechen an dieser Stelle ab und kommen zu dem Fazit, daß Carotinoide keinen Einfluß auf die Oxidierbarkeit von LDL haben. Ein möglicher Einfluß auf die Arterioskleroseprävention wird deshalb auf andere mögliche Mechanismen zurückgeführt (Hininger et al., 2001, Wright et al., 2002). Für Lycopin wurde z.B. gezeigt, daß es positiven Einfluß auf Hypercholesterolaemie durch Hemmung der HMG-CoA-Reduktase hat (Heber und Lu, 2002).

Im Rahmen dieser Arbeit wurde aber darüber hinausgehend untersucht, ob der Zusatz eines Flavonoids zur hydrophilen Phase des Reaktionsgemisches einen zusätzlichen antioxidativen Effekt auslöst. Tatsächlich führt die Kombination von Lycopin- oder Lutein-angereichertem LDL und Rutin zu einer synergistischen Verlängerung der Lag-Phase. Solch synergistische Effekte konnten bereits von

verschiedenen Arbeitsgruppen gemessen werden, wenn lipophile Antioxidantien im LDL angereichert und hydrophile dem Reaktionsansatz zugesetzt wurden (Hirano et al., 2001, Milde et al., 2004, Zhu et al., 2000). Teilweise wird der Synergismus durch verschiedene Wirkorte der Substanzen, bedingt durch unterschiedliche Lipophilie, erklärt (Fuhrman et al., 2000). Andere Arbeitsgruppen kommen zu dem Ergebnis, daß Flavonoide  $\alpha$ -Tocopherol, das sich in der LDL-Außenschicht befindet, vor Oxidation schützen oder regenerieren können. Eine Rückführung des  $\alpha$ -Tocopherol aus  $\alpha$ -Tocopherylradikalen wird in diesem Fall diskutiert (Hirano et al., 2001, Zhu et al., 2000). Der etwas deutlichere synergistische Effekt im Fall des Luteins, verglichen mit Lycopin, könnte mit der Lage im LDL-Partikel im Zusammenhang stehen. Lutein, ein Xanthophyll, wird sich in der LDL-Außenschicht parallel zu den Phospholipiden einlagern, d.h. eine „transmembrane Lage“ einnehmen (Havaux, 1998, Pauleikhoff et al., 2001). Das lipophilere Lycopin wird hingegen eher ins Innere wandern (Abbildung 63).

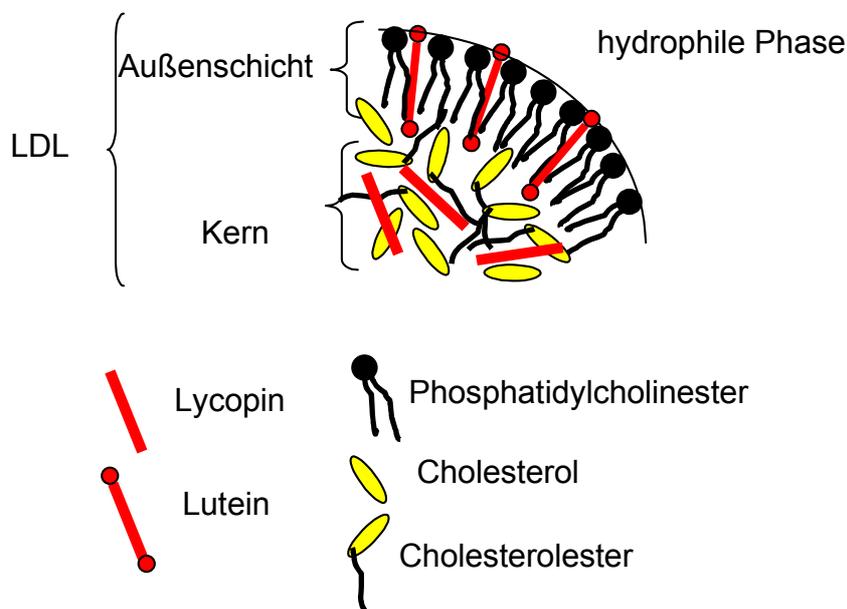


Abbildung 63 Lage und Orientierung von Lycopin und Lutein im LDL-Partikel

Lutein könnte, ebenso wie  $\alpha$ -Tocopherol, an dieser Grenzschicht mit Flavonoiden aus der hydrophilen Phase in Kontakt treten und regeneriert werden oder selbst Flavonoide regenerieren (Abbildung 64). Eine kooperative Wirkung von Lycopin oder Lutein mit anderen endogenen Antioxidantien aus LDL ist ebenfalls denkbar, wie dies für  $\alpha$ -Tocopherol und  $Q_{10}$  bekannt ist (Schneider und Elstner, 2000). Diese

Hypothese muß in weiteren Untersuchungen, z.B. durch eine Kinetik der entsprechenden Substanzen während der LDL-Oxidation, überprüft werden. Für LDL, das mit  $\gamma$ -Terpinen angereichert wurde, konnten Grassmann et al. (2001) zeigen, daß z.B. der Verbrauch von Lycopin während der Oxidation verlangsamt wird. Der ausgeprägtere Synergismus kann aber auch lediglich auf der höheren Beladung (2 bis 3 mal höher) von LDL mit Lutein im Vergleich zu Lycopin beruhen.

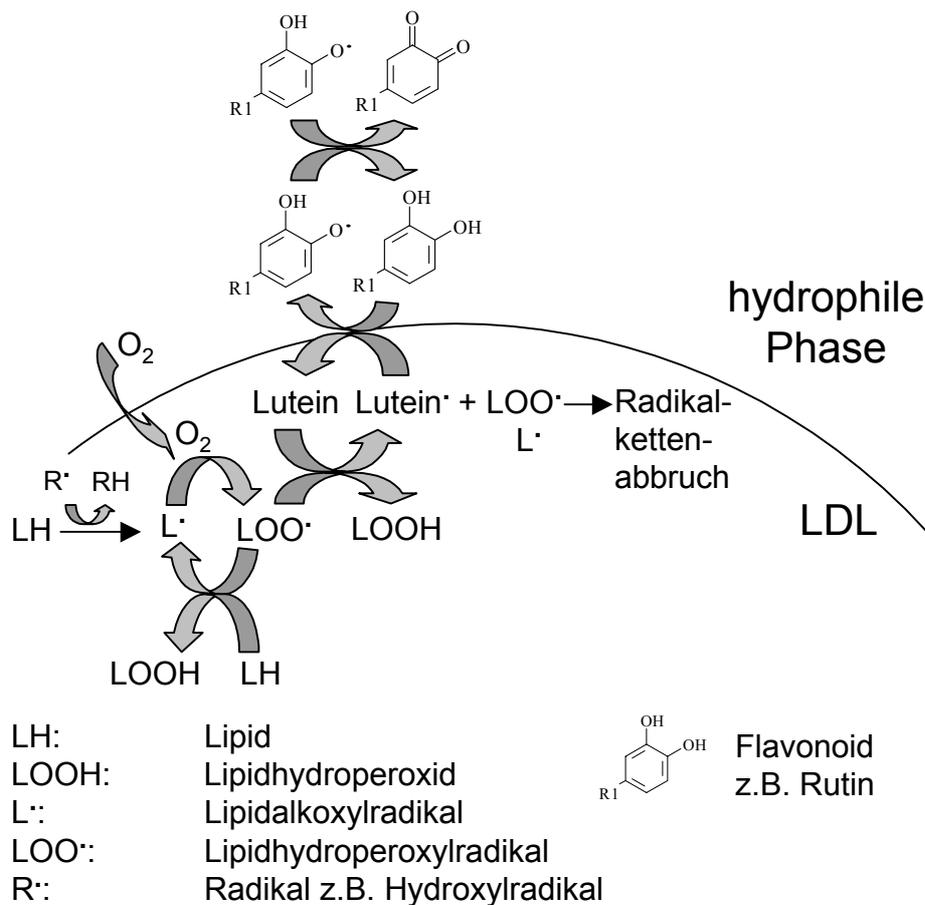


Abbildung 64 Vorgeschlagerener Mechanismus des synergistischen Effekts

Ein weiterer Grund für den gemessenen Synergismus können die unterschiedlichen antioxidativen Wirkmechanismen von Flavonoiden und Carotinoiden sein. Carotinoide sind bekannt für ihr hervorragendes Quenching von Singulett-Sauerstoff und das Abfangen von Peroxylradikalen (Stahl und Sies, 1996). Lycopin bzw. Lutein zeigen gegenüber ABTS-Radikalen einen TEAC-Wert (trolox equivalent antioxidant capacity) von 2,9 mM bzw. 1,5 mM (Miller et al., 1996). Flavonoide hingegen können einerseits Übergangsmetalle sehr gut komplexieren. Diese Fähigkeit ist gerade in

einem System, das mit Kupfer zur Initialisierung der Radikalkettenreaktion arbeitet, von enormer Bedeutung. Andererseits kommt es durch Oxidation der ortho-di-Hydroxygruppe am B-Ring der Flavonoide zunächst zur Bildung von Semichinonradikalen und letztlich stabilen Chinonen unter gleichzeitiger Reduktion von freien Radikalen. Der TEAC-Wert von Rutin liegt mit 2,4 mM zwischen dem von Lycopin und Lutein (Pietta, 2000). Die drei Substanzen zeigen also gegenüber ABTS-Radikalen eine unterschiedlich gute Wirkung. Dies kann in der unterschiedlichen Struktur und dadurch anderen Wirkmechanismen begründet sein.

Konkret wird die antioxidative Kapazität überdurchschnittlich gesteigert, weil die Vielfalt der Abwehr gegen ROS im Vergleich zu den Einzelsubstanzen erhöht wird.

## 6 Zusammenfassung

Die antioxidative Wirkung verschiedener *Salix*-Extrakte wurde im X/XOD-System durch KMB-Spaltung, Hydroxylaminoxidation und Hemmung der XOD-Aktivität gemessen. Es konnten deutliche Unterschiede zwischen verschiedenen Extrakten in ihrem antioxidativem Verhalten ermittelt werden. Salicylsäure und Brennesselextrakt zeigten keine Wirkung, ein Auszug aus Teufelskralle erwies sich als moderates Antioxidans.

Eine Hemmung der oxidativen Hyaluronsäuredepolymerisation war ebenfalls konzentrationsabhängig durch verschiedene *Salix*-Extrakte möglich. Der Teufelskrallenextrakt wirkte der Fragmentierung etwas effektiver entgegen als Salicylsäure. Im Zuge dieser Arbeit konnten neue mögliche Wirkmechanismen in Bezug auf die analgetische und antiinflammatorische Wirkung von *Salix*-Extrakten aufgezeigt werden.

Ein Zusammenhang zwischen dem Gesamtsalicingehalten und der Wirkung kann so gut wie ausgeschlossen werden. Es kommen andere hydrophilere oder lipophilere Substanzen, wie z.B Flavonoide, in Frage. Aus diesem Grund erscheint eine Standardisierung der Extrakte weiterhin nur auf Salicingehalte nicht sinnvoll.

Das Verhalten von Lycopin und Lutein wurde während der LDL-Oxidation anhand der Bildung konjugierter Diene (Lipidperoxidation) und der Abnahme der Tryptophanfluoreszenzintensität (Proteinoxidation) untersucht. Die beiden Carotinoide lagen in zwei verschiedenen Formulierungen vor, zum einen kristallin (i.A. als PBS-Suspension), zum anderen als Solubilisat. Die Zugabe der verschiedenen Formulierungen kurz vor Reaktionsstart zum Ansatz zeigte nur im Fall des Luteins eine geringe antioxidative Wirkung.

Nach Vorinkubation des Plasmas mit den Solubilisaten, konnten sowohl Lycopin als auch Lutein im LDL angereichert werden. Die Verwendung der jeweiligen Suspension führte hingegen zu keinem Erfolg. Ein deutlicher antioxidativer Effekt war selbst bei hoher Anreicherung nicht zu erkennen. Der Zusatz eines hydrophilen Antioxidans (Rutin) führte zu einem ausgeprägten Synergismus im Fall der Lipidperoxidation. Die Proteinoxidation konnte nur additiv beeinflusst werden.

## 7 Literatur

- Al-Awwadi N., et al.: Antidiabetic activity of red wine polyphenolic extract, ethanol, or both in streptozotocin-treated rats. *J Agric Chem* 52(4) S. 1008-1016, 2004
- Allen R.E., et al.: Xanthine oxidoreductase is present in human synovium. *Ann. Rheum. Dis.* 46 S. 834-845, 1987
- Alves-Rodrigues A.: Lutein: an update of its benefits in ocular health. *Free Rad. Res.* 36(S) S. 53, 2002
- Balazs E.A., et al.: Hyaluronic acid in synovial fluid. I. Molecular parameters of hyaluronic acid in normal and arthritic human fluids. *Arthritis Rheum.* 10 S. 357-376, 1967
- Balazs E.A., et al.: Nomenclature of hyaluronic acid. *Biochem. J.* 235 S. 903, 1986
- Balogh G.T., et al.: Effect of different metal ions on the oxidative damage and antioxidant capacity of hyaluronic acid. *Archive of Biochemistry and Biophysics* 410 S. 76-82, 2003
- Beauchamp C., Fridovich I.: A mechanism for the production of ethylene from methional. The generation of the hydroxyl radical by xanthine oxidase. *J. Biol. Chem.* 245(18) S. 4641-4646, 1970
- Benzie I.F.F.: Lipidperoxidation: a review of causes, consequences, measurement and dietary influences. *International Journal of Food Sciences and Nutrition* 47 S. 233-261, 1996
- Berliner J.A., Heinecke J.W.: The Role of Oxidized Lipoproteins in Atherogenesis. *Free Radical Biology & Medicine* 20(5) S. 707-727, 1996

- Bhavani K.N., Kamini D.: Development and acceptability of a ready-to-eat beta-carotenen rich, maize based supplementary product. *Plant Foods Hum Nutr* 52(3) S. 271-278, 1998
- Blake D.R., et al.: Xanthine oxidase: four roles for the enzyme in rheumatoid pathology. *Biochemical Society Transactions* 25 S. 812-816, 1997
- Blaurock B., Hippeli S., Metz N.: Oxidative destruction of biomolecules by gasoline engine exhaust products and detoxifying effects of the three-way catalytic converter. *Archives of Toxicolgy* 66, S. 141-146, 1992
- Bradford M.M.: A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-due binding. *Anal. Biochem.* 72 S. 248, 1976
- Calixto J.B., et al.: Naturally occurring antinociceptive substances from plants. *Phytother. Res.* 14 S. 401-418, 2000
- Campanella L., Bonanni A., Finotti E., Tomasetti M.: Biosensors for determination of total and natural antioxidant capacity of red and white wines: comparison with other spectrophotometric and fluorimetric methods. *Biosens Bioelectron* 19(7) S. 641-651, 2004
- Chisolm G.M., Steinberg D.: The Oxidative Modification Hypothesis of Atherogenesis: An Overview. *Free Radical Biology & Medicine* 28(12) S. 1815-1826, 2000
- Cos P., et al.: Structure-Activity Relationship and Classification of Flavonoids as Inhibitors of Xantine Oxidase and Superoxide Scavengers. *J. Nat. Prod.* 61, S. 71-76, 1998
- Coughlan M.P., Rajagopalan K.V., Handler P.: The role of molybdenum in xanthine oxidase and related enzymes. Reactivity with cyanide, arsenite, and methanol. *J. Biol. Chem.* 244(10) S. 2658-2663, 1969

- Daga M.K., Madhuchhanda, Mishra T.K., Mohan A.: Lipid peroxide, beta-carotene and alpha-tocopherol in ischaemic stroke and effect of exogenous vitamin E supplementation on outcome. *J Assoc Physicians India* 45(11) S. 843-846, 1997
- Dagenais G.R., Marchioli R., Yusuf S., Tognoni G.: Beta-carotene, vitamin C, and vitamin E and cardiovascular diseases. *Curr Cardiol Rep* 2(4) S. 293-299, 2000
- de la Taille A., et al.: Cancer of the prostate: influence of nutritional factors. Vitamins, antioxidants and trace elements. *Presse Med.* 30(11) S. 557-560, 2001
- D'Odoricio A., et al.: High plasma levels of alpha- and beta-carotene are associated with a lower risk of atherosclerosis: results from the Bruneck study. *Atherosclerosis.* 153(1) S. 231-239, 2000
- Duthie G., Crozier A.: Plant-derived phenolic antioxidants. *Curr Opin Clin Nutr Metab* 3(6) S. 447-51, 2000
- Dwyer J.H., et al.: Oxygenated carotenoid lutein and progression of early atherosclerosis: the Los Angeles atherosclerosis study. *Circulation.* 103(24) S. 2922-2927, 2001
- Elstner E.F.: *Der Sauerstoff: Biochemie, Biologie, Medizin.* B I-Wissenschaftsverlag; Mannheim, Wien, Zürich 1990
- Elstner E.F.: *Sauerstoffabhängige Erkrankungen und Therapien.* B I-Wissenschaftsverlag; Mannheim, Leipzig, Wien, Zürich 1993
- Elstner E.F., Heupel A.: Inhibition of nitrite formation from hydroxylammonium chloride: a simple assay for superoxide dismutase. *Anal. Biochem.* 70 S. 616-620, 1976
- Engstrom-Laurent A.: Hyaluronan in joint disease. *J. Intern. Med.* 243(1) S. 57-60, 1997

- Esterbauer H., et al.: Continous Monitoring of *in vitro* Oxidation of Low Density Lipoprotein. Free Rad. Res. Comms. 6(1) S. 67-75, 1989
- Europäisches Arzneibuch (Pharm. Eur.) Ausgabe 4.07, Deutscher Apotheker Verlag 2002
- Fiebich B., Chrubasik S.: Effects of an ethanolic Salix extract on the release of selected inflammatory mediators in vitro. Phytomedicine (11) 2-3 S. 135-139, 2004
- Fukumoto L.R., Mazza G.: Assessing antioxidant and prooxidant activities of phenolic compounds. J Agric Food Chem 48 S. 3597-3604, 2000
- Fuhrman B., et al.: Lycopene Synergistically Inhibits LDL Oxidation in Combination with Vitamin E, Glabridin, Rosmarinic Acid, Carnosic Acid, or Garlic. Antioxidants & Redox Signaling 2(3) S. 491-506, 2000
- Gahler S., Otto K., Bohm V.: Alterations of vitamin C, total phenolics, and antioxidant capacity as affected by processing tomatoes to different products. J Agric Food Chem 51(27) S. 7962-7968, 2003
- Gießauf A., Steiner E., Esterbauer H.: Early destruction of tryptophan residues of apolipoprotein B is a vitamin E independent process during copper-mediated oxidation of LDL. Biochim. Biophys. Acta 1256, S. 221-232, 1995
- Grassmann J., Schneider D., Weiser D., Elstner E.F.: Antioxidative effects of lemon oil and its components on copper induced oxidation of low density lipoprotein. Drug. Res. 51(II) S. 799-805, 2001
- Havaux M.: Carotenoids as membrane stabilizers in chloroplasts. Trends Plant Sci. 3 S. 147-151, 1998
- Halliwell B., Gutteridge M.: Free radicals in biology and medicine. Oxford University Press, Oxford, New York 1999

- Heinecke J.W.: Oxidants and antioxidants in the pathogenesis of atherosclerosis: implications for oxidized low density lipoprotein hypothesis. *Atherosclerosis* 141 S. 1-15, 1998
- Heijnen C.G.M., et al.: Protection of flavonoids against lipid peroxidation: The structure activity relationship revisited. *Free Rad Res* 36(5) S. 575-581, 2002
- Heber D., Lu Q.-Y.: Overview of mechanisms of action of lycopene. *Exp. Biol. Med.* 227 S. 920-923, 2002
- Hiller K., Melzig M.F.: *Lexikon der Arzneipflanzen und Drogen Heidelberg Spektrum Akad. Verl.* 2000
- Hininger I.A., et al.: No significant effects of lutein, lycopene or beta-carotene supplementation on biological markers of oxidative stress and LDL oxidizability in healthy adult subjects. *J. Am. Coll. Nutr.* 20(3) S. 232-238, 2001
- Hirano R., et al.: Antioxidant ability of various flavonoids against DPPH radicals and LDL oxidation. *J. Nutr. Sci. Vitamol (Tokyo)* 47 S. 357-362, 2001
- Jahn M., et al.: The reaction of hyaluronic acid and its monomers, glucuronic acid and *N*-acetylglucosamine, with reactive oxygen species. *Carbohydr. Res.* 321 S. 228-234, 1999
- Johnson E.J.: The Role of Carotenoids in Human Health. *Nutr Clin Care* 5(2) S. 56-65, 2002
- Kaplan L.A., Lau J.M., Stein E.A.: Carotenoid composition, concentration, and relationships in various human organs. *Clin Physiol Biochem* 8(1) S. 1-10, 1990
- Karlson P., Doenecke D., Koolman J.: *Kurzes Lehrbuch der Biochemie für Mediziner und Naturwissenschaftler.* Georg Thieme Verlag 14. Auflage, Stuttgart, New York 1994

- Klipstein-Grobusch K., et al.: Serum carotenoids and atherosclerosis. The Rotterdam Study. *Atherosclerosis*. 148(1) S. 49-56, 2000
- Krinsky N.I.: Possible Biologic Mechanisms for a Protective Role of Xanthophylls. *J. Nutr.* 132 S. 540S-542S, 2002
- Krüger A.: Weidenrinde oder Aspirin? *Heilpraktiker & Volkshelkunde* 1, 2000
- Kudlova E.: Beta carotene in prevention of civilization-related diseases. *Cas Lek Cesk* 139(3) S. 86-87, 2000
- Kuiper-Gertsma D.A., Bijlsma J.W.: Intra-articular injection of hyaluronic acid as an alternative option to corticosteroid injections for arthrosis. *Ned. Tijdschr. Geneesk.* 11, 144(46) S. 2188-2192, 2000
- Landrum J.T., Bone R.A.: Lutein, Zeaxanthin, and the Macular Pigment. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 385(1) S. 28-40, 2001
- Leblan D., Chantre P., Fournie B.: *Harpagophytum procumbens* in treatment of knee and hip osteoarthritis. Four-month results of a prospective, multicenter, double-blind trial versus diacerhein. *Joint Bone Spine*. 67(5), S. 462-467, 2000
- Lengfelder E., Fink R.: Der oxidative Hyaluronsäureabbau – Mechanismus und Konsequenzen. in: *Reaktive Sauerstoffspezies in der Medizin – Grundlagen und Klinik*. Hsg.: Elstner E.F., Bors W., Wilmanns W.; Springer Verlag Berlin, Heidelberg 1987
- Li M., et al.: Degradation of Hyaluronan by Peroxynitrite. *Arch. Biochem. Biophys.* 341 S. 245-250, 1997
- Löffler G., Petrides P.: *Biochemie & Pathobiochemie*. Springer-Verlag; Berlin, Heidelberg, New York, Hong Kong, London, Mailand, Paris, Tokio 2003

- Marshall K.W.: Intra-articular hyaluronan therapy. *Foot Ankle Clin.* 8(2) S. 221-232, 2003
- McCord J.M.: Oxygen-derived free radicals in postischemic tissue injury. *N. Engl. J. Med.* 312 S. 545-547, 1985
- Milde J., Elstner E.F., Graßmann J.: Synergistic inhibition of low density lipoprotein oxidation by rutin,  $\gamma$ -terpinene, and ascorbic acid. *Phytomedicine* 11(2-3) S. 105-113, 2004
- Miller R.A., Britigan J.: The formation and biologic significance of phagocyte-derived oxidants. *J. Invest. Med.* 43 S. 39-49, 1995
- Miller N.J., Sampson J., Candeias L.P., Bramley P.M., Rice-Evans C.A.: Antioxidant activities of carotenes and xanthophylls. *FEBS Letters* 384 S. 240-242, 1996
- Monographie der Kommission E, B Anz Nr. 228 vom 05.12.1984
- Monographie der Kommission E, B Anz Nr. 76 vom 29.04.1987
- Monographie der Kommission E, B Anz Nr. 43 vom 29.04.1989
- Monographie der Kommission E, B Anz Nr. Nr. 164 vom 01.09.1990
- Nakatani N.: Phenolic antioxidants from herbs and spices. *Biofactors* 13(1-4) S. 141-146, 2000
- Nijveldt R.J., et al.: Flavonoids: A review of probable mechanisms of action and potential applications. *Am J Clin Nutr* 74 S. 418-425, 2001
- Olson J.A.: Carotenoids and human health. *Arch Latinoam Nutr* 49(3 Suppl 1) S. 7S-11S, 1999

- Parathasarathy S., et al.: Implications of Lag Time Concept in the Oxidation of LDL; Free Rad. Res. 28 S. 583-591, 1998
- Parker R.S.: Absorption, metabolism, and transport of carotenoids. The FASEB Journal 10 S. 542-551, 1996
- Patrick L.: Beta-carotene: the controvesity continues. Altern Med Rev 5(6) S. 530-545, 2000
- Pauleikhoff D., van Kuijk F.J.G.M., Bird A.C.: Makuläres Pigment und altersabhängige Makuladegeneration. Ophthalmologe 98 S. 511-519, 2001
- Pschyrembel W. (Hrsg.): Klinisches Wörterbuch. Walter de Gruyter Verlag; Berlin, New York 1998
- Rao A.V.: Lycopene, tomatoes, and the prevention of coronary heart disease. Exp. Biol. Med. 227 S. 908-913, 2002
- Reyftmann J.P., et al.: Sensitivity of tryptophane and related compounds to oxidation induced by lipid autoperoxidation. Application to human low and high-density lipoproteins. Biochim Biophys Acta 1042 S. 159-167, 1990
- Rice-Evans C.A., Miller N.J., Paganina G.: Structure-antioxidant activity relationships of flavonoids and phenolic acids. Free Rad Biol Med 20(7) S. 933-956, 1996
- Richter S.P., et al.: The Lutein Antioxidant Supplementation Trial. ARVO Abstract B539, 2002
- Pietta P.G.: Flavonoids as antioxidants. J Nat Prod 63 S. 1035-1042, 2000
- Rissanen T.H., et al.: Serum lycopene concentrations and carotid atherosclerosis: the Kuopio Ischaemic Heart Disease Factor Study. Am. J. Clin. Nutr. 77(1) S. 133-138, 2003

- Rohnert U., Schneider W., Elstner E.F.: Superoxide-Dependent and –Independent Nitrite Formation from Hydroxylamine: Inhibition by Plant Extracts. *Z. Naturforsch.* 53c S. 241-249, 1998
- Rohnert U., et al.: Inhibition by Salix-Extracts and Phytodolor of Copper-Catalyzed Oxidative Destructions. *Z. Naturforsch.* 53c S. 233-240, 1998
- Ross R.: Atherosclerosis – An Inflammatory Disease. *The Newm England Journal of Medicine* 340(2) S.115-126, 1999
- Schempp H.: Antioxidative Eigenschaften der Thioctsäure. Dissertation an der TU München, 1993
- Schmid B., Kötter I., Heide L.: Pharmacokinetics of salicin after oral administration of a standardised willow bark extract. *Eur. J. Clin. Pharmacol.* 57 S. 387-391, 2001
- Schneider D., Elstner E.F.: Coenzym Q10, Vitamin E, and Dihydrothioctic Acid Cooperatively Prevent Diene Conjugation in Isolated Low-Density Lipoprotein. *Antioxidants and Redox Signaling* 2(2) S. 327-333, 2000
- Shao Y.: Phytochemischer Atlas der Schweizer Weiden. Dissertationschrift, ADAG Administration & Druck AG, Zürich 1991
- Sies H.(Hsg.): *Oxidative Stress: Oxidants and Antioxidants*. Academic Press Limited; London, San Diego, New York, Sydney, Tokyo, Toronto 1991
- Singleton V.L., Orthofer R., Lamuela-Raventós R.M.: Analysis of Total Phenols and Other Oxidation Substrates and Antioxidants by Means of Folin-Ciocalteu Reagent. *Methods in Enzymology* 299 (Editor L. Packer) S. 152-179, 1998
- Soufi M. , Sattler A.M., Maisch B., Schaefer J.R.: Molecular Mechanisms Involved in Atherosclerosis. *Herz* 27(7) S. 637-648, 2002

- Stahl W., Schwarz W., Sundquist A.R., Sies H.: Cis-trans isomers of lycopene and beta-carotene in human serum and tissues. Arch Biochem Biophys. 294(1) S. 173-177, 1992
- Stahl W., Sies H.: Lycopene: A Biologically Important Carotenoid for Humans? Archives of Biochemistry and Biophysics 336(1) S. 1-9, 1996
- Steinberg D.: Low Density Lipoprotein Oxidation and Its Pathobiological Significance. The Journal of Biological Chemistry 272(34) S. 20963-20966, 1997
- Steinegger E., Hövel H.: Analytic and biologic studies on Salicaceae substances, especially on salicin. II. Biological study. Pharm. Acta Helv. 47, 222-234, 1972
- Stevens C.R., et al.: Localisation of xanthine oxidase to synovial endothelium. Ann. Rheum. Dis. 50, S. 760-762, 1992
- Totter J.R.: beta-Carotenen and the prevention of cancer. Science 266(5182) S. 16-16, 1994
- Trommer H., Kühn A.V., Mrestani Y., Neubert R.H.H.: Hyaluronsäure – viel mehr als Gelenkschmiere. Pharm. Ztg. 148 4. September S. 16-25, 2003
- Voet D., Voet J.G., Pratt C.W.: Lehrbuch der Biochemie WILEY-VCH Verlag, Weinheim 2002
- Wagner I., et al.: Phytoanalgetika – Aktuelle Forschungsergebnisse zur Weidenrinde. Pharm. Ztg. 148. S. 21-32, 2003
- Watzl B., Bub A.: Carotinoide. Ernährungs-Umschau 48(2) S. 71-74, 2001
- Wegener T.: Therapy of degenerative diseases of musculoskeletal system with South African devil's claw (Harpagophytum procumbens DC). Wien Med. Wochenschr. 149(8-10), S.254-257, 1999

- Wegener T., Lupke N.P.: Treatment of patients with arthrosis of hip or knee with an aqueous extract of devil's claw (*Harpagophytum procumbens* DC.). *Phytother. Res.* 17(10), S. 1165-1172, 2003
- Wichtel M.: Teedrogen und Phytopharmaka: ein Handbuch für die Praxis auf wissenschaftlicher Grundlage. Wiss. Verl.-Ges., Stuttgart 1997
- Witztum J.L., Steinberg D.: The Oxidative Modification Hypothesis of Atherosclerosis: Does It Hold for Humans? *TCM* 11(3/4) S. 93-102, 2001
- Wong S.F., et al.: The role of superoxide and hydroxyl radicals in the degradation of hyaluronic acid induced by metal ions and by ascorbic acid. *J. Inorg. Biochem.* 14(2) S. 127-134, 1981
- Wright A.J., et al.: Comparison of LDL fatty acid and carotenoid concentrations and oxidative resistance of LDL in volunteers from countries with different rates of cardiovascular disease. *Br. J. Nutr.* 87(1) S. 21-29, 2002
- Zhu Q.Y., Huang Y., Chen Z.-Y.: Interaction between flavonoids and  $\alpha$ -tocopherol in human low density lipoprotein. *J. Nutr. Biochem.* 11 S. 14-21, 2000

## 8 Lebenslauf

---

### Zur Person

---

Name	Jens Oliver Milde
Geburtstag	22.12.1975
Geburtsort	Neumarkt i.d. Opf.
Staatsangehörigkeit	deutsch
Familienstand	ledig

---

### Werdegang

---

Schulbildung	1986 Willibald Gluck-Gymnasium in Neumarkt 1995 Allg. Hochschulreife
Wehrdienst	Juli 1995 bis April 1996 Gebirgsjägerbrigade 23 in Bad Reichenhall
akad. Werdegang	WS 1996/97 bis WS 2001/02 Studium der Gartenbauwissenschaften an der TUM-Weihenstephan inklusive Praktika Mai 1996 bis Oktober 1996 Zierpflanzengärtnerei Dezember 1999 bis Februar 2000 National Botanical Garden Kirstenbosch, Südafrika Abschluß: Diplom-Agraringenieur  Januar 2002 bis Mai 2004 Promotion am Lehrstuhl für Phytopathologie Labor für angewandte Biochemie TUM-Weihenstephan

## 9 Danksagung

Mein Dank gilt Herrn Prof. E.F. Elstner für die Überlassung des Themas und für die Möglichkeit an seinem Lehrstuhl und in seiner Arbeitsgruppe wirken zu dürfen.

Der Firma Steigerwald Arzneimittelwerk GmbH, Darmstadt und insbesondere Herrn Dr. D. Weiser und Herrn Dr. O. Kelber möchte ich für die hervorragende Zusammenarbeit danken. Die finanzielle Unterstützung soll an dieser Stelle natürlich auch gewürdigt werden.

Außerdem bedanke ich mich recht herzlich bei Frau Dr. J. Graßmann und Herrn Dr. H. Schempp für die Betreuung, Hilfestellung und fachlich stets anregenden Diskussionen. Sie haben viele Stunden zum Gelingen dieser Arbeit investiert.

Selbstverständlich hat auch das sehr angenehme und kollegiale Arbeitsklima am Lehrstuhl für Phytopathologie für eine andauernde Motivation gesorgt. Vielen Dank liebe „Phytos“!

Bei Herrn Prof. G. Rechkemmer bedanke ich mich sehr dafür, daß er als Zweitprüfer bei meiner Promotion zur Verfügung steht.

Schließlich darf ich an dieser Stelle meine Freundin Stephanie Heine nicht vergessen, die sowohl meine gedrückte Stimmung nach gescheiterten Versuchen als auch meine Überstunden, besonders gegen Ende der Dissertation, ertragen mußte. Vielen Dank für Deine Geduld.

Ferner gilt besonderer Dank meinen Eltern, Anne und Peter Milde, die mir das Studium erst ermöglichten und mich bei meiner Entscheidung zu promovieren stets unterstützten.