

**Aus der Universitäts-Hautklinik
der Albert-Ludwigs-Universität Freiburg im Breisgau**



**Wirkung ausgewählter Pflanzenextrakte auf die UV-B
induzierte COX-2-Expression und Prostaglandinsynthese in
Keratinocyten**

INAUGURAL-DISSERTATION

zur

Erlangung des Medizinischen Doktorgrades

der Medizinischen Fakultät

der Albert-Ludwigs-Universität

Freiburg im Breisgau

Vorgelegt im Jahre 2007

von Ute Hanne Schmidt

geboren in Karlsruhe

Dekan:	Professor Dr. C. Peters
Erster Gutachter:	Prof. Dr. C. Schempp
Zweiter Gutachter:	PD Dr. S. Ehl
Jahr der Promotion:	2007

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung	1
1.1. Hintergrund	1
1.2. Phytotherapie in der Dermatologie.....	2
1.3. Entzündungsursachen und -vorgänge der Haut.....	3
1.4. UV-B-Modell.....	5
1.5. Saugblasen-Modell	6
1.6. Untersuchte Pflanzenextrakte und ihre Portraits.....	8
1.6.1. <i>Potentilla anserina</i> L.	8
1.6.2. <i>Rosmarinus officinalis</i> L.	10
1.6.3. <i>Salvia officinalis</i> L.	13
1.6.4. <i>Usnea barbata</i> L.	16
1.6.5. <i>Potentilla tormentilla/erecta</i> (L.) Raeuschel.....	17
1.7. Zielsetzung.....	20
2. Material & Methoden	21
2.1. HaCaT-Zelllinie	21
2.2. Zellkulturarbeit	21
2.3. Cyclooxygenaseaktivität im zellfreien COX-Inhibitor-Screening-Assay.....	25
2.4. UV-B-Modell.....	25
2.5. Versuchsaufbau und Kontrollen	26
2.6. Probengewinnung zur PGE ₂ -Bestimmung	27
2.7. Stammlösungen der verwendeten Pflanzenextrakte.....	28
2.8. Toxizitätsprüfung.....	31
2.8.1. Mikroskopische Begutachtung	31
2.8.2. Laktatdehydrogenase (LDH)-Messung	31
2.9. PGE ₂ -ELISA.....	32
2.10. Bestimmung der COX-2 mittels <i>Western Blot</i> -Technik	32
2.10.1. Probengewinnung zur COX-2-Detektion.....	32
2.10.2. Proteinquantifizierung mittels <i>Bicin choninic acid</i> -Test (BCA-Test).....	33
2.10.3. SDS-Gelelektrophorese und <i>Immunoblot (Western Blot)</i>	33
2.11. Saugblasen-Modell	36
2.11.1. Durchführungsintention.....	36
2.11.2. Ethikkommission und Probandenanforderung	36
2.11.3. Ablauf des Saugblasen-Experimentes	36

3. Ergebnisse	39
3.1. Zellfreie Assays.....	39
3.1.1. Anserina im COX-Inhibitor-Screening-Assay.....	39
3.1.2. Rosmarin im COX-Inhibitor-Screening-Assay.....	40
3.1.3. Salbei im COX-Inhibitor-Screening-Assay.....	41
3.1.4. Usnea im COX-Inhibitor-Screening-Assay.....	42
3.1.5. Tormentilla im COX-Inhibitor-Screening-Assay.....	42
3.2. Vorversuche: Bestrahlungsintensitäten und Abnahmezeitpunkte.....	43
3.2.1. Bestimmung der Bestrahlungsintensität.....	44
3.2.2. Bestimmung der Inkubationsdauer (Zeitkinetik).....	46
3.3. Zellbasierte Versuche mit Pflanzenextrakten.....	48
3.3.1. Anserina.....	49
3.3.1.1. Anserina: Toxizitätsprüfung.....	49
3.3.1.2. Anserina: PGE ₂ -Bestimmung.....	50
3.3.2. Rosmarin.....	50
3.3.2.1. Rosmarin: Toxizitätsprüfung.....	51
3.3.2.2. Rosmarin: PGE ₂ -Bestimmung.....	51
3.3.3. Salbei.....	52
3.3.3.1. Salbei: Toxizitätsprüfung.....	52
3.3.3.2. Salbei: PGE ₂ -Bestimmung.....	53
3.3.3.3. Salbei: COX-2- <i>Western Blot</i>	54
3.3.4. Usnea.....	55
3.3.4.1. Usnea: Toxizitätsprüfung.....	55
3.3.4.2. Usnea: PGE ₂ -Bestimmung.....	56
3.3.4.3. Usnea: COX-2- <i>Western Blot</i>	57
3.3.5. Tormentilla-Gesamtextrakt.....	58
3.3.5.1. Tormentilla-Gesamtextrakt: Toxizitätsprüfung.....	58
3.3.5.2. Tormentilla-Gesamtextrakt: PGE ₂ -Bestimmung.....	59
3.3.5.3. Tormentilla-Gesamtextrakt: COX-2- <i>Western Blot</i>	60
3.3.6. Tormentilla Fraktionen 1-4.....	61
3.3.6.1. Fraktion 1: LDH-Bestimmung.....	62
3.3.6.2. Fraktion 1: PGE ₂ -Bestimmung.....	62
3.3.6.3. Fraktion 2: LDH-Bestimmung.....	63
3.3.6.4. Fraktion 2: PGE ₂ -Bestimmung.....	64

3.3.6.5.	Fraktion 3: LDH-Bestimmung	65
3.3.6.6.	Fraktion 3: PGE ₂ -Bestimmung	66
3.3.6.7.	Fraktion 4: LDH-Bestimmung	67
3.3.6.8.	Fraktion 4: PGE ₂ -Bestimmung	68
3.3.7.	Tormentilla Unterfraktionen der Fraktion 4.....	69
3.3.7.1.	Unterfraktion 4-1: PGE ₂ -Bestimmung	69
3.3.7.2.	Unterfraktion 4-2: PGE ₂ -Bestimmung	71
3.3.7.3.	Unterfraktion 4-3: PGE ₂ -Bestimmung	72
3.3.7.4.	Unterfraktion 4-4: PGE ₂ -Bestimmung	73
3.4.	Saugblasen-Experiment.....	74
4.	Diskussion	76
4.1.	UV-B-Modell.....	76
4.2.	Vorversuche des UV-B-Modells mit HaCaT-Zellen	77
4.3.	Zytotoxizität der Pflanzenextrakte	78
4.4.	Antiinflammatorische Wirksamkeitstestung der fünf Pflanzenextrakte	79
4.4.1.	<i>Potentilla anserina</i> L.	80
4.4.2.	<i>Rosmarinus officinalis</i> L.	81
4.4.3.	<i>Salvia officinalis</i> L.	83
4.4.4.	<i>Usnea barbata</i> L.	85
4.4.5.	<i>Potentilla tormentilla</i> (L.) Raeuschel-Gesamtextrakt	87
4.4.6.	Fraktionen 1, 2, 3, 4 des Tormentilla-Gesamtextraktes	89
4.4.7.	Unterfraktionen 4-1, 4-2, 4-3, 4-4 der Fraktion 4.....	89
4.4.8.	Zusammenfassende Diskussion der Tormentilla-Extrakte	90
4.5.	Saugblasen-Experiment.....	92
4.6.	Ausblick.....	94
5.	Zusammenfassung	96
6.	Literaturverzeichnis	97
7.	Anhang	107
7.1.	Abkürzungsverzeichnis	107
7.2.	Verwendete Materialien und Geräte	108
7.3.	Curriculum vitae	115
8.	Danksagung	116

1. Einleitung

1.1. Hintergrund

Historisch gesehen stellen Medikamente pflanzlichen Ursprungs den Anfang der Arzneimittelherstellung des Menschen dar (Schulz, 2004 [a]). Sie wurden zur Heilung von Krankheiten, Verringerung von Schmerzzuständen sowie zur Prophylaxe gegen Beschwerden jeglicher Art verwendet (Frohne, 2002 [a]). Durch die Entwicklung von chemisch hergestellten Medikamenten im 19. Jahrhundert wurden sie in den letzten Jahrzehnten teilweise verdrängt oder gerieten in Vergessenheit (Frohne, 2002 [a]). Die Nachfrage nach pflanzlichen Alternativen ist gerade in letzter Zeit gestiegen (Augustin, 2004 [a]). Eine Behandlung von Krankheiten und Befindlichkeitsstörungen mit pflanzlichen Arzneimitteln im Sinne einer naturwissenschaftlich orientierten Medizin stellt die so genannte Phytotherapie (Phyton, gr. = Pflanze) dar (Kraft, 2000 [a]). Nach dem Arzneimittelgesetz stellt ein Phytopharmakon ein Arzneimittel dar, das ausschließlich pflanzliche Inhaltsstoffe beinhaltet. Als Besonderheit dieser Medikamente gilt ihre komplexe Zusammensetzung. Jeder Arzt muss aufgrund der Berufsordnung der Ärzte Kenntnisse im Bereich der Phytotherapie nachweisen (Kraft, 2000 [a]).

Es wurden verschiedene Institutionen ins Leben gerufen, wie zum Beispiel in den neunziger Jahren des 20. Jahrhunderts die Kommission E, die bereits vorhandene wie auch neu entwickelte Arzneimittel pflanzlichen Ursprungs bewertete und versuchte experimentelle und klinische Untersuchungen, sofern vorhanden, zusammenzuführen. Unter anderem wurden auch überlieferte Angaben der Volksmedizin mit den Erkenntnissen der modernen Medizin verglichen (Frohne, 2002 [a]). Die Kommission erarbeitete bis 1994 als erste Institution verschiedene Pflanzenmonographien, die bis heute ihre Gültigkeit besitzen, wobei diese nur bis 1994 überarbeitet wurden und dadurch zum Teil nicht mehr den Stand der Wissenschaft widerspiegeln (Wichtl, 2002).

Vorteile der Phytotherapie finden sich in einer geringeren Interaktion mit chemischen Arzneimitteln, sowie einer meist großen therapeutischen Breite. Aufgrund zumeist nur geringer Nebenwirkungen stellen sie eine hohe Therapiesicherheit dar. Zudem werden sie von Patienten oft besser akzeptiert als „chemische“ Pharmaka (Augustin 2004 [a]).

Zur Kenntnis genommen werden muss, dass sie meist bei schwerwiegenden Krankheitsbildern nicht ausreichend wirksam sind oder dass es zu einer

Verschleierung der Symptome durch Selbstmedikation kommen kann. Vor allem bei längerfristigem Gebrauch muss beachtet werden, dass auch Phytopharmaka nicht nebenwirkungsfrei sind.

Nicht zuletzt aus diesem Grund ist es wichtig, die Wirksamkeit oder Unwirksamkeit von Medikamenten pflanzlichen Ursprungs wissenschaftlich zu untersuchen und zu belegen.

1.2. Phytotherapie in der Dermatologie

Gerade bei Dermatosen haben pflanzliche Mittel eine lange Tradition, wobei bis jetzt nur für einzelne pflanzliche Substanzen Wirksamkeitsstudien existieren. Für die meisten Phytopharmaka stehen diese noch aus, so dass sie den Kriterien der Evidenz basierten Medizin nicht entsprechen (Augustin, 2004 [a]).

Bei akuten und chronischen Hauterkrankungen spielt die topische Anwendung von Externa eine wichtige Rolle, wobei unter anderem eine Minderung des Juckreizes, der Trockenheit und der Entzündungsreaktion bewirkt werden soll.

In der Dermatologie werden unter anderem verschiedene Phytopharmaka sowohl zur Behandlung von Milchschorf, Windeldermatitis des Säuglings, Atopischer Dermatitis und Akne, als auch zur Therapie von bakteriellen Erkrankungen, Hyperhidrosis, Psoriasis und Ekzemen eingesetzt (Kraft, 2000 [a]).

Auf dem Gebiet der Entzündungshemmung besteht in der Dermatologie ein hoher Bedarf an Alternativen zu Standardtherapeutika. Gerade bei chronisch entzündlichen Hauterkrankungen wie beispielsweise der Atopischen Dermatitis oder der Akne vulgaris sind Medikamente nötig, die Linderung bewirken, bei längerem Gebrauch jedoch die Haut möglichst nicht dauerhaft schädigen und nebenwirkungsarm sind. Exemplarisch ist die oft langwierige Anwendung von Kortison im Rahmen einer ausgeprägten Atopischen Dermatitis zu nennen, die zu verheerenden und zum Teil irreversiblen Schädigungen der Haut führen kann (Aktories, 2005; Braun-Falco, 2005 [a]).

Gerade in der Therapie der chronischen Entzündung der Haut, ihrer Minderung oder Heilung in Abwägung zu medikamentös verursachten Nebenwirkungen könnten antiinflammatorisch wirksame Phytotherapeutika eine Lösung darstellen.

1.3. Entzündungsursachen und -vorgänge der Haut

Ursachen von Entzündungen sind mannigfaltig und werden im weitesten Sinne durch eine Gewebeschädigung hervorgerufen. Sie können durch körperfremde und körpereigene, belebte und unbelebte Noxen, sowie auf direktem und indirektem Wege entstehen. Externe Faktoren, die die Haut schädigen, stellen unter anderem Bakterien, Viren, Pflanzen, Tiere sowie chemische (Laugen und Säuren) und physikalische (Ultraviolette Strahlung [UV]) Noxen dar. Allen ist gemeinsam, dass sie zu einer lokalen Reaktion führen und verschiedene Zelltypen involviert sind. Diese Zelltypen werden aktiviert und führen zu einer spezifischen Produktion von Mediatoren.

UV-Bestrahlung führt in der Haut zu einer akuten Entzündung mit Erythem und Ödem. Hierbei kommt es durch die Aktivierung der Phospholipase A (PLA) zur Bildung von proinflammatorischen Mediatoren (Brock *et al.*, 1999). Durch UV-B aktivierte Keratinozyten reagieren unter anderem mit einer erhöhten Produktion an Interleukinen (Interleukin [IL] -1, -6, -8), Tumornekrosefaktoren (TNF- α), Wachstumsfaktoren sowie Lipidmediatoren wie Leukotrienen und Prostaglandinen (Grewe *et al.*, 1993; Alappatt *et al.*, 2000; Pupe *et al.*, 2002). Aus der lokalen Reaktion entsteht im Endeffekt eine systemische Reaktion.

Die Prostaglandine (PG) gehören wie die Thromboxane (TX) und Leukotriene (LT) den Eikosanoiden an, wobei PG und TX als Prostanoiden bezeichnet werden. Sie stellen Derivate mehrfach ungesättigter Fettsäuren, vornehmlich der Arachidonsäure (AA), dar. Wie in Abb. 1 dargestellt, wird durch das Schrittmacherezym Phospholipase A₂ (PLA₂) aus Phospholipiden der Zellmembranen unter anderem AA freigesetzt. Mit Hilfe der Prostaglandin-H-Synthase (PGHS), die auch Cyclooxygenase (COX) genannt wird, wird aus AA über Bildung von PGG₂ die Muttersubstanz der Prostanoiden PGH₂ gebildet. Die PGHS besitzt eine Cyclooxygenase-Aktivität, die AA in PGG₂ umwandelt und eine Peroxidase-Aktivität, die die Reduktion von PGG₂ zu PGH₂ katalysiert. Es existieren mindestens zwei Isoformen der COX, die COX-1 und COX-2. Die Existenz einer so genannten COX-3 ist noch nicht vollständig geklärt. Man vermutet, dass sie ein eigenständiges Enzym oder eine Isoform entweder der COX-1 oder COX-2 darstellt (Botting *et al.*, 2000; Willoughby *et al.*, 2000; Bazan *et al.*, 2002; Chandrasekharan *et al.*, 2002; Warner *et al.*, 2002; Kis *et al.*, 2006).

Die Muttersubstanz PGH_2 wird je nach Stimuli zu anderen Prostaglandinen (PGD_2 , PGE_2 , $\text{PGF}_{2\alpha}$), Thromboxanen (TX) oder zu Prostacyclin (PGI_2) umgewandelt.

Alternativ zu Prostanoiden werden aus der AA durch die 5-Lipoxygenasen (5-LOX) Leukotriene gebildet. Leukotriene sind Mediatoren der Entzündungsreaktion, wobei ihre eigentliche physiologische Funktion noch nicht genau geklärt ist. In manchen Geweben werden Hydroperoxyeikosatetraen-Säuren (12-/15-HPETE) durch 12-/15-Lipoxygenasen (12-/15-LOX) gebildet, wobei die biologische Bedeutung dieser zum Teil noch unklar ist (Löffler, Petrides, 2003).

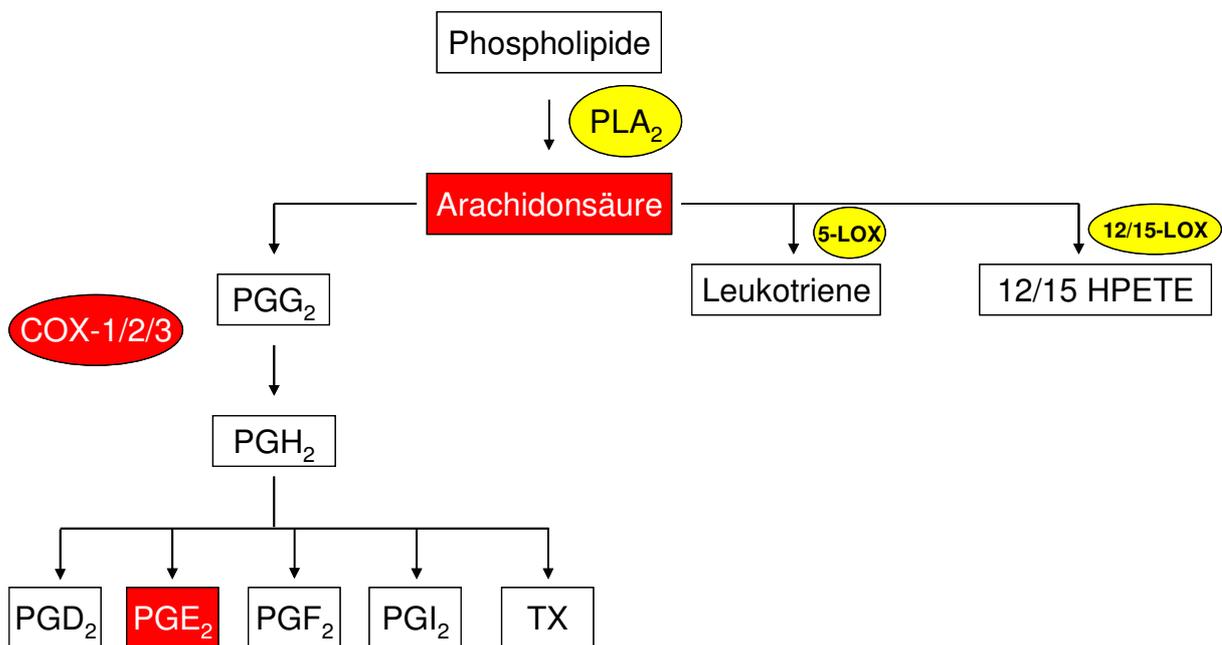


Abb. 1: Biosynthese der Prostaglandine (PG), Thromboxane (TX), Leukotriene und Hydroperoxyeikosatetraen-Säuren (HPETE). Durch die Phospholipase A₂ (PLA₂) wird Arachidonsäure (AA) aus Phospholipiden freigesetzt. Durch Lipoxygenasen (LOX) entstehen aus AA Leukotriene und 12-/15-Hydroperoxyeikosatetraen-Säuren. Cyclooxygenasen (COX) enthalten eine Cyclooxygenase- sowie eine Peroxidase-Aktivität. Zuerst wird AA durch die Cyclooxygenase-Aktivität zu PGG_2 und danach durch die Peroxidase-Aktivität PGG_2 zu PGH_2 , der Muttersubstanz der weiteren PG (PGD_2 , PGE_2 , PGF_2 , PGI_2) und Thromboxane (TX), umgewandelt.

Die COX-1 wird in vielen Zelltypen dauerhaft (konstitutiv) exprimiert und ist an der physiologischen Zellhomöostase beteiligt. Im Gegensatz dazu wird die COX-2 durch verschiedene Stimuli wie zum Beispiel Zytokine (Interleukin-1 und Tumornekrosefaktor- α), Lipopolysaccharide oder UV-B-Strahlung induziert (Löffler, Petrides, 2003). Die COX-2 ist für die Produktion von PG, hauptsächlich von PGE_2 , in akuten inflammatorischen Situationen verantwortlich. Die Produktion von PGE_2 und PGI_2 ist eine Antwort auf Entzündungsmediatoren, wobei die produzierte Menge an PGE_2 abhängig von der vorhandenen Menge an AA und der Menge an

vorhandenem COX-2-Protein ist (Brock *et al.*, 1999). Dies konnten Brock *et al.* bestätigen, indem sie die Produktprofile von COX-1 und COX-2 in Zellen verglichen, die nur die eine oder andere COX exprimieren konnten beziehungsweise gehemmt wurden (Brock *et al.*, 1999). Diese Ergebnisse zeigten, dass durch das COX-2-Enzym bevorzugt AA zu PGI₂ und PGE₂ umwandelt wird. PG spielen eine Rolle bei Entstehung von Fieber, Schmerzen und Entzündung. Die induzierbare Form der COX (COX-2) wird als Ziel der antiinflammatorischen Effekte von Medikamenten genutzt.

1.4. UV-B-Modell

Durch UV-Strahlung wird eine Entzündung der Haut hervorgerufen (Greaves *et al.*, 1970; Hruza *et al.*, 1993). Sowohl *in vitro* als auch *in vivo* wird durch UV-B-Strahlung der Arachidonsäuremetabolismus induziert (Chen *et al.*, 1996). Dabei kommt es zu einer Hochregulierung der zytoplasmatischen Phospholipase A₂ und COX-2 und damit zu einer erhöhten Produktion an Prostaglandinen (Brock *et al.*, 1999). Ahn *et al.* konnten zeigen, dass eine einmalige Bestrahlung mit UV-B eine signifikante COX-2-Expression in HaCaT-Zellen¹ bewirkte und dadurch die Synthese von Prostaglandinen steigerte, was der Imitation einer Entzündungsreaktion entspricht (Ahn *et al.*, 2002).

Genau diese Vorgänge macht sich das UV-B-Modell zu Nutze. Es beinhaltet eine Bestrahlung der Haut beziehungsweise von Zellkulturen mit UV-B. Dies führt wie oben beschrieben zu einer Hochregulation der COX-2, wobei diese in akut inflammatorischen Situationen vor allem PGE₂ produziert, in Abhängigkeit der vorhandenen Menge an Arachidonsäure. Die Konzentration der COX-2 und des Entzündungsmediators PGE₂ kann innerhalb von Experimenten gemessen werden. Durch den Zusatz von Substanzen, wie zum Beispiel Pflanzenextrakten, kann untersucht werden, ob das Ausmaß der Entzündung durch diese vermindert werden kann.

In Zellkulturen mit Keratinozyten (z.B. HaCaT-Zellen) kann somit anhand der Expression der COX-2 und der Konzentration an PGE₂ die erzeugte Entzündungsreaktion bestimmt werden und im Verhältnis zu unbestrahlten und unbehandelten Kontrollen untersucht werden.

¹ **HaCaT**-Zellen: Aus dem Ursprung der Zellen und den ursprünglichen Kulturbedingungen leitet sich der Name ab: **H**uman **a**dult skin **k**eratinocytes, low **C**alcium (0,2 mM), high **T**emperature (38,5°C). (siehe 2.1.)

In vivo kann das UV-B-Modell unter anderem mit dem UV-Erythemtest oder Saugblasen-Modell (siehe 1.5.) kombiniert werden. Der UV-Erythemtest ist ein Modell zur Ermittlung der entzündungshemmenden Wirksamkeit von topisch aufgetragenen Zubereitungen (Jocher *et al.*, 2005). *In vivo* kann die Inflammation anhand von verschiedenen Parametern wie visuellen Scores, Erythemmessung und Messung des transepidermalen Wasserverlustes (TEWL) bestimmt werden oder wie im Falle des Saugblasen-Modells durch Bestimmung der Konzentrationen von Mediatoren der Saugblasenflüssigkeiten.

Das UV-B-Modell findet bei *in vitro*- und *in vivo*-Modellen bei unterschiedlichen Fragestellungen Einsatz und ist ein gut reproduzierbares Modell. Ein weiterer Vorteil liegt in der identischen Auslösung der Entzündung *in vitro* und *in vivo* durch die gleiche UV-B-Lichtquelle (Jocher *et al.*, 2005).

Mittels des UV-B-Modells wurde in dieser Arbeit das antiinflammatorische Potential von fünf Pflanzenextrakten *in vitro* (HaCaT-Zellen) untersucht, wobei ein Extrakt ebenfalls *in vivo* kombiniert mit dem Saugblasen-Modell getestet wurde.

1.5. Saugblasen-Modell

Der UV-Erythemtest kann für Versuche *in vivo* herangezogen werden (Jocher *et al.*, 2005). Durch ihn kann jedoch keine Aussage auf die Konzentration von Entzündungsmediatoren in der Haut gemacht werden. Mit Hilfe des Saugblasen-Modells ist es möglich, Entzündungsparameter, die aufgrund von Stimuli von Zellen der Haut gebildet worden sind, in der Blasenflüssigkeit nachzuweisen (Macdonald *et al.*, 2006). *In vitro*- und *in vivo*-Ergebnisse können so anhand von gleichen Parametern verglichen werden.

Von Kiistala *et al.* wurden 1968 die ersten Saugblasenexperimente beschrieben (Kiistala *et al.*, 1968). Durch einen Sog werden aus den dermalen Gefäßen und dem Interstitium Flüssigkeit abgepresst und dadurch die Saugblasenflüssigkeit gebildet. Kiistala *et al.* produzierten den Sog durch ein Angiosterrrometer. Später wurde der Unterdruck unter anderem durch Beatmungsmaschinen, Lungen- oder Magenabsaugpumpen oder durch Aufziehen von handelsüblichen Einwegspritzen (in Verbindung mit einem Dreiwegehahn) bei dermatologischen Studien erreicht (Gupta *et al.*, 1999).

Die zeitaufwendige Separation der Epidermis von der Dermis verläuft über eine Ausbildung von kleinen Bläschen, die nach und nach zu einer großen Saugblase

konfluieren. Nach dem Auftreten von kleinen Blasen kann die Zeit bis zur Ausbildung einer großen Saugblase durch Erhöhung des Druckes verringert werden (Gupta *et al.*, 1999).

Die Zeit bis zur Entwicklung der Blasen ist von verschiedenen Parametern abhängig wie Gupta *et al.* zeigen konnten (Gupta *et al.*, 1999). Bei jüngeren Menschen dauert die Separation aufgrund der engeren dermoepidermalen Junktion länger. Eine höhere Umgebungstemperatur oder Unterspritzung des Hautareals mit Natrium-Chlorid-Lösung verringert die Ausbildungszeit. Hinzu kommt, dass der Durchmesser der Saugblasenapparatur proportional zur benötigten Zeit ist. Eine Kortikoidatrophie der Haut, eine Vorbehandlung mit PUVA (Psoralen und UV-A) oder die Stelle der Saugblasensetzung (Unterschiedliche Dicke der Haut über Knochen bzw. Weichteilgewebe) haben ebenfalls Einfluss auf die benötigte Zeit der Ausbildung von Saugblasen. Laxmisha *et al.* untersuchten verschiedene Lokalisationen der Saugblasensetzung, wobei der Unterarm als signifikanter Ort für eine gute Ausbildung der Blase postuliert wurde (Laxmisha *et al.*, 2005). Der Unterdruck sollte außerdem nicht zu hoch gewählt werden, da dadurch Schmerzen, Hämatome und Einblutungen in die Blase sowie fehlerhafte Ausbildungen der Saugblase verursacht werden kann.

Saugblasen werden sowohl bei verschiedenen experimentellen Fragestellungen als auch therapeutisch eingesetzt. Sie können als Wundheilungsmodell dienen (Alexis *et al.*, 1999). In der Saugblasenflüssigkeit können Konzentrationen von topisch aufgetragenen oder systemisch zugeführten Substanzen und deren Kumulation in der Haut bestimmt werden (Benfeldt *et al.*, 1999; Schempp *et al.*, 1999; Schempp *et al.*, 2000). Darüber hinaus ermöglicht es die Messung von Zytokinkonzentrationen der Blasenflüssigkeit (Gupta *et al.*, 2000). Therapeutisch können die Saugblasen bei der Vitiligoerkrankung eingesetzt werden (Falabella *et al.*, 1971). Ein Saugblasenpräparat einer nicht befallenen Hautstelle kann auf einer befallenen Hautstelle autolog transplantiert werden und damit ein kosmetisch gutes Ergebnis ohne Narbenbildung erreicht werden, wobei lediglich eine Hyperpigmentierung der Abtragungsstelle entstehen kann (Gupta *et al.*, 1999). Diese reduziert sich in einem Zeitrahmen von etwa drei Monaten.

In dieser Arbeit wurde die Konzentration von PGE₂ in Saugblasenflüssigkeiten gemessen. Es wurde die Wirkung eines Pflanzenextraktes auf die inflammatorische

Antwort nach individueller Bestrahlung mit einer UV-B-Lichtquelle *in vivo* untersucht. In Abb. 2 ist eine Saugblase nach kompletter Ausbildung dargestellt.



Abb. 2: Komplett ausgebildete Saugblase (Unterarminnenseite)

1.6. Untersuchte Pflanzenextrakte und ihre Portraits

Pflanzenextrakte können antiinflammatorisches Potential besitzen (Augustin, 2004 [a]). Es existieren nur wenige Studien, die Pflanzenextrakte gezielt auf diese Eigenschaft hin untersuchten. Aufgrund des in 1.1. und 1.2. beschriebenen Bedarfs an gut untersuchten und antiinflammatorisch wirksamen Substanzen pflanzlicher Natur wurden fünf Pflanzenextrakte ausgewählt, um zu untersuchen, ob diese bei entzündlichen Hautkrankheiten Einsatz finden könnten. Sie wurden aufgrund ihrer Inhaltsstoffe, von denen eine antientzündliche Wirksamkeit bekannt ist oder vermutet wird, ihrer antioxidativen Wirksamkeit, Angaben in der Literatur und aufgrund von Überlieferungen der Volksmedizin ausgewählt. Es wurde außerdem darauf geachtet, dass die Pflanzenextrakte nicht beziehungsweise kaum allergisierend wirken. Im Folgenden sind die Portraits der untersuchten Pflanzen *Potentilla anserina* L.² (Anserina), *Rosmarinus officinalis* L. (Rosmarin), *Salvia officinalis* L. (Salbei), *Usnea barbata* L. (Usnea) und *Potentilla tormentilla* L. (Blutwurz) dargestellt.

1.6.1. *Potentilla anserina* L.

Botanische Beschreibung und Verbreitung:

Potentilla anserina L. (Anserina, dt.: Gänsefingerkraut) gehört der Familie der Rosengewächse (*Rosaceae*) an und wird unter anderem auch Fingerkraut,

² L. = Linne, Carl von (1707-1778), schwedischer Botaniker, Erstbeschreiber

Krampfkraut, Silberkraut, Gänserich und Ganskraut genannt (Jänicke, 2003 [c]). Es ist eng verwandt mit der Blutwurz (*Potentilla tormentilla/erecta* (L.) Raeuschel, siehe 1.6.5.). Die Pflanze wächst auf tonigen, lehmigen Böden und ist an Wegrändern, in Gräben und Ödland zu finden. Aus dem ausdauernden Wurzelstock entwickelt sich eine Blattrosette und von dieser aus entstehen bis zu ein Meter lange Ausläufer. Ihre Blätter besitzen auf der Unterseite eine feine silbrig glänzende Behaarung und sie sind gefiedert und scharf gesägt (siehe Abb. 3).

In Europa, Asien und Amerika ist das Gänsefingerkraut genau wie die Blutwurz verbreitet. Die Ernte der Blätter findet im Frühjahr kurz vor oder während der Blüte ihrer gelben und fünfzähligen Blüten statt (Frohne, 2002 [b]).



Abb. 3: *Potentilla anserina* L. (Anserina, dt.: Gänsefingerkraut), (Pahlow, 2000)

Inhaltsstoffe:

Das Gänsefingerkraut enthält je nach Literatur etwa 2-10% fällbare Gerbstoffe und zählt wie die Blutwurz zu den Gerbstoffdrogen (Jänicke, 2003 [c]; Schulz, 2004 [c]). Außer den kondensierten Gerbstoffen (dimere bis hexamere Proanthocyanidine) sind verschiedene Ellagitannine in der Anserina enthalten. Ellagitannine sind Ester der Hexahydroxydiphensäure mit Monosacchariden (meist Glukose) und sind vor allem in den Blättern zu finden (Hager-Rom, 2001 [Anserina]). Die Dominanz des hydrolysierbaren Gerbstoffes Catechin nur in dieser Art der Gattung *Potentilla* deutet

auf eine isolierte Stellung hin (Hager-Rom, 2001 [Anserina]). Darüber hinaus kommen Polyphenole, Anthocyane, Flavonoide sowie Triterpene (Tormentosid = Ester der Tormentillsäure) als Inhaltstoffe vor.

Wirkung und Anwendungsgebiete:

In der Volksmedizin wird das Gänsefingerkraut in Form von Teezubereitungen und lokalen Behandlungen eingesetzt. Bei unspezifischen akuten Durchfallerkrankungen sowie bei Dysmenorrhoe wird versucht, diese durch sie zu lindern. Darüber hinaus wird sie bei Entzündungen des Mund- und Rachenraums, vor allem bei Zahnfleisch- und Mundschleimhauterkrankungen eingesetzt (Hager-Rom, 2001 [Anserina]; Frohne, 2002 [b]; Schulz, 2004 [c]). Eine Positivmonographie der Kommission E liegt hierfür vor (Fintelmann, 2002 [a]). Die antidysmenorrhoeische Wirkung wurde im Tiermodell bestätigt. Nach Fintelmann und Weiss wurde diese Wirkung bei Testung am Menschen nicht gefunden, jedoch hält sich diese Überlieferung hartnäckig und Anserina-Zusätze werden immer noch in Frauentees und anderen Präparaten für dysmenorrhoeische Beschwerden eingesetzt (Fintelmann, 2002 [a]). Tunon *et al.* untersuchten allgemein antiinflammatorische Wirkungen von Pflanzen, die in Schweden beheimatet sind und stufen Anserina als eher unbedeutend ein (Tunon *et al.*, 1995).

Die enthaltenen Tannine sollen proliferationshemmend auf Tumorzellen wirken (Kashiwada *et al.*, 1992; Murayama *et al.*, 1992).

Es sind keine Kontraindikationen bekannt (Frohne, 2002 [b]). Als Nebenwirkungen werden lediglich leichte Magenbeschwerden beschrieben (Schulz, 2004 [c]). Im Handel sind unter anderem Filmtabletten und Dragees erhältlich (Jänicke, 2003 [c]). Dokumentierte Fallbeobachtungen oder klinische Studien liegen unseres Wissens nicht vor.

1.6.2. *Rosmarinus officinalis* L.

Botanische Beschreibung und Verbreitung:

Rosmarinus officinalis L. (dt.: Rosmarin) gehört zur Familie der Lippenblütengewächse (*Lamiaceae*). Im Volksmund wird es auch als Kranzenkraut oder Krankkraut bezeichnet (Augustin, 2004 [b]). Verwendung finden die Blätter und das daraus gewonnene ätherische Öl. Schon in der Antike wurde der immergrüne, bis zu 2 m hoch werdende holzige Strauch als Heilmittel verwendet. An den stark verzweigten, dichten Ästen befinden sich die graugrünen nadelartigen Blätter (siehe

Abb. 4). Diese sind bis zu 4 cm lang und 5 mm breit, sitzend, ledrig, am Rande umgerollt und auf der Unterseite graufilzig. Von Mai bis Juni blühen die blassblau, rosa oder weißen Blüten. Geerntet werden die Blätter und Stängel des Rosmarins während oder nach der Blütezeit. Ursprünglich war Rosmarin im Mittelmeerraum und Portugal beheimatet. Heutzutage wird er in Kulturen in Spanien, Marokko, Frankreich und Tunesien angebaut (Jänicke, 2003 [d]). Die Ansprüche der Pflanze an den Boden sind gering, wobei sich sandige Lehmböden in sonnigen, warmen und trockenen Gebieten als günstig erwiesen haben.



Abb. 4: *Rosmarinus officinalis* L. (dt.: Rosmarin), (Pahlow, 2000)

Inhaltsstoffe:

Verwendung finden die Blätter des Rosmarins, die 1-3% Öl (in der getrockneten Droge) enthalten (Teuscher, 2003 [a]). Das Öl enthält vor allem flüchtige Komponenten. In vier Gruppen können die enthaltenen Polyphenole unterschieden werden: Triterpene, Flavone, Zimtsäurederivate und Diterphenole (del Bano *et al.*, 2003).

Durch eine Methanolextraktion konnten Abe *et al.* die drei verschiedenen Triterpene Betulinsäure, Oleanolsäure und Ursolsäure isolieren (Abe *et al.*, 2002). Als typisches Flavon ist Luteolin in Rosmarinblättern enthalten. Die Zimtsäurederivate machen etwa 3,5% des Trockengewichtes aus. Rosmarinsäure, ein Kaffeesäurederivat, ist

wichtigstes Zimtsäurederivat (Teuscher, 2003 [a]). Das Diterphenol Carnosolsäure ist zu 0,35% des Trockengewichtes enthalten. Carnosolsäure geht leicht in Carnosol und Rosmanol über (Teuscher, 2003 [a]). Im Sommer nimmt der Gehalt der Blätter an Carnosolsäure ab. Durch diese Oxidation werden Radikale unschädlich gemacht und schützen so die Membranfettsäuren des Rosmarins (Masuda *et al.*, 2002).

Wirkungen und Anwendungsgebiete:

Rosmarin wird innerlich bei Magenbeschwerden, Blähungen und Völlegefühl sowie äußerlich bei hypotoner Kreislaufschwäche und rheumatischen Erkrankungen angewendet, außerdem wird es in der Volkmedizin bei schlecht heilenden Wunden eingesetzt (Jänicke, 2003 [d]).

Im Tierexperiment hemmt Rosmarin Oxidationsvorgänge, indem es Radikale unschädlich macht, die zur Hautalterung führen (Haraguchi *et al.*, 1995). Durch die Oxidation von Carnosolsäure zu Carnosol werden die ungesättigten Membranfettsäuren im Rosmarin geschützt. In dermatologischen Studien ist es als *Antiagingmittel* wirksam (Calabrese *et al.*, 2000). Die antioxidative Wirkung korreliert mit der nicht-enzymatischen Glykosylierung von Proteinen und verhindert somit Alterungsvorgänge (Hulthe *et al.*, 2000).

Wässrig-ethanolische Extrakte aus Rosmarin waren in der Lage, bei Ratten die Induktion von Magengeschwüren durch Ethanol, Indometacin oder Reserpin zu hemmen (Dias *et al.*, 2000). Die induzierte Bildung von Hauttumoren bei Mäusen durch Karzinogene konnte durch lokal applizierten Rosmarinextrakt bedeutend eingeschränkt werden (Huang *et al.*, 1994). Antiinflammatorische Vorgänge beruhen auf der Hemmung von Komplementfaktoren und Entzündungsmediatoren von Leukozyten (Offord *et al.*, 1995). Schwache antimikrobielle und antivirale Effekte werden der Pflanze zugeschrieben (Abe *et al.*, 2002; Leal *et al.*, 2003). Eine durchblutungsfördernde Wirkung kommt äußerlich bei rheumatischen Beschwerden und Kreislaufproblemen zum Tragen (Kraft, 2000 [d]).

Bei lokaler Anwendung sind gelegentlich Kontaktallergien beschrieben, für die Mono- und Diterpene verantwortlich gemacht werden (Armisen *et al.*, 2003).

Orale Einnahme von großen Mengen an Rosmarin sollen zu tonisch-klonischen Krämpfen bis hin zum Koma führen, darüber hinaus wird von der Anwendung während der Schwangerschaft abgeraten. Bei der Einnahme von großen Mengen an Rosmarinöl sind gastrointestinale Beschwerden, Erbrechen, Gebärmutterblutungen

und Nephritiden beobachtet worden (Augustin, 2004 [b]). Das ätherische Öl soll äußerlich hautreizend und durchblutungsfördernd wirken und wird in Präparaten zur äußeren Anwendung beigemischt. Die hautreizende Eigenschaft des Rosmarins wird jedoch kontrovers diskutiert und ist letztendlich nicht im Detail geklärt (Hänsel, 2004 [b]). Als Antioxidans und Gewürzdroge ist es ebenfalls in der Lebensmittelherstellung und im Haushalt weit verbreitet.

1.6.3. *Salvia officinalis* L.

Botanische Beschreibung und Verbreitung:

Salvia officinalis L. (dt.: Salbei) gehört zur Familie der Lippenblütengewächse (*Lamiaceae*), genau wie *Rosmarinus officinalis* L. (dt.: Rosmarin). Unter anderem ist die Pflanze unter den volkstümlichen Namen Dalmatiner-Salbei und Scharlachkraut bekannt. Die krautige Pflanze gliedert sich in mehrere Unterarten, deren Gehalt an ätherischen Ölen sich je nach Herkunft unterscheidet. Der wintergrüne Strauch wird bis zu 80 cm hoch (siehe Abb. 5). An seinen charakteristischen vierkantigen, verholzenden Stängeln, seinen filzigen, lanzett- bis eiförmigen Blättern und seinen hellvioletten Blüten ist Salbei gut zu erkennen. Zur Blütezeit im Juni bis Oktober werden die Blüten, Blätter und Stängel geerntet. Der Geschmack der Blätter ist aromatisch bis bitter und sie verbreiten einen ätherischen Ölgeruch.

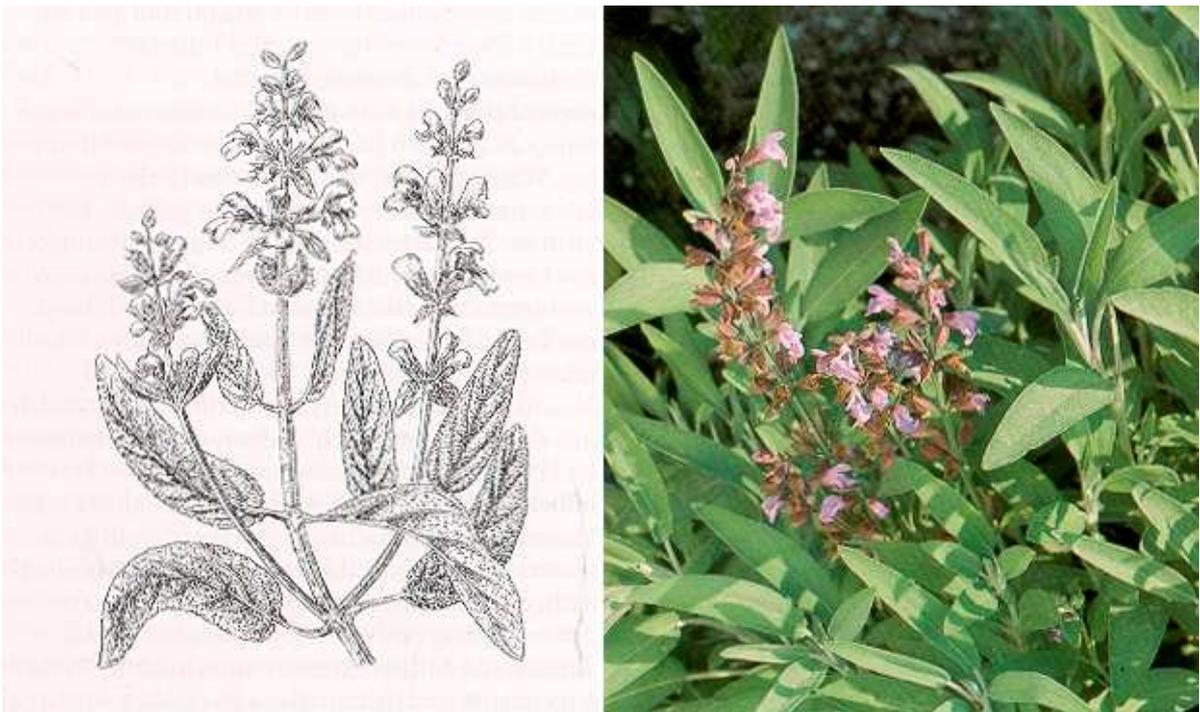


Abb. 5: *Salvia officinalis* L. (dt.: Salbei), (Pahlow, 2000)

Salbei liebt trockenen Boden mit guter Kalkversorgung in warmen, sonnigen und windgeschützten Lagen. Staunässe im Boden wird von ihm nicht vertragen (Teuscher, 2003 [b]). Ursprünglich ist er in Südeuropa beheimatet. In Algerien, Russland, Indien, Indonesien, Südafrika, Antillen, USA und im ehemaligen Jugoslawien wird er kultiviert (Augustin, 2004 [c]).

Inhaltsstoffe:

Als Arzneidroge werden die Blätter und das aus Blüten und Stängeln gewonnene ätherische Öl verwendet. Die Blätter des Salbeis enthalten 1,2-3,6% ätherische Öle (Teuscher, 2003 [b]). Santos-Gomes *et al.* haben 75 verschiedene Komponenten finden und 65 davon analysieren können, wobei die wichtigsten Bestandteile Thujon (35-60%), Pinen, Limonen, 1,8-Cineol, Campher, Camphen und Manool sind (Santos-Gomes *et al.*, 2003).

Salbeiblätter enthalten außerdem Gerbstoffe wie Kaffeesäurederivate (3-6% Rosmarinsäure, Chlorogensäure), sowie Bitterstoffe wie Diterphenole (z.B. Carnosolsäure). Carnosolsäure geht bei Trocknung der Droge in Carnosol über (Teuscher, 2003 [b]).

Des Weiteren sind Flavonoide (z.B. Luteolin) enthalten. Als Triterpen kommt vor allem die Ursolsäure mit 2-5% im Salbei vor (Brieskorn *et al.*, 1991). Die Leitsubstanzen Carnosolsäure, Carnosol und Ursolsäure, entsprechen den Leitsubstanzen von Rosmarin.

Wirkung und Anwendungsgebiete:

In der Volksmedizin wird Salbei gegen Juckreiz, bei Fieber, Appetitstörungen, nervösen Zuständen, Verdauungsstörungen, Mund- und Rachenentzündungen, sowie bei Hyperhidrosis angewendet. Salbei wird zudem als Gewürz im Haushalt verwendet und dient zur Verlängerung der Haltbarkeit in der Lebensmittelindustrie, insbesondere als Schutz vor Fettverderb (Jänicke, 2003 [e]).

Neben Fertigarzneimitteln mit Salbei als therapeutischem Inhaltsstoff wirken besonders gut Frischpflanzenauszüge bei Hyperhidrosis. Roth *et al.* konnten zeigen, dass ein Salbeiextrakt gegen *Mycobacterium tuberculosis* wirksam ist (Roth, 1994). Dies und die schweißhemmende Wirkung des Salbeis wurde sich früher unter anderem bei der Tuberkulose zu Nutze gemacht (Wang *et al.*, 2000).

Seine ätherischen Öle, Triterpene und Carnosol wirken antiviral und antibakteriell (Sattar *et al.*, 1995). Bei einer topischen Therapie von Herpes labiales mit einer Salbei-Rhabarber-Creme konnte der gleiche Effekt wie mit einer Aciclovir-Creme gezeigt werden (doppelblind und randomisierte Studie) (Saller *et al.*, 2001). Cineol und Campher wirken antifugal gegen fünf phytopathogenetische Pilze (Pitarokili *et al.*, 2003). Spasmolytische Wirkungen werden den Flavonoiden zugeschrieben. Salbei kann durch seine ätherischen Öle und Flavonoide Krämpfe an der glatten Muskulatur des Darms und der Gallenblase auslösen. Masuda *et al.* zeigten, dass die antioxidative Wirkung von Salbei auf den Gehalt an Diterpenphenolen, insbesondere Carnosolsäure und seine Derivate, zurückzuführen ist (Masuda *et al.*, 2002).

Die inhibierende Wirkung von Salbei auf ein Kroton induziertes Ödem am Mäuseohr wurde von Baricevic *et al.* gezeigt (Baricevic *et al.*, 2001). Genauere Untersuchungen zeigten, dass Ursolsäure als Hauptbestandteil an diesem antiinflammatorischen Effekt beteiligt war. In diesem Zusammenhang war Ursolsäure zweimal so wirksam wie Indometacin.

Von Kim *et al.* wurde die Wirkung auf den Metabolismus der Arachidonsäure von *Salvia miltiorrhiza* (chinesischer Salbei) untersucht. Die Arbeitsgruppe konnte zeigen, dass eine Fraktion von *Salvia miltiorrhiza* den stärksten Hemmeffekt von verschiedenen getesteten Pflanzen auf die Prostaglandin D (PGD)-Produktion hatte (Kim *et al.*, 2002). Nach genauerer Untersuchung dieser Fraktion ergaben sich als aktive Bestandteile Tanshinone I. Tanshinone I haben dabei keinen hemmenden Effekt auf die COX-2 (Aktivität und Expression). Sie sind ein Inhibitor der IIA-humanen-rekombinanten-sPLA. *In vivo* zeigten Tanshinone I antiinflammatorische Aktivität im Karrageen (in Algen vorkommendes Polysaccharid) induzierten Ödem der Ratte und in einer induzierten Arthritis.

Nebenwirkungen einer Therapie mit Salbei sind hauptsächlich auf das ätherische Öl und das darin enthaltene Thujon zurückzuführen und sind nach Hänsel und Sticher auf missbräuchliche Verwendung zurückzuführen (Hänsel, 2004 [a]). Allergische Reaktionen wurden bisher kaum beschrieben. Auslösendes Allergen ist vermutlich die Carnosolsäure (Futrell *et al.*, 1993; Hjorther *et al.*, 1997). Insgesamt wird das Sensibilisierungspotential des Salbeis als gering eingestuft.

Durch längere Einnahme von alkoholischen Salbeiextrakten können epileptiforme Krämpfe verursacht werden. In der Schwangerschaft sollte Salbei unter anderem deshalb nicht eingenommen werden (Jänicke, 2003 [e]).

1.6.4. *Usnea barbata* L.

Botanische Beschreibung und Verbreitung:

Die *Usnea barbata* L. (Usnea, dt.: Bartflechte) besteht aus einem graugrünen Geflecht aus dünnen Strähnen (siehe Abb. 6). Sie wächst bei hoher Luftfeuchtigkeit am Stamm, den Ästen und Zweigen verschiedener Bäume und Sträucher (Jänicke, 2003 [a]). Es handelt sich um einen Doppelorganismus aus einem Pilz und einer Alge beziehungsweise Cyanobakterium. Die Symbiose der beiden Organismen reagiert empfindlich auf Luftverschmutzung. Aus diesem Grund sind sie in Europa selten geworden.



Abb. 6: *Usnea barbata* L. (Usnea, dt.: Bartflechte), Aufnahme S. Weckesser, Orossi-Tal (Costa Rica)

Bartflechten kommen in den Alpen und anderen Gebirgen Europas sowie in Nordamerika vor. Heute stammt die Arzneidroge vor allem aus Osteuropa (Fintelmann, 2002 [c]).

Inhaltsstoffe:

Bartflechten enthalten verschiedene Flechtensäuren und Schleimstoffe. In *Usnea barbata* L. ist die Flechtensäure Usninsäure, ein lipophiles Dibenzofuranderivat, die Hauptkomponente (Fintelmann, 2002 [c]).

Wirkung und Anwendungsgebiete:

Arzneizubereitungen werden traditionell bei leichten Schleimhautentzündungen im Mund- und Rachenbereich angewendet. In der Monographie der Kommission E wurde die Verwendung hierfür positiv bewertet (Jänicke, 2003 [a]).

Aufgrund des Usninsäuregehaltes hemmt die Bartflechte verschiedene Mikroorganismen (Lauterwein *et al.*, 1995). Die Übersicht von Cocchietto *et al.* fasst die Erkenntnisse zu den antibakteriellen Wirkungen von Usninsäure zusammen (Cocchietto *et al.*, 2002). Des Weiteren wirkt sie bereits in niedrigen Dosen antiproliferativ auf das Wachstum von Keratinozyten (Cardarelli *et al.*, 1997; Kumar *et al.*, 1999). Usnea-Arten schützen die Zellen vor oxidativem Stress (Rancan *et al.*, 2002).

Allergien gegenüber Flechtensäuren (außer gegen Usninsäure) sind bekannt, ihre sensibilisierende Potenz gilt jedoch als gering (Heine *et al.*, 1987; Hausen *et al.*, 1993; Hahn *et al.*, 1995; Rademaker *et al.*, 2000). Aus diesem Grund werden Extrakte eingesetzt, die nur wenig Zusätze anderer Flechtensäuren als Usninsäure enthalten.

1.6.5. *Potentilla tormentilla/erecta* (L.) Raeuschel³

Botanische Beschreibung und Verbreitung:

Potentilla tormentilla/erecta (L.) Raeuschel (Tormentilla, dt.: Blutwurz) gehört zur Familie der Rosengewächse (*Rosaceae*). Sie ist auch unter den volkstümlichen Namen Rotwurz, Ruhrwurz, Fingerkrautwurz, Siebenfingerwurzel, Christusrose und Bauchwehwurz bekannt (Augustin, 2004 [d]). Verwendet wird der dicke verholzende Wurzelstock. An Bruch- oder Schnittstellen der Wurzel läuft diese blutrot an. Die krautige Pflanze besitzt dünne und verzweigte Stängel, die behaart sind. Je nach Wuchsort erreichen sie eine Höhe von 10-40 cm. Die ebenfalls behaarten Blätter sind drei- bis fünfteilig gefingert und liegen sitzend dem Stängel an oder sind am Grund kurz gestielt. Die Blätter sind gelb und herzförmig. Im Gegensatz zu anderen *Potentilla*-Arten besitzt die Tormentilla vierzählige Blütenblätter (siehe Abb. 7).

Die Standorte der unscheinbar aussehenden, ausdauernden Pflanze sind sehr verschieden. Zum einen gedeiht sie auf nassen Hochmooren und moorigen Bergwäldern, andererseits wächst sie auf Heiden und kargen Sandböden (Fintelman, 2002 [b]). Der Wurzelstock ist variabel geformt und von 1-3 cm Dicke und bis zu 10 cm Länge (Hager-Rom, 2001 [Tormentilla]). Die Wurzeln werden im Frühjahr oder Herbst gesammelt, gereinigt und getrocknet oder zu Tinkturen verarbeitet. Die im Mai bis Juni blühende Pflanze ist in ganz Europa bis ins nördliche Skandinavien, Asien, Russland und Amerika heimisch (Augustin, 2004 [d]).

³ Raeuschel: Räuschel, Ernst Adolf (gestorben 1797), deutscher Botaniker



Abb. 7: *Potentilla tormentilla/erecta* (L.) Raeschel (Tormentilla, dt.: Blutwurz), (Pahlow, 2000)

Inhaltsstoffe:

Die Blutwurz gehört zu den Gerbstoffdrogen, wobei der Gerbstoffgehalt schwankt und während der Monate Mai bis August am höchsten ist. Im Gegensatz zu anderen Gerbstoffdrogen weisen *Potentilla*-Arten wie die Blutwurz und das Gänsefingerkraut neben kondensierten Gerbstoffen auch verschiedene hydrolysierbare Ellagitannine (Ester der Hexahydroxydiphensäure mit Monosacchariden, meist Glukose) auf (Augustin, 2004 [d]). Mit einem hohen Gerbstoffanteil, je nach Literatur von 15-25%, ist sie eine der wichtigsten heimischen Gerbstoffdrogen (Jänicke, 2003 [b]; Augustin, 2004 [d]). Diese liegen vor allem als kondensierte Gerbstoffe (dimere bis hexamere Proanthocyanidine) vor. Ellagitannine liegen in Form von Agrimoniin als höchstem Anteil (3,5%), gefolgt von Pendunculagin (1%) und Laevigatin (0,12%) vor (Murayama *et al.*, 1992). Außerdem liegen Gallotannine, Catechine, Flavonoide (z.B. Kämpferöl), Triterpene (Saponine), Tormentosid und Tormentillsäureglukosid vor. Beim Lagern der Droge entsteht das wasserunlösliche Tormentillrot (Phlobaphen), wobei dieses weniger wirksam ist (Scholz, 1994).

Wirkung und Anwendungsgebiete:

Volkstümliche Indikationen stellen Blutungen, Ruhr, Hautausschläge, aufgesprungene Lippen, Quetschungen, Hämatome und Durchfallerkrankungen dar.

Früher wurde es auch als klassisches Pestmittel verwendet. Außerdem wird Tormentilla innerlich und äußerlich in Form von Tee, Tinkturen, Bädern und Umschlägen bei schlecht heilenden Wunden, Erfrierungen, Verbrennungen und Hämorrhoiden und bei akuter Tonsillitis angewendet (Augustin, 2004 [d]).

Die Blutwurz wirkt astringierend. Dies ist auf die Gerbstoffe zurückzuführen. In ihrer Positivmonographie der Kommission E werden als innerliche Anwendungsgebiete akute unspezifische Diarrhoe, als äußerliche Anwendungsgebiete leichte Schleimhautentzündungen im Mund- und Rachenraum genannt (Fintelmann, 2002 [b]). Der Name „*tormentum*“ heißt übersetzt Kolik und deutet auf eines seiner Einsatzgebiete, die Behandlung von Durchfällen hin. Fertigarzneimittel wie ratioGAST®, die Blutwurz enthalten, wurden gegen unspezifische Durchfallerkrankungen entwickelt.

Ellagitannine wirken hemmend auf die Hyaluronidase und Cyclooxygenase und blockierend auf die Degranulation von Mastzellen (Tunon *et al.*, 1995; Bos *et al.*, 1996). Das in der Blutwurz enthaltene Tannin Agrimoniin und andere Tannine können die Proliferation von Tumorzellen hemmen (Kashiwada *et al.*, 1992; Murayama *et al.*, 1992). Bos *et al.* konnten zeigen, dass die Procyanidine der Tormentilla Radikalfänger sind und Superoxidantigene neutralisieren können und damit die Lipidperoxidation verhindern (Vennat *et al.*, 1994; Bos *et al.*, 1996). Die Untersuchungen ergaben, dass dies vom Grad der Polymerisation abhängig ist und Dimere und Oligomere aktiver als Monomere sind. Schon 1963 wurde eine Hemmung des Wachstums verschiedener Bakterien bewiesen (Pourrat *et al.*, 1963).

Dokumentierte klinische Studien über die Wirkungen der Tormentilla liegen jedoch kaum vor. Volodina *et al.* konnten eine Linderung eines Lichen planus der Mundschleimhaut zeigen (Volodina *et al.*, 1997). Eine Studie aus St. Petersburg untersuchte die Wirkung der Tormentilla auf durch Rotaviren verursachte Diarrhoe bei Kindern. Tormentilla verkürzte die Zeit der Durchfälle gegenüber Placebo von fünf auf drei Tage (Subbotina *et al.*, 2003). Im Rahmen einer Studie der Ambulanz für Naturheilverfahren an der Universitätsklinik Freiburg wurde eine Verbesserung der Symptome bei der chronisch entzündlichen Colitis ulcerosa durch tormentillahaltige ratioGAST®-Kapseln erzielt (mündliche Mitteilung Dr. R. Huber). In Tierversuchen wurde eine antisekretorische Wirkung bei experimentell erzeugter Diarrhoe nachgewiesen, die wahrscheinlich auf einer Wechselwirkung mit bakteriellen Toxinen beruht (Scholz, 1994).

Außer Magenbeschwerden und Erbrechen bei empfindlichen Personen, wahrscheinlich durch den hohen Gerbstoffanteil ausgelöst, treten bei innerlichen Anwendung von Blutwurz Zubereitungen keine Nebenwirkungen auf (Schulz, 2004 [b]). Kontraindikationen sind ebenfalls keine bekannt (Kraft, 2000 [c]). Kontaktsensibilisierungen durch Tormentilla wurden bisher nicht beschrieben (Augustin, 2004 [d]).

Dermatologische Untersuchungen hinsichtlich der Wirkung eines Blutwurzextraktes bei Entzündungen der Haut liegen unseren Wissens nicht vor.

1.7. Zielsetzung

Übergeordnetes Ziel dieser Arbeit stellt die Suche nach pflanzlichen Alternativen zur Therapie von entzündlichen Hauterkrankungen dar, im Optimalfall zur Ergänzung oder zum möglichen Ersatz von kortisonhaltigen Externa.

Die in 1.6. beschriebenen fünf Pflanzenextrakte (Anserina, Rosmarin, Salbei, Usnea und Tormentilla) sollen auf eine mögliche antiinflammatorischen Wirksamkeit untersucht werden.

Um eine Grundlage für den Einsatz der Pflanzenextrakte im UV-B-Modell festzulegen, muss zuvor in Vorversuchen eine geeignete Bestrahlungsintensität und Inkubationsdauer bestimmt werden. Ziel ist es das UV-B-Modell für die Testung der Pflanzenextrakte auf ihr antiinflammatorisches Potential zu optimieren.

Zunächst wird Wert auf eine Untersuchung der Zytotoxizität der Pflanzenextrakte gelegt. Die Zellen werden mikroskopisch begutachtet und die LDH-Konzentrationen in den Überständen bestimmt.

Die antiinflammatorische Wirkung der Pflanzenextrakte soll durch zellfreie und zellbasierte *in vitro*- (alle Extrakte) und *in vivo*- (Tormentillaextrakt) Experimente untersucht werden. Die Extrakte sollen im zellfreien COX-Inhibitor-Screening-Assay auf eine mögliche Reduktion der Aktivität der COX-2 getestet werden. Anhand der PGE₂-Konzentration und COX-2-Expression sollen die Wirkungen der Extrakte in Zellkultur analysiert werden. Für die *in vitro*-Untersuchungen mit HaCaT-Zellen wird das UV-B-Modell angewandt, für *in vivo*-Untersuchungen wird dieses mit dem Saugblasen-Modell kombiniert. Im Rahmen des Saugblasen-Modells soll hier vor allem die Evaluation der Methode im Vordergrund stehen.

2. Material & Methoden

2.1. HaCaT-Zelllinie⁴

Aus dem Ursprung der Zellen und den ursprünglichen Kulturbedingungen leitet sich der Name **HaCaT** ab (Human adult skin keratinocytes, low Calcium [0,2 mM], high Temperature [38,5 °C]). Sie wurde 1988 von der Arbeitsgruppe Boukamp *et al.* des Krebsforschungsinstituts Heidelberg gewonnen und untersucht (Boukamp *et al.*, 1988). Die HaCaT-Zelllinie entstammt dem Sicherheitsabstand eines Operationspräparates eines malignen Melanoms eines 62jährigen Mannes. Sie wurde somit aus histologisch gesunder, humaner, adulter Haut gewonnen.

In vitro immortalisierten die Zellen spontan. Dies stellt unter humanen Keratinozyten einen seltenen Vorgang dar, wobei bisher nur wenige Fälle beschrieben worden sind (Baden *et al.*, 1987; Boukamp *et al.*, 1988).

HaCaT-Zellen behalten ihre vollständige Differenzierungsfähigkeit auch nach zahlreichen Passagen (>140) bei und verbleiben nicht tumorös. Dieses ausgeprägte Differenzierungspotential zeigt sich darin, dass als Transplantat auf Nacktmäusen aufgebracht, sich eine vollständig strukturierte Epidermis ausbildet (Baden *et al.*, 1987; Boukamp *et al.*, 1988).

Die Zellen wachsen adhärent und sehen in konfluenter Kultur wie gepunktete, bläuliche Pflastersteine aus. Tote Zellen finden sich im Medium frei schwimmend und abgerundet.

2.2. Zellkulturarbeit

Medien und Lösungen der Zellkulturarbeit:

Als Kulturmedium⁹⁰ wurde *Dulbecco-modified-minimum-essential-Medium* (DMEM)⁵¹ mit Zusatz von 1% Glutamin (2mM)⁵⁸, 1% Penicillin/Streptomycin-Lösung⁷¹ und 10% fetalem Kälberserum (*Fetal bone serum* = FBS, Serum)⁵⁷ als Quelle von Lipiden und Wachstoffsstoffen verwendet. Glutamin, eine essentielle Aminosäure, ist nach Zugabe zu Fertigmedien meist nicht stabil und wurde aus diesem Grunde supplementiert. Ein so genanntes Magermedium⁹¹, das alle Zusätze des Kulturmediums außer FBS enthält, wurde innerhalb der Versuche verwendet, um eine Beeinflussung durch Bestandteile des Serums zu vermeiden. Alle Waschschrte und einige Verdünnungsreihen wurden mit 1x *Phosphate Buffered Saline*-Waschpuffer (PBS)⁷⁰ durchgeführt. Zur

⁴ Die Ziffern beziehen sich auf nähere Angaben zur verwendeten Zelllinie, Materialien, Lösungen und Puffer, sowie Geräte mit Produktinformationen beziehungsweise Herstellerangaben im Anhang (siehe 7.3.)

Ablösung der Zellen während der Passagierung wurde Trypsin-Ethylendiamintetraessigsäure⁸¹ (Trypsin-EDTA) verwendet.

Subkultivierung der HaCaT-Zellen:

Bei allen Arbeiten im Rahmen der Zellkultur wurde auf steriles Arbeiten (unter sterilem Abzug¹³) geachtet. Die Kulturbedingungen im Brutschrank¹² betragen 37 °C und 5% CO₂ bei 90% relativer Luftfeuchtigkeit. Je nach Bedarf wurden die Stammkulturen in Zellkulturflaschen Typ 1 (175 cm³/750 ml)³⁹ bzw. Typ 2 (75 cm³/250 ml)⁴⁰ kultiviert. Alle Lösungen der Zellkulturarbeit wurden vor Benutzung auf Raumtemperatur erwärmt. Bevor ein konfluenten Zellrasen erreicht wurde, erfolgte die Subkultivierung der Zellen. Das Kulturmedium wurde abgesaugt und mit PBS nachgespült, um Zelltrümmer zu entfernen. Damit die adhärennten HaCaT-Zellen passagiert und für Versuche gewonnen werden konnten, wurden sie mit Trypsin-EDTA für ca. 5 min im Brutschrank inkubiert. Die durch Trypsin-EDTA bewirkte Ablösung der Zellen wurde makroskopisch wie mikroskopisch beobachtet und verifiziert. Durch den im serumhaltigen Kulturmedium enthaltenden Proteaseinhibitor Antitrypsin wurde die Reaktion des Trypsin-EDTA und damit dessen peptische Wirkung gestoppt und die abgelösten Zellen konnten nun geerntet und weiterverarbeitet werden. Die Zellsuspension wurde abpipettiert, die Kulturfläche mit PBS gewaschen und beide Lösungen in ein *Blue Cap*-Gefäß (Volumen 50 ml)²⁴ gegeben. Nach Auffüllung der Zellsuspension mit PBS und Resuspension wurde zweimal bei 4 °C und 1200 Umdrehungen pro Minute (UpM) für 5 min zentrifugiert¹⁷. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet in 5 ml Kulturmedium resuspendiert. Mit Hilfe einer Neubauer Zählkammer³³ wurden die Zellen gezählt, wobei eine Verdünnung der Zellsuspension mit Trypanblaulösung⁹² hergestellt wurde. Dieser Azofarbstoff, kann eine zerstörte, nicht jedoch eine intakte Plasmamembran permeieren und bindet an zytosolische Proteine. Durch diese Methode lassen sich beim Ermitteln der Zellzahl tote (erscheinen blau) von lebenden (bleiben farblos) Zellen unterscheiden. Multiplikationsfaktoren für die Berechnung der Zellzahl waren der Durchschnitt der Zellzahl pro vier Großfelder, der Kammerfaktor (10⁴), der Verdünnungsfaktor sowie das Resuspensionsvolumen (in ml). Die Zellen wurden für die Weiterführung der Zellkultur oder für Experimente in Kulturflaschen oder Petrischalen überführt. In Zellkulturflaschen Typ 1 wurden 5 Mio. HaCaT-Zellen in 20 ml und in Typ 2 wurden 9 Mio. in 50 ml ausplattiert. Für die verschiedenen

Experimente wurden in die Petrischalen Typ 1 (Durchmesser 6 cm)³⁴ 1 Mio. HaCaT-Zellen in 3 ml Kulturmedium beziehungsweise in die Petrischalen Typ 2 (Durchmesser 10 cm)³⁵ 4,5 Mio. in 9 ml überführt. In 6-*well*-Platten³² wurden pro *well* 0,2 Mio. HaCaT-Zellen in 1,5 ml ausgesät.

Nach einigen Stunden adhärten die Zellen wieder an der Unterlage. Im Durchschnitt wurde ein subkonfluent bis konfluent Zellrasen nach zwei bis drei Tagen erreicht.

Kryokonservierung von HaCaT-Zellen:

Auch stabile Zelllinien machen mit der Zeit marginale Veränderungen durch. Durch mögliche Kontaminationen (z.B. mit Mykoplasmen) können Zellkulturen außerdem zerstört beziehungsweise unbrauchbar werden. Um ein langfristiges Arbeiten mit der HaCaT-Zelllinie sicher zu stellen, wurden von frühen Passagen tiefgefrorene Reserven angelegt. Diese kryokonservierten Zellen lassen sich in flüssigen Stickstofftanks bei -196°C relativ unbeschränkt konservieren. Kritisch ist das Einfrieren und Auftauen der Zellen. Um Schäden zu vermeiden, wurden die Zellen in Gegenwart eines Frostschutzmittels, hier Dimethylsulfoxid (DMSO)⁵², eingefroren. Dimethylsulfoxid verhindert die Ausbildung von Eiskristallen, durch die die Zellen zerstört werden. Zu beachten ist, dass die Abkühlung besonders langsam (stufenweise), das Auftauen jedoch schnell erfolgen sollte.

HaCaT-Zellen, die eingefroren werden sollten, wurden vor dem Einfriermodus auf Mykoplasmen getestet. Nach Ermittlung der Zellzahl und nach erneuter Zentrifugation (4°C, 1200 UpM, 5 min) wurde das Pellet mit 1 ml Dimethylsulfoxid pro 10⁶ Zellen resuspendiert. Die Suspension wurde aliquotiert und für ein bis zwei Tage bei -80°C gelagert und nachfolgend in einen Stickstofftank überführt.

Um Zellen aufzutauen, wurden die Kryoröhrchen³⁰ im Wasserbad erwärmt und durch Zugabe von Kulturmedium (temperiert auf Raumtemperatur) langsam resuspendiert, bis die Zellen komplett aufgetaut waren. Daraufhin wurde zentrifugiert (4°C, 1200 UpM, 5 min) und das Pellet mit 5 ml Kulturmedium resuspendiert. Die aufgetauten Zellen wurden in einer Zellkulturflasche des Typ 1 überführt und mit Kulturmedium kultiviert. Die erste Passage der Zellen erfolgt nach zwei bis drei Tagen.

Mykoplasmentestung:

Zellkulturarbeit ist nur unter keimfreien Bedingungen durchführbar. Mögliche Kontaminationen sind Bakterien, Viren, Pilze oder Protozoen, sowie eine Verunreinigung durch eine andere Zelllinie. Die wichtigsten Maßnahmen sind das Verwenden von sterilen Medien und Kulturgefäßen, Arbeiten unter einem sterilen Abzug, regelmäßige Händedesinfektion sowie Verwendung von Antibiotika in den Medien. Von besonderer Bedeutung bei der Zellkulturarbeit ist eine Kontamination mit Mykoplasmen (v.a. *M.hyorhina*, *M.laitlawii*, *M.arginini*, *M.ovale*) (Darin et al. 2003).

Diese Bakterien besitzen keine Zellwand und sind 100 bis 800 nm groß und nicht ultrafiltrierbar. Gegen die oft verwendeten Antibiotika Penicillin und Streptomycin sind sie daher nicht sensibel. Infektionsquellen können Rinderserum (v.a. *M.hyorhina*, *M.laitlawii*, *M.arginini*), Laborpersonal (*M.ovale*) und andere mit Mykoplasmen infizierte Zellkulturen sein. Mit bloßem Auge sind sie nicht sichtbar. Die Zellkultur verändert ihre Erscheinung meist erst bei massivem Befall. Mykoplasmen wachsen in der Regel langsam und zerstören die Wirtszelle nicht. Sie können jedoch auf Charakteristika der Zelle wie das Wachstum (Verlangsamung), den Stoffwechsel, die Morphologie und die Lebensfähigkeit (Zellen können getötet oder lysiert werden) Einfluss nehmen.

In regelmäßigen Abständen sowie vor jeder Kryokonservierung wurden die Zellkulturen mit Hilfe des Mykoplasmen-*Detection-Kit* von Roche⁸⁶ getestet.

Das Testprinzip basiert auf der *ELISA*-Technik. Polyklonale Antikörper weisen hierbei die am meist verbreiteten Spezies nach. Die Bestimmung der einzelnen Spezies wird getrennt durchgeführt. Zuerst werden Antikörper an einer Mikrotiterplatte fixiert. Unspezifische Bindungen werden mit einer Blockierungslösung gesättigt. In einem zweiten Schritt binden die Antigene einer Probe an die fixierten Antikörper. Es wird Kulturmedium, der zu untersuchenden Kultur, das mindestens zwei Tage alt sein muss, untersucht. Nun wird fixiertes Antigen durch einen Biotin-gekoppelten Antikörper markiert. Streptavidin-Alkalische Phosphatase bindet im vierten Schritt an Biotin. Die im Komplex gebundene Streptavidin-Alkalische Phosphatase wird durch enzymatische Umsetzung von 4-Nitrophenylphosphat als Substrat visualisiert. Das Signal ist der Mykoplasmen-Konzentration proportional und kann makroskopisch oder mit einem *ELISA-Reader* (Sirius HT-TRF)¹⁹ bestimmt werden. Ergebnisse der kontinuierlichen Mykoplasmentestung sind nicht angegeben.

2.3. Cyclooxygenaseaktivität im zellfreien COX-Inhibitor-Screening-Assay

In einem ersten Schritt wurde im COX-Inhibitor-Screening-Assay von *Cayman Chemical Company*⁸⁴⁺⁸⁵ die Hemmung der COX durch Pflanzenextrakte gemessen. Mit diesem Assay konnte wahlweise die Aktivität der COX-1 oder COX-2 nachgewiesen werden. Im Rahmen der Experimente wurde die Aktivität der COX-2 untersucht. In diesem Assay konnten auch oxidative Substanzen eingesetzt werden. Der COX-Inhibitor-Screening-Assay beruht auf der Messung der Konzentration von $\text{PGF}_{2\alpha}$, welches durch die Reduktion von $\text{PGH}_{2\alpha}$ durch Selenchlorid (SnCl_2) durch die COX-1/2 entsteht. Die $\text{PGH}_{2\alpha}$ -Konzentration wurde durch einen *Enzyme Immunoassay (EIA)*⁸⁴⁺⁸⁵ mit Hilfe eines spezifischen Antikörpers, der an Prostaglandin-Komponenten bindet, bestimmt. Als Kontrolle diente der nichtsteroidaler Entzündungshemmer Indometacin⁶³, ein kompetitiver Hemmstoff der Arachidonsäurebindungsstelle. Das Inhibitionsvermögen der eingesetzten Extrakte und der Kontrolle Indometacin wurde mit der 100%igen COX-2-Initialaktivität verglichen.

Der Assay wurde nach den Anweisungen des Herstellerprotokolls durchgeführt und ausgewertet.

2.4. UV-B-Modell

Das UV-B-Modell wurde wie in 1.4. beschrieben sowohl *in vitro* als auch *in vivo* durchgeführt. Zur Bestrahlung der HaCaT-Zellen und der Hautfelder der Probanden wurde eine Breitspektrum UV-B-Lichtquelle verwendet (UV 800, Waldmann Medizin Technik)¹¹. Die Bestrahlungsdauer berechnet sich aus dem Quotienten der gewünschten Dosis und dem Durchschnittswert des UV-B-Gerätes, wobei dieser bei der verwendeten UV-B-Quelle 2,3 mW/cm² betrug.

Die Zellen wurden je nach Ansatz mit 15, 30, 60 oder 120 mJ/cm² bestrahlt. Eine optimale Bestrahlungsintensität und Inkubationszeit nach UV-B-Bestrahlung wurde anhand von Vorversuchen ermittelt (siehe 3.2.).

Die Probanden wurden anhand ihres Hauttypus mit einer individuellen Intensität bestrahlt. Es wurde auf Daten und Erfahrungswerte aus vorhergehenden klinischen Studien zur Auswahl der Intensität zurückgegriffen (erhoben in der Hautklinik Freiburg i. Br. in den Jahren 2003/2004 von der Arbeitsgruppe von Prof. Schempp). Der lokale Reiz sollte weder zu stark noch zu mild ausgeprägt sein.

2.5. Versuchsaufbau und Kontrollen

Bei den erfolgten Experimenten wurden Pflanzenextrakte auf ihre antiinflammatorische Wirkung untersucht. Von jeder eingesetzten Konzentration eines Pflanzenextraktes wurden je zwei Ansätze untersucht, wobei neben jedem unbestrahlten Ansatz ein mit 30 mJ/cm^2 bestrahlter Ansatz existierte. Um die Ergebnisse mit Zusatz von Pflanzenextrakten mit der physiologischen PGE_2 -Produktion und COX-2-Expression vergleichen zu können, wurden zu jedem Versuchsansatz parallel Kontrollen untersucht. Die Basalproduktion wurde jeweils mit und ohne Bestrahlung sowie mit und ohne Inkubation von Arachidonsäure (AA)⁴⁶ ermittelt. Eine unbestrahlte und eine bestrahlte Kontrolle bildeten ein Kontrollpaar. Das Kontrollpaar 2 wurde jeweils mit $30 \text{ }\mu\text{M}$ AA inkubiert. In der folgenden Abb. 8 ist die Aufteilung der Kontrollen mit ihren Abkürzungen, die in dieser Arbeit verwendet worden sind, zu entnehmen.

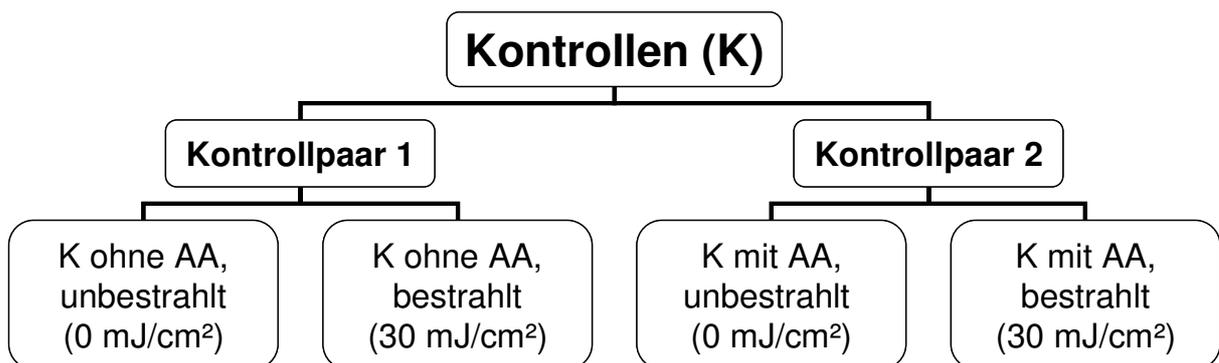


Abb. 8: Schema der Kontrollen (K). Im Rahmen der Versuche mit Pflanzenextrakten wurden parallel zu jedem Ansatz vier Kontrollen untersucht. Je eine unbestrahlte und bestrahlte Kontrolle bilden ein Kontrollpaar. Kontrollpaar 1 beinhaltet: „K ohne AA, unbestrahlt“ und „K ohne AA, bestrahlt“. Kontrollpaar 2 beinhaltet: „K mit AA, unbestrahlt“ und „K mit AA, bestrahlt“.

Im Laufe der Untersuchungen wurden drei Versuchsreihen durchgeführt. Zu den Ansätzen wurden in der Versuchsreihe 1 (V-1) zu drei verschiedenen Zeitpunkten Pflanzenextrakte hinzugegeben (24 h und 1 h vor Bestrahlung und direkt nach Bestrahlung). Bei den nachfolgenden Experimenten wurde auf die zweite Zugabe von Pflanzenextrakten (1 h vor der Bestrahlung) verzichtet, da Ergebnisse der Arbeitsgruppe von Prof. Schempp (Ergebnisse nicht veröffentlicht) zeigten, dass dadurch die Zytotoxizität erhöht werden kann. Ziel war es, diese so gering wie möglich zu halten.

V-1 beinhaltete zwei Kontrollpaare und zwei Paare mit Zusatz des jeweiligen Extraktes in zwei verschiedenen Konzentrationen. Zu drei Zeitpunkten wurden Extraktverdünnungen hinzugegeben.

Innerhalb der Versuchsreihen 2 und 3 (V-2 und V-3) wurden pro Pflanzenextrakt zwei Kontrollpaare und fünf Paare mit Pflanzenextraktzugabe in abgestuften Verdünnungen beziehungsweise Konzentrationen untersucht. Die Zugabe der Extrakte fand 24 h vor und direkt nach Bestrahlung statt.

Für V-2 wurden in 6-*well*-Platten 0,2 Mio. HaCaT-Zellen in 1,5 ml Medium ausplattiert, wobei für V-1 und V-3 in Petrischalen (Typ 1) 1 Mio. HaCaT-Zellen in 3 ml ausplattiert wurde. Die Kultivierung der Zellen und Gewinnung der Überstände ist den Abschnitten 2.2., 2.6. und 2.10.1. zu entnehmen. Abweichungen bei der Handhabung der Herstellung der Proben sind im Ergebnisteil gesondert angegeben.

Wie in den Abschnitten 2.8., 2.9. und 2.10. beschrieben, wurden die LDH-Aktivitäten, PGE₂-Konzentrationen und gegebenenfalls die Expression der COX-2 bestimmt.

2.6. Probengewinnung zur PGE₂-Bestimmung

Für die PGE₂-Konzentrationmessung wurden bei Gebrauch von 6-*well*-Platten³² pro *well* 0,2 Mio. HaCaT-Zellen in 1,5 ml, bei Petrischalen Typ 1 wurden 1 Mio. in 3 ml Kulturmedium ausgesät. Sobald sich ein subkonfluenten Zellrasen entwickelt hatte, wurden die Petrischalen für Versuche verwendet. Das Medium wurde entfernt und der Zellrasen mit PBS gewaschen. Danach erfolgte die Zugabe von Medium ohne Serum. Je nach Fragestellung des Experimentes wurden zu den Ansätzen die Pflanzenextrakte in verschiedenen Konzentrationen gegeben. Nach 24 h Inkubation im Brutschrank wurde das Medium entfernt und die Zellen mit PBS gewaschen. Während der Zeit der Bestrahlung wurden die Zellen mit PBS bedeckt, damit sie nicht austrockneten, und auf Eis gelagert. Jeder Versuchsansatz wurde in zwei Hälften geteilt, so dass zu jedem bestrahlten ein unbestrahlter Ansatz existierte. Nach erfolgter Bestrahlung wurde das PBS aller Petrischalen entfernt und 1,5 ml oder 3 ml Kulturmedium mit oder ohne Zusatz von Pflanzenextrakten hinzugefügt. Nach einer Inkubation über 24 h wurde jeder Ansatz, außer den spezifischen Kontrollen, mit 30 µM Arachidonsäure (AA) versetzt und für 15 min im Brutschrank inkubiert. Die Inkubation mit AA führt zu einer Augmentation der Effekte.

Nach Entnahme der Überstände wurden diese zentrifugiert (4°C, 1200 UpM, 5 min), um Zellreste zu eliminieren. Die Überstände wurden aliquotiert, mit flüssigem

Stickstoff schockgefroren und bei -80°C bis zur Messung gelagert. Von jedem Überstand wurde vor dem Einfrieren die LDH (Laktatdehydrogenase)-Konzentration des Ansatzes bestimmt. Diese Toxizitätsbestimmung wurde am Anfang bei allen Pflanzenextrakten durchgeführt (siehe 2.8.2.). Alle Ansätze wurden zudem sowohl vor als auch nach der Bestrahlung mikroskopisch beurteilt (siehe 2.8.1.).

2.7. Stammlösungen der verwendeten Pflanzenextrakte

Nach einem Screening von unterschiedlichen Pflanzenextrakten (im Rahmen eines Arbeitsprojektes der Arbeitsgruppe von Prof. Schempp, Universitätshautklinik Freiburg i. Br. - experimentell und klinisch in den Jahren 2003-2004) wurden in dieser Arbeit fünf verschiedene, kommerziell erwerbliche Pflanzenextrakte untersucht. Es handelt sich um Extrakte der Pflanzen *Potentilla anserina* L.⁵, *Rosmarinus officinalis* L.⁶, *Salvia officinalis* L.⁷, *Usnea barbata* L.⁹ und *Potentilla tormentilla* (L.) Raeuschel⁸. Je nach Extraktionsverfahren lagen die Extrakte als CO₂-, Trocken- und Fluidextrakte vor. Die Angaben der Hersteller enthielten Informationen über das Droge-Extrakt-Verhältnis, das Ausgangsmaterial, das Auszugsmittel, die weitere Verarbeitung und den Gehalt wichtiger Inhaltsstoffe. Im Rahmen einer vorherigen Promotionsarbeit von S. Weckesser wurden optimale Lösungsmittel der Stammlösungen untersucht (Weckesser 2006).

Die Extrakte wurden in unterschiedlichen Konzentrationen eingesetzt. Je nach Experiment wurden verschiedene Verdünnungen der Stammlösungen mit PBS durchgeführt. Die Lösungsmittel wurden in ihrer höchsten eingesetzten Konzentration (z.B. Ethanol 70%⁵⁵) auf Toxizität und Beeinflussung der Experimente in Vorversuchen geprüft (Daten nicht gezeigt).

Der Anserinaextrakt wurde aus getrocknetem Gänsefingerkraut hergestellt und als 12%iger Fluidextrakt verwendet. Hauptbestandteile sind Gerbstoffe.

Der verwendete Rosmarinextrakt wurde aus getrockneten Rosmarinblättern hergestellt und enthält vor allem Diterpenphenole (ca. 14%), wobei Carnosolsäure die Hauptkomponente darstellt.

Aus getrocknetem blühendem Salbeikraut wurde der Salbeiextrakt hergestellt. Er enthält hauptsächlich Diterpenphenole (ca. 35%), wobei auch in diesem Extrakt die Carnosolsäure die Leitsubstanz darstellt.

Der aus getrockneten Bartflechten hergestellte Usneaextrakt ist ein auf 4% Usninsäure standardisierter CO₂-Extrakt. Der Gehalt an anderen Flechtensäuren,

meist Derivate der Usninsäure, liegt bei lediglich 0,1%. In der folgenden Abb. 9 ist der durch die Firma HWI Analytik hergestellte so genannte „*fingerprint*“ des Usneaextraktes dargestellt. Er zeigt, dass Usninsäure die Hauptkomponente des Extraktes darstellt.

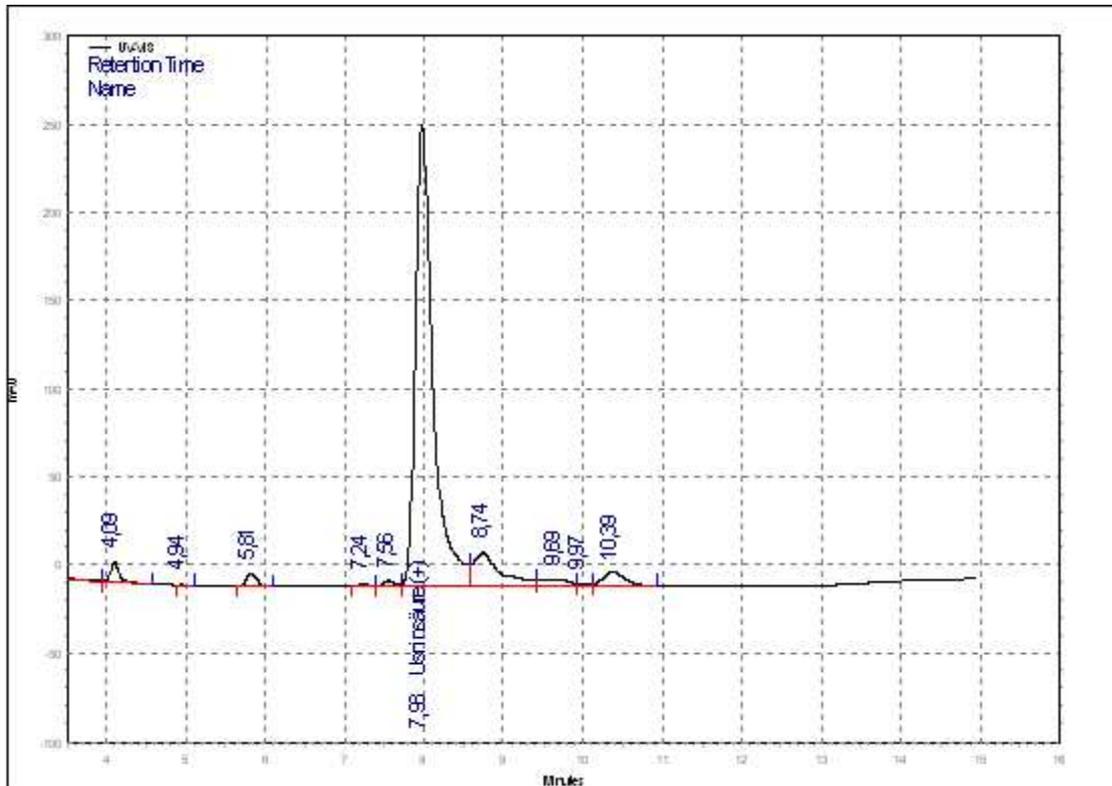


Abb. 9: „*fingerprint*“ des Usneaextraktes. Die Auftrennung des Usneaextraktes erfolgte mittels Chromatographie. Es zeigt sich ein ausgeprägter *Peak* bei 7,98 min, der der Usninsäure entspricht.

Der in dieser Arbeit verwendete Tormentilla-Gesamtextrakt aus getrockneten Wurzeln enthält vor allem Gerbstoffe. Aufgrund der sehr starken Effekte des Tormentilla-Gesamtextraktes in den ersten Versuchen wurde dieser ausführlicher als die anderen Extrakte untersucht. Die Firma HWI Analytik konnte mittels des HPLC-Verfahrens (*High-Performance-Liquid-Chromatography*) den Extrakt in vier Fraktionen auftrennen. Fraktion 1 enthält hauptsächlich Zuckermoleküle. In Fraktion 2 dominieren monomere Gerbstoffe, wohingegen in Fraktion 3 hauptsächlich oligomere Gerbstoffe enthalten sind. Nach weiteren viel versprechenden Ergebnissen der Fraktion 4, die hauptsächlich polymere Gerbstoffe enthält, wurde diese wiederum durch das gleiche Verfahren in vier Unterfraktionen aufgetrennt. Insgesamt wurden neun, in ihren Zusammensetzungen unterschiedliche Extrakte der

Tormentilla untersucht. In der folgenden Abb. 10 ist die Systematik der Fraktionen und Unterfraktionen dargestellt.

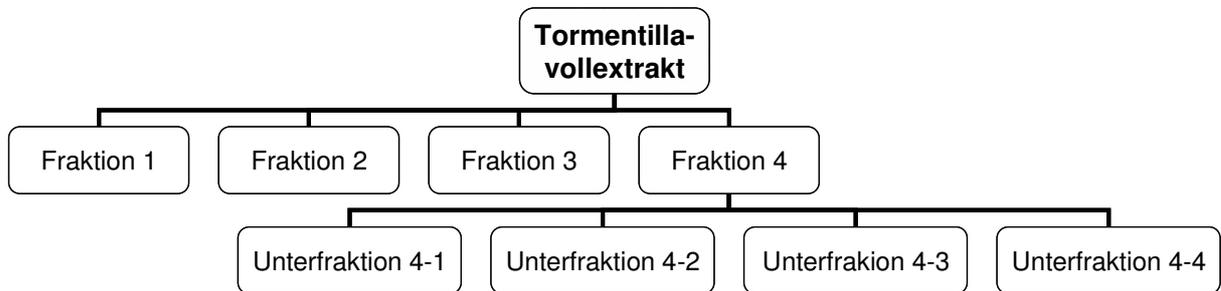


Abb. 10: Systematik der Tormentillaextrakte. Der Tormentilla-Gesamtextrakt wurde in vier Fraktionen aufgetrennt (Fraktion 1, 2, 3, 4). Die Fraktion 4 wurde wiederum in vier Unterfraktionen aufgetrennt (Unterfraktion 4-1, 4-2, 4-3, 4-4).

Zudem wurden durch die Firma HWI-Analytik ein so genannter „fingerprint“ der Tormentilla-Extrakte hergestellt. In Abb. 11 ist der „fingerprint“ der Fraktion 4 dargestellt. Den größten Ausschlag stellt Agrimoniin dar. Dieses ist laut HWI-Analytik in Fraktion 4 zu 51% enthalten und stellt somit die Hauptkomponente dar.

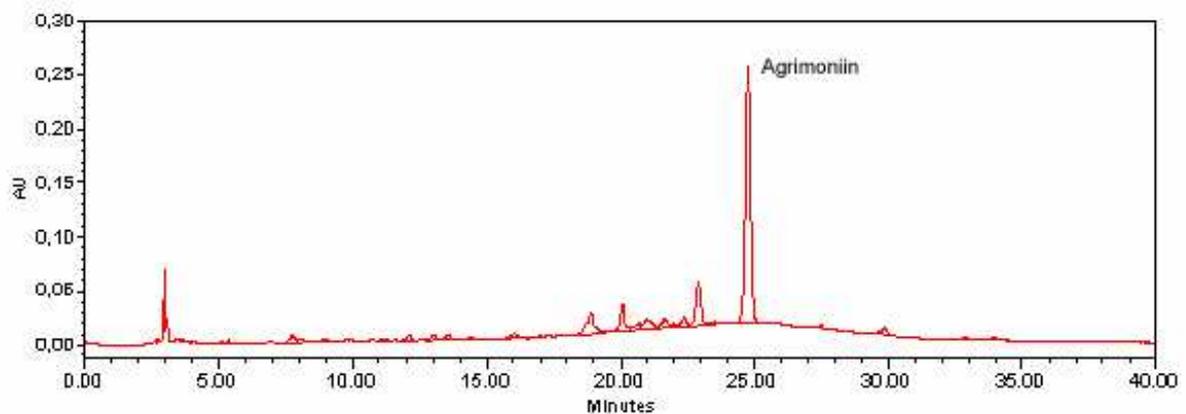


Abb. 11: „fingerprint“ der Fraktion 4 des Tormentilla-Gesamtextraktes. Die Auftrennung der Fraktion 4 erfolgte mittels Chromatographie. Es zeigt sich ein ausgeprägter *Peak* bei 25 min, der Agrimoniin entspricht.

2.8. Toxizitätsprüfung

Die Toxizitätsprüfung fand qualitativ (mikroskopische Begutachtung¹⁵) und quantitativ (LDH-Konzentration der Ansätze) statt. Es wurde von jedem Pflanzenextrakt anhand der Bestimmung der LDH-Konzentration seine Toxizität auf die Zellen bestimmt, um Verfälschungen der Experimente durch Eigentoxizität auszuschließen.

2.8.1. Mikroskopische Begutachtung

Innerhalb jeden Versuches wurden die Ansätze 1 h vor und 24 h nach der Bestrahlung mit UV-B mikroskopisch begutachtet. Die Zellen wurden anhand ausgewählter Kriterien im Verhältnis zu ihrem normalen Aussehen (Kontrollen) beurteilt. Es wurde die Farbe (normal, abgeblasst, dunkel, bläulich, bräunlich), Zellform (normal, abgerundet, Ausläufer, Einschlüsse), Zelltrümmer (keine bis viele), Dichte des Zellrasens (subkonfluent, konfluent, nur noch Inseln von Zellen), Größe der Zellen (normal, groß, klein), Menge an toten Zellen im Medium (keine, wenige, viele) und das Aussehen der Zellen subjektiv bestimmt.

2.8.2. Laktatdehydrogenase (LDH)-Messung

Es existieren fünf verschiedene Isoenzyme der LDH, die als Katalysatoren für die Umwandlung von Laktat in Pyruvat und umgekehrt dienen. Zellen enthalten in ihrem Zytosol eine Vielzahl an Enzymen. Während der Apoptose werden diese Enzyme durch die Membranzerstörung in die Umgebung, zum Beispiel das Kulturmedium abgegeben. Nach Zellschädigung ist es im Kulturmedium als relativ stabiles Enzym in ausreichender Menge detektierbar und gibt somit Aufschluss über den Grad der Zellschädigung. Eine Unterscheidung, ob die Zellen durch Nekrose oder Apoptose durchlässig geworden sind, ist dadurch jedoch nicht möglich.

Bei den Experimenten wurde die Messung der LDH-Aktivitäten (Mira-Analysegerät¹⁶) mit Hilfe des klinischen Labors der Universitätshautklinik Freiburg im Breisgau durchgeführt.

In den Ansätzen mit Zusatz von Pflanzenextrakten wurde darauf geachtet, dass die eingesetzten Pflanzenextrakte möglichst nicht toxisch auf die Zellen wirkten. Um eine Toxizität der untersuchten Extrakte auszuschließen, wurde in den ersten Versuchen mit Hilfe der Überstände die LDH-Konzentration bestimmt. In Folgeversuchen wurde teilweise auf eine weitere Bestimmung verzichtet.

2.9. PGE₂-ELISA

Zur Messung der Prostaglandin E₂ (PGE₂)-Konzentration in den Zellüberständen wurde der PGE₂-*High-Sensitivity-Immunoassay* von R&D⁸⁷ verwendet. Mit diesem Assay kann die Konzentration von PGE₂ in Serum, Plasma, Urin, Speichel, Zellkulturen (Überstände) oder anderen biologischen Flüssigkeiten quantitativ bestimmt werden.

Es handelt sich um einen kompetitiven Enzym-*Immunoassay*. Der Assay basiert auf einem Wettbewerb zwischen einer fixen Menge an alkalische Phosphatase gekoppelten PGE₂ und der PGE₂-Konzentration der Probe um einen monoklonalen Mausantikörper. Die Mikrotiterplatte, die mit Anti-Maus-Antikörpern beschichtet ist, bindet den F_c-Teil des monoklonalen Mausantikörpers. Sowohl phosphatiertes PGE₂ als auch PGE₂ der Probe binden nun an den F_{ab}-Teil des Mausantikörpers. Das ungebundene Substrat wird entfernt und eine Substratlösung dazugegeben, um die Enzymaktivität zu messen. Bei 405 nm wird die Farbentwicklung gemessen. Die Farbtintensität ist invers proportional zur Konzentration des PGE₂ der Probe.

Gemessene Zellkulturüberstände wurden zentrifugiert (4 °C, 1200 UpM, 5 min), bevor sie im Assay eingesetzt wurden. Der Assay wurde nach den Anweisungen des Herstellers durchgeführt und ausgewertet.

2.10. Bestimmung der COX-2 mittels *Western Blot*-Technik

2.10.1. Probengewinnung zur COX-2-Detektion

HaCaT-Zellen wurden in Petrischalen (Typ 2)³⁵ in einer Dichte von 4,5 Mio. Zellen pro 9 ml Kulturmedium ausgesät und kultiviert bis zur Subkonfluenz. Das Medium wurde abpipettiert und die Petrischalen mit PBS gewaschen. Zu den Petrischalen wurde Magermedium⁹¹ (9 ml) hinzugefügt. Je nach Ansatz wurden Pflanzenextrakte in den angegebenen Konzentrationen dazugegeben. Alle Ansätze wurden für weitere 24 h im Brutschrank inkubiert. Zur Vorbereitung der Bestrahlung mit UV-B wurde wie bei der Probengewinnung zur PGE₂-Bestimmung verfahren (siehe 2.6.). Jeder Ansatz wurde geteilt und zu jeder bestrahlten Petrischale existierte eine unbestrahlte Kontrolle. Nach 24 h Inkubation wurden die dafür vorgesehenen Ansätze für 15 min mit 30 µM AA inkubiert. Darauf folgte die mechanische Entfernung der Zellen von der Unterfläche durch einen Zellschaber⁴¹. Die Zellen wurden mit ihrem Medium in ein *Blue Cap*-Gefäß (Volumen 15 ml)²³ überführt. Es folgte eine erste Zentrifugation bei 4 °C und 1200 UpM für 10 min. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet mit 1

ml eiskaltem 1 mM Natriumorthovanadat⁶⁸ in PBS resuspendiert. Nach einer weiteren Zentrifugation unter gleichen Bedingungen wurde der Überstand verworfen und das Pellet mit 100 µl eiskaltem Lysepuffer⁹³ resuspendiert und für 10 min auf Eis lysiert. Danach wurde für 15 min bei 4000 UpM und 4°C zentrifugiert und der Überstand anschließend in Eppendorfgefäße (Volumen 1,5 ml)³⁷ überführt und mittels der Ultrazentrifuge²⁰ für weitere 15 min bei 4000 UpM und 4°C zentrifugiert. Eine quantitative Proteinmessung (siehe 2.10.2.) folgte und die Proben wurden bis zum Einsatz im *Western Blot* bei -80°C gelagert.

2.10.2. Proteinquantifizierung mittels *Bicin choninic acid*-Test (BCA-Test)

Mit Hilfe des *BCA Protein Assay Kit* von Pierce⁸³ wurde der Proteingehalt der Proben (in µg/ml) quantifiziert, um gleiche Mengen an Protein im Rahmen der Gelelektrophorese laden zu können. Es wurde die ml-Menge berechnet, die 30 µg Protein enthielt.

Der BCA-Test beruht auf einer Farbreaktion. Im alkalischen Milieu reduzieren reduktive Gruppen des Proteins Kupfer (Cu)²⁺-Ionen zu Kupfer (Cu)⁺-Ionen. Mit je zwei BCA-Molekülen formen Kupfer (Cu)⁺-Ionen einen Farbkomplex, dessen Absorption bei 562 nm gemessen werden kann. Hierbei handelt es sich um die Biuret-Reaktion (Smith *et al.*, 1985).

Der BCA-Test wurde nach den Anweisungen des Herstellers durchgeführt und ausgewertet, wobei das Herstellerprotokoll der 96-well-Bestimmung verwendet wurde.

2.10.3. SDS-Gelelektrophorese und *Immunoblot* (*Western Blot*)

Mit der *Sodium Dodecyl Sulfat Polyacrylamid-Gelelectrophoresis* (SDS-PAGE) wurden Proteine größenabhängig elektrophoretisch getrennt und anschließend im *Western Blot* dauerhaft auf einer Membran fixiert.

Daraufhin erfolgte die Detektion des gesuchten Proteins (COX-2). Durch einen spezifischen Antikörper konnte die COX-2 aus dem Proteingemisch identifiziert und nachgewiesen werden. Die Bande wurde aufgrund eines Größenstandards^{44, 53 bzw. 73} zugeordnet.

Je nach Zusammensetzung des Gels wird ein unterschiedlich großes Netzwerk gebildet. Kleinere Proteine wandern im Gel schneller als größere. Das Gel dient damit als Molekularsieb. Die Proteine wandern aufgrund ihrer Ladung in Richtung der

Anode. Bei dem diskontinuierlichen Lauf passieren die Proteine zuerst ein Sammelgel, dadurch werden sie zu einer scharfen Bande fokussiert. Erst im Trenngel erfolgt die eigentliche Auftrennung aufgrund einer kleineren Porengröße und der Änderung des pH-Wertes.

Es wurden stets zwei Gele parallel mit den gleichen Proben geladen. Bei einem Gel wurde die COX-2 detektiert, das zweite Gel diente als Kontrolle, wobei im Kontroll-*Blot* die Protein Actin oder HDAC-2 als ubiquitäre Bestandteile der Zellen nachgewiesen wurde.

Es wurden jeweils gleiche Mengen (30 µg/ml), des Proteingemisches jedes Ansatzes geladen. Die Polyacrylamidgele bestanden aus Trenn- und Sammelgel (Rezeptur der Gele siehe 7.3., Tabelle 8).

Vorbereitung der Proben für die Elektrophorese:

Die Proben wurden mit (2x Laemmli)-*Sample-Puffer*⁹⁴ versetzt, um eine Denaturierung der Proteine zu erreichen. Es wurde die gleiche µl-Anzahl in der 30 µg/ml des Proteingemisches der Probe enthalten war an (2x Laemmli)-*Sample-Puffer* hinzugegeben, so dass dieser auf 1x verdünnt wurde. Zuvor waren die Disulfidbrücken der Proteine bereits durch den Lysepuffer, β-Mercaptoethanol (enthalten im [2x Laemmli]-*Sample-Puffer*) reduziert und die Proteine durch die Erwärmung im Wärmeblock²¹ (für 6 min bei 95°C) denaturiert worden. SDS⁷⁷ als anionisches Detergens führt nicht nur dazu, dass die höheren Proteinstrukturen verloren gehen sondern überdeckt vorhandene Eigenladungen der Proteine vollständig, so dass ihre elektrophoretische Beweglichkeit allein von der Größe des Proteins abhängt und damit direkt proportional zu ihrer Molekülmasse ist.

Die TWIN-M-Elektrophoresekammer¹⁸ wurde mit (1x Laemmli)-Elektrophorese-Puffer⁹⁵ gefüllt und die Proben und Molekularmarker mit Hilfe einer Hamiltonspritze²⁷ in die Geltaschen gefüllt. Die Laufbedingungen der Elektrophoresekammer betragen 50 mA bei Durchlauf der Proteine durch das Sammelgel und 100 mA beim Trenngel, wobei als Grenzen 600 V und 300 W gesetzt wurden.

Proteintransfer:

Unmittelbar im Anschluss wurden die Proteine auf eine Polyvinyliden-Fluorid-Membran (PVDF-Membran)³¹ elektrophoretisch transferiert. In die mit (1x)-*Western Blot-Puffer*⁹⁷ gefüllten Kammer²² wurde der *Blot*, bestehend aus Gel, Membran,

feuchtem Filterpapier²⁵ und Schwämmen, so platziert, dass die durch das SDS negativ geladenen Proteine, vom Gel in Richtung Membran in Richtung Pluspol wandern konnten. Der Proteintransfer wurde nach einer 1 h beendet. Die Versuchsparameter waren 60 V (als limitierender Faktor), 300 W und maximal 1000 mA.

Antikörperreaktion:

Nach dem Proteintransfer wurde die Membran für eine Stunde in einer 5%igen Milchpulver⁶⁴-TBST-Puffer (*Tris-Buffered Saline Tween-20*)⁹⁹-Lösung hybridisiert, um unspezifische Bindungsstellen für Antikörper auf der Membran abzusättigen. Darauf folgten vier Waschschrte mit TBST-Puffer und die Membran wurde über Nacht mit einer frischen Milchpulverlösung (5% Milchpulver-TBST-Lösung), die den primären Antikörper (COX-2-⁵⁰ [1:1000], bzw. Actin-⁴³ [1:1000] bzw. HDAC-2-Antikörper⁶¹ [1:3000]) zur Detektion des jeweiligen Proteins enthielt, inkubiert.

Durch erneute Waschschrte mit TBST-Puffer wurden überschüssige Antikörper, die keine Antigen-Antikörper-Bindung eingegangen waren, entfernt. Anschließend erfolgte die Inkubation mit dem sekundären Antikörper⁷⁴ bzw. ⁷⁵ für 2 h. Diese waren gegen das F_C-Teil des Erstantikörpers gerichtet und zur Detektion an das Enzym Meerrettich-Peroxidase gekoppelt. Die hier verwendeten sekundären Antikörper wurden in einer 5%igen Milchpulver-TBST-Lösung im Verhältnis 1:5000 verdünnt. Durch TBST-Puffer wurde die Membran von überflüssigen sekundären Antikörpern befreit.

Chemilumineszenzreaktion:

Für die Chemilumineszenzreaktion wurde die Membran für 5 min in *ECL-Plus-Western-blot-detection*-Lösung von Amersham⁵⁴ (Herstellung der Lösung nach Anleitung des Herstellers) inkubiert. In der Dunkelkammer erfolgte die Detektion der Lichtreaktion mit einem Röntgenfilm (Hyperfilm)²⁸⁺²⁹. Je nach Signalstärke wurde die Belichtungszeit des Filmes variiert.

2.11. Saugblasen-Modell

2.11.1. Durchführungsentention

Nach der Untersuchung der Extrakte *in vitro* wurde der potenteste Extrakt exemplarisch im Saugblasen-Modell untersucht. Seine antiinflammatorische Wirkung sollte *in vivo* anhand der PGE₂-Konzentration in den Saugblasenflüssigkeiten überprüft werden.

2.11.2. Ethikkommission und Probandenanforderung

Der Antrag der hausinternen Studie „Untersuchung der Wirksamkeit eines Tormentillaextraktes auf die UV-B induzierte Zytokin- und Prostaglandinproduktion im Saugblasen-Modell“ wurde durch die Ethikkommission Freiburg geprüft und positiv bewertet. Mit der Studie wurde nach Vorliegen des positiven Votums begonnen.

Freiwillige Probanden, die die Einschlusskriterien erfüllten, wurden nach Aufklärung und Einverständniserklärung in die Studie aufgenommen. Bei ihnen wurde eine Anamnese im Hinblick auf Ein- und Ausschlusskriterien erhoben. Die Einschlusskriterien waren ein Alter der Probanden zwischen 18 und 59 Jahren, sowie intakte, gesunde Haut ohne Zeichen einer manifesten Hauterkrankung. Ausschluss-Kriterien stellten akute sowie chronische Hauterkrankungen, insbesondere akute und therapiebedürftige Neurodermitis, bekannte Allergien, konsumierende Erkrankungen, Drogen- oder Alkoholabusus, Infektionen, Schwangerschaft, Stillzeit, gleichzeitige Anwendung lokaler oder systemischer Kortikosteroide und Teilnahme an anderen Studien innerhalb der letzten 30 Tagen dar.

2.11.3. Ablauf des Saugblasen-Experimentes

Ein Versuch erstreckte sich über zwei Tage. An Tag 1 wurden an den Unterarmnenseiten mit Hilfe einer Lederschablone links und rechts zwei Felder markiert. In den vier Feldern wurde die natürliche Hautrötung (Erythemindex) bestimmt. Für die Messung des Erythemindexes wurde das Mexameter MX16 von Courage&Khazaka¹⁴ mit einem Absorptionsspektrum bei 550 und 660 nm eingesetzt (siehe Abb. 12). Diese Wellenlängen entsprechen etwa den Hauptabsorptionsspitzen von Hämoglobin. Die Spezialsonde sendet drei genau definierte Wellenlängen aus. Der Empfänger in der Sonde misst das von der Haut reflektierte Licht.

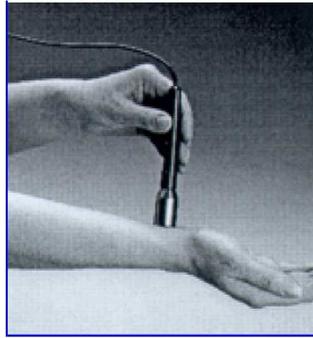


Abb. 12: Mexametersonde

Die Messwerte werden vereinfacht nach folgender Formel als Index berechnet:

$$EX (\text{Erythem}) = 500 / \log x 5 \times (\log \text{Infrarot-Reflektion} / \text{Rot-Reflektion} + \log 5)$$

Es wurden von jedem Feld drei Werte gemessen und aus ihnen ein Mittelwert errechnet. Unter Miteinbeziehung des individuellen Hauttypus und mit Hilfe von Erfahrungswerten der Arbeitsgruppe von Prof. Schempp aus vorherigen Studien wurde die Bestrahlungsdosis bestimmt. Mit dieser Intensität wurden drei der vier Felder bestrahlt, wobei das unbestrahlte Feld als Kontrolle diente. Die Felder wurden mit den Testsubstanzen unterschiedlich behandelt beziehungsweise unbehandelt belassen. Als Salbengrundlage diente die Basiscreme DAC⁴⁷ (Deutscher-Arzneimittel-Codex). Ihre Bestandteile sind 4% Glycerolmonostearat 60, 6% Cetylalkohol, 7,5% mittelkettige Triglyceride, 25,5% weiße Vaseline, 7% Macrogol-1000-Glycerolmonostearat, 10% Propylenglykol und 40% Wasser. Der Tormentillaextrakt (Unterfraktion 4-3) wurde kurz vor dem Versuch in die Basiscreme DAC in einer Endkonzentration von 5% eingearbeitet. Nach Auftragen einer erbsengroßen Menge auf die Markierungen wurden diese mit Testkammern (*Finn chambers* von Epitest²⁶) abgedeckt und 24 h belassen. An Tag 2 wurde erneut der Erythemindex der Felder gemessen und die Saugnäpfe³⁶ wurden mit Unterdruck auf den markierten Feldern gesetzt (siehe Abb. 13). Dieser Unterdruck wurde durch ein Lungenabsauggerät¹⁰ erzeugt und von diesem konstant auf 50 kPa gehalten. Nachdem kleine Bläschen entstanden sind, wurde der Druck langsam auf 60 kPa gesteigert.

Eine univakuoläre Saugblase entwickelte sich unter kontinuierlichen Sog innerhalb von drei bis vier Stunden. Die Blasenerzeugung bewirkte zunächst multiple kleine Bläschen, die im Laufe der Zeit zu einer großen Blase konfluieren. Nach der Bildung dieser großen Blase wurde der Unterdruck beendet und die Saugnäpfe vorsichtig

entfernt. Mit einer sterilen Nadel wurde die Blasenflüssigkeit vorsichtig entnommen, aliquotiert und mit flüssigem Stickstoff schockgefroren. Die PGE₂-Konzentration der Blasenflüssigkeit wurde mittels PGE₂-ELISA⁸⁷ untersucht.

Die verursachte Erosion wurde mit Tegaderm-Pflaster³⁸ behandelt und den Probanden wurde geraten, die Hautstellen vor übermäßiger Sonneneinstrahlung zu schützen. Aufgrund der nur oberflächlich gelegenen Wunden verheilen diese ohne Narben, jedoch können Hyperpigmentierungen entstehen (Gupta *et al.*, 2000).



Abb. 13: Saugblasenerzeugung: Ein Saugnapf wird auf der Unterarminnenseite aufgesetzt und mit dem Lungenabsauggerät verbunden. Durch den Sog kommt es zur Ausbildung einer Blase.

3. Ergebnisse

Im Rahmen dieser Arbeit wurden die Pflanzenextrakte Anserina, Rosmarin, Salbei, Usnea und Tormentilla auf ihre antiinflammatorischen Eigenschaften untersucht. Durch den zellfreien COX-Inhibitor-Screening-Assay erfolgte eine Voruntersuchung dieser Extrakte. Anschließend wurden sie im Zellmodell näher untersucht.

3.1. Zellfreie Assays

Zunächst wurden die oben genannten Extrakte im COX-Inhibitor-Screening-Assay (siehe 2.3.) in unterschiedlichen Konzentrationen eingesetzt, um ihre Wirkung auf die COX-2 zu untersuchen. Indometacin diente als Positivkontrolle. Verglichen wurden die Ergebnisse mit der 100%igen Initialaktivität der COX-2.

3.1.1. Anserina im COX-Inhibitor-Screening-Assay

Es wurden insgesamt fünf verschiedene Konzentrationen des Anserinaextraktes eingesetzt (0,075; 0,15; 0,3; 0,6 und 1,2 mg/ml). Als Kontrolle diente Indometacin in den Konzentrationen 1 und 10 μM . In der Abb. 14 sind die $\text{PGF}_{2\alpha}$ -Konzentrationen der mit Anserina behandelten Ansätze sowie die Kontrollen dargestellt. Indometacin hemmte dosisabhängig die COX-2-Initialaktivität. Bei einer Konzentration von 1 μM wurde die Konzentration an $\text{PGF}_{2\alpha}$ um 73%, bei 10 μM um 97% verringert.

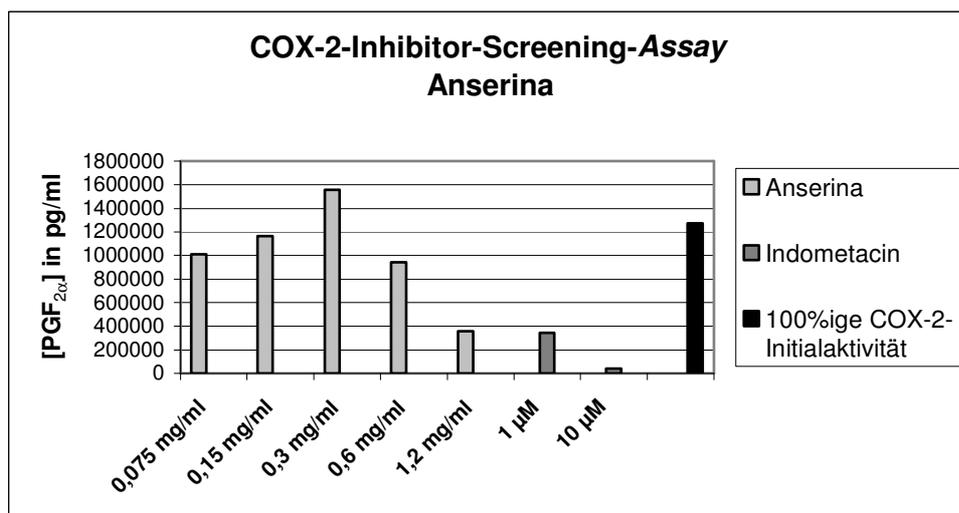


Abb. 14: Anserinaextrakt zeigt im COX-Inhibitor-Screening-Assay nach anfänglicher Steigerung eine Hemmung der 100%igen Initialaktivität der COX-2 ab einer Konzentration von 0,6 mg/ml. Der Assay misst direkt $\text{PGF}_{2\alpha}$, indem PG-Komponenten von einem spezifischen Antikörper gebunden werden, welcher anschließend durch einen *EIA* quantifiziert wird. Die gemessenen $\text{PGF}_{2\alpha}$ -Konzentrationen unter Einfluss des Anserinaextraktes (0,075 bis 1,2 mg/ml) wurden mit der 100%igen Initialaktivität der COX-2 verglichen. Als Kontrolle diente Indometacin in den Konzentrationen 1 μM und 10 μM .

Mit Steigerung der Konzentration des Anserinaextraktes von 0,075 bis 0,3 mg/ml steigerte sich die gemessene COX-2-Aktivität, wobei der Extrakt in niedrigen Konzentrationen kaum Einfluss auf die COX-2-Aktivität zeigte. Erst Konzentrationen des Anserinaextraktes von 0,6 und 1,2 mg/ml vermochten eine Hemmung der COX-2-Aktivität zu erreichen. Bei einer Konzentration von 1,2 mg/ml konnte durch den Anserinaextrakt der Level der 1 μ M Indometacin-Kontrolle erreicht werden.

3.1.2. Rosmarin im COX-Inhibitor-Screening-Assay

Acht verschiedene Konzentrationen des Rosmarinextraktes (0,0008; 0,0016; 0,0031; 0,0063; 0,0125; 0,025; 0,05 und 0,1 mg/ml) wurden in diesem Versuch untersucht. Indometacin diente als Kontrolle, wobei es in einer Konzentration von 1 μ M die Aktivität der COX-2 um 73% und die Konzentration von 10 μ M die Aktivität sogar um 97% hemmen konnte (siehe Abb. 15).

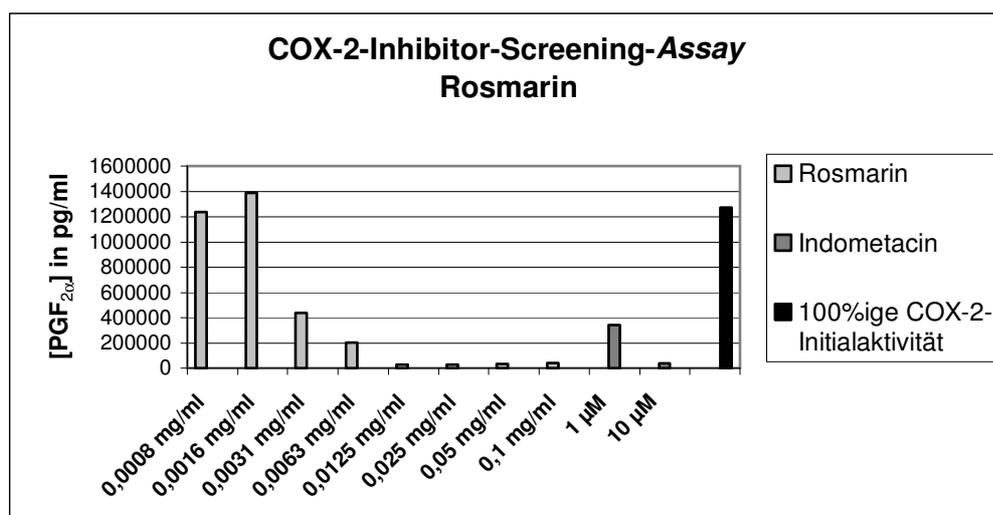


Abb. 15: Rosmarin zeigt im COX-Inhibitor-Screening-Assay eine ausgeprägte Inhibition der 100%igen Initialaktivität der COX-2 ab einer Konzentration von 0,0031 mg/ml. Der Assay misst direkt $\text{PGF}_{2\alpha}$, indem PG-Komponenten von einem spezifischen Antikörper gebunden werden, welcher anschließend durch einen *EIA* quantifiziert wird. Die gemessenen $\text{PGF}_{2\alpha}$ -Konzentrationen unter Einfluss des Rosmarinextraktes (0,0008 bis 0,1 mg/ml) wurden mit der 100%igen Initialaktivität der COX-2 verglichen. Als Kontrolle diente Indometacin in den Konzentrationen 1 μ M und 10 μ M.

Die gemessenen $\text{PGF}_{2\alpha}$ -Konzentrationen unter Einfluss von Rosmarinextrakt lagen bis auf eine (0,0016 mg/ml) alle unter dem Wert der 100%igen Initialaktivität der COX-2. Die Konzentrationen 0,0008 und 0,0016 mg/ml zeigten keinen eindeutigen Effekt auf die COX-2-Aktivität, die sich sogar bis auf 11% erhöhte. Ab einer Konzentration von 0,0031 bis 0,1 mg/ml ließ sich eine dosisabhängige Inhibition der

COX-2-Aktivität zeigen. So kam es bei einer Konzentration von 0,0031 mg/ml zu einer Hemmung der $\text{PGF}_{2\alpha}$ -Konzentration von 75%. Bei 0,0063 mg/ml lag die gemessene Initialaktivität unter dem Niveau der Indometacin-Kontrolle von 1 μM . Ab einer Konzentration des Rosmarinextraktes von 0,0125 mg/ml lagen die gemessenen $\text{PGF}_{2\alpha}$ -Konzentrationen auf dem Level der Indometacin-Kontrolle von 10 μM . Höhere Konzentrationen des Extraktes bewirkten keine weitere Steigerung des Effektes.

3.1.3. Salbei im COX-Inhibitor-Screening-Assay

Der Salbeixtrakt wurde in fünf Konzentrationen (0,0063; 0,0125; 0,025; 0,05 und 0,1 mg/ml) eingesetzt. Die Positivkontrolle Indometacin in den zwei Konzentrationen von 1 μM und 10 μM hemmten die COX-2 dosisabhängig (siehe Abb. 16). Indometacin in einer Dosierung von 1 μM resultierte in einer 73%igen, 10 μM in einer 97%igen Reduktion der Konzentration an $\text{PGF}_{2\alpha}$.

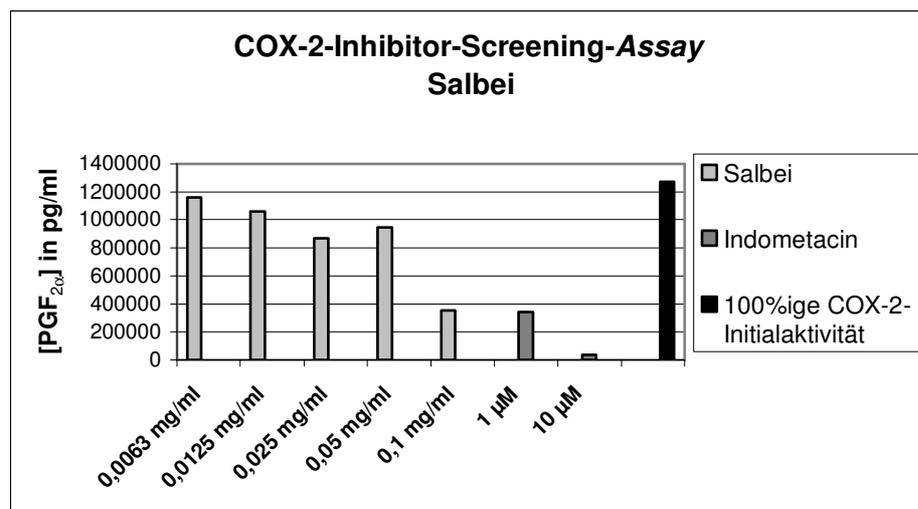


Abb. 16: Salbei zeigte im COX-Inhibitor-Screening-Assay eine annähernd dosisabhängige Inhibition der COX-2 (Ausnahme: Salbei 0,05 mg/ml). Der Assay misst direkt $\text{PGF}_{2\alpha}$, indem PG-Komponenten von einem spezifischen Antikörper gebunden werden, welcher anschließend durch einen *EIA* quantifiziert wird. Die gemessenen $\text{PGF}_{2\alpha}$ -Konzentrationen unter Einfluss des Salbeixtraktes (0,0063 bis 0,1 mg/ml) wurden mit der 100%igen Initialaktivität der COX-2 verglichen. Als Kontrolle diente Indometacin in den Konzentrationen 1 μM und 10 μM .

Alle Ansätze mit Salbeixtrakt verringerten die COX-2-Initialaktivität, wobei ein annähernd dosisabhängiger Effekt zu beobachten war (Ausnahme: Salbei 0,05 mg/ml). Die höchste eingesetzte Konzentration des Salbeixtraktes (0,1 mg/ml) ließ eine Verringerung der $\text{PGF}_{2\alpha}$ -Konzentration auf das Niveau der Indometacin-Kontrolle (1 μM) erkennen.

3.1.4. Usnea im COX-Inhibitor-Screening-Assay

Der Einfluss des Usneaextraktes wurde in drei verschiedenen Konzentrationen (0,3125; 0,625 und 1,25 mg/ml) untersucht. Wie in den vorherigen Versuchen wurde Indometacin als Kontrolle eingesetzt und zwar in den Konzentrationen von 0,1 μM und 10 μM (siehe Abb. 17).

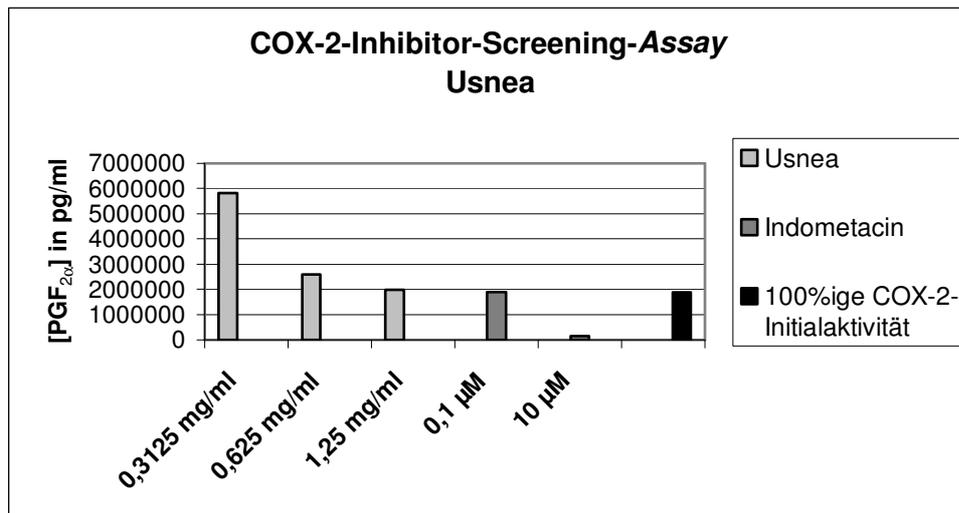


Abb. 17: Usnea zeigt im COX-Inhibitor-Screening-Assay keine Inhibition der 100%igen Initialaktivität der COX-2. Eine dosisabhängige Reduktion von PGF_{2α} ist jedoch zu verzeichnen. Der Assay misst direkt PGF_{2α}, indem PG-Komponenten von einem spezifischen Antikörper gebunden werden, welcher anschließend durch einen *EIA* quantifiziert wird. Die gemessenen PGF_{2α}-Konzentrationen unter Einfluss des Usneaextraktes (0,3125 bis 1,25 mg/ml) wurden mit der 100%igen Initialaktivität der COX-2 verglichen. Als Kontrolle diente Indometacin in den Konzentrationen 0,1 μM und 10 μM .

Allein Indometacin 10 μM führte zu einer Reduktion der COX-2-Initialaktivität (82%). Weder Indometacin in einer Konzentration von 0,1 μM noch die eingesetzten Konzentrationen des Usneaextraktes zeigten einen hemmenden Effekt auf die 100%ige Initialaktivität der COX-2. Die PGF_{2α}-Konzentrationen reduzierten sich unter dem Einfluss des Usneaextraktes zwar dosisabhängig, sie lagen jedoch über der der COX-2-Initialaktivität.

3.1.5. Tormentilla im COX-Inhibitor-Screening-Assay

Die Wirkung des Tormentilla-Gesamtextraktes wurde in acht verschiedenen Konzentrationen (0,0078; 0,0156; 0,0313; 0,0625; 0,125; 0,25; 0,5 und 1 mg/ml) untersucht. Als Positivkontrollen diente wie zuvor Indometacin in den

Konzentrationen 1 und 10 μM . Die 100%ige COX-2-Initialaktivität wurde durch Indometacin 1 μM um 73% und durch 10 μM um 97% reduziert (siehe Abb. 18).

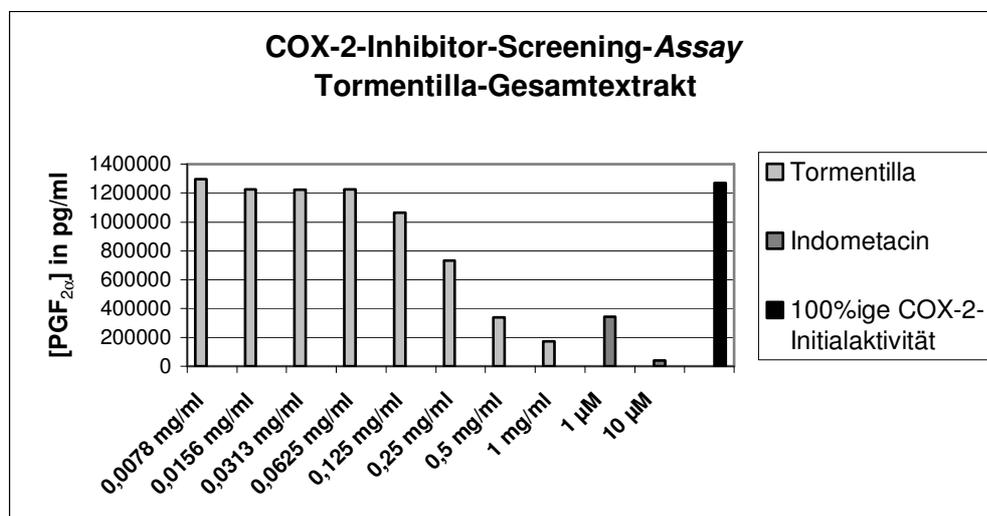


Abb. 18: Tormentilla-Gesamtextrakt hemmte im COX-Inhibitor-Screening-Assay die 100%ige Initialaktivität der COX-2 ab einer Konzentration von 0,125 mg/ml dosisabhängig. Der Assay misst direkt PGF_{2α}, indem PG-Komponenten von einem spezifischen Antikörper gebunden werden, welcher anschließend durch einen EIA quantifiziert wird. Die gemessenen PGF_{2α}-Konzentrationen unter Einfluss des Tormentilla-Gesamtextraktes (0,0078 bis 1 mg/ml) wurden mit der 100%igen Initialaktivität der COX-2 verglichen. Als Kontrolle diente Indometacin in den Konzentrationen 1 μM und 10 μM .

Bei allen eingesetzten Konzentrationen des Tormentilla-Gesamtextraktes außer bei 0,0078 mg/ml (2% erhöht) lagen die PGF_{2α}-Werte unterhalb der 100%igen Initialaktivität der COX-2. Der Tormentilla-Gesamtextrakt hemmte ab einer Konzentration von 0,125 mg/ml dosisabhängig die Aktivität der COX-2. Durch die Konzentration 0,5 mg/ml wurde der Level der Indometacin-Kontrolle von 1 μM erreicht. Eine Konzentration von 1 mg/ml reduzierte die 100%ige COX-2-Initialaktivität um 86%.

3.2. Vorversuche: Bestrahlungsintensitäten und Abnahmezeitpunkte

Die im COX-Inhibitor-Screening-Assay untersuchten Pflanzenextrakte wurden nun im zellbasierten Modell untersucht. Es wurde überprüft, ob sie eine Reduktion der inflammatorischen Reaktion von HaCaT-Zellen nach UV-B-Bestrahlung bewirken können. Vor Beginn der Messungen in zellbasierten Versuchen war es notwendig, für die Durchführung des UV-B-Modells die optimale Bestrahlungsintensität und den idealen Zeitpunkt für die Abnahme der Zellkulturüberstände zu bestimmen. Um das Modell für die Fragestellung dieser Arbeit zu optimieren, wurden in Vorversuchen

sowohl verschiedene Bestrahlungsintensitäten als auch verschiedene Inkubationszeiten (Zeitkinetik) geprüft. Auf der Basis dieser Ergebnisse wurden die Rahmenbedingungen der Experimente mit Pflanzenextrakten festgelegt.

3.2.1. Bestimmung der Bestrahlungsintensität

Bei vier unterschiedlichen Bestrahlungsintensitäten (15, 30, 60 und 120 mJ/cm²) wurden jeweils die PGE₂-Konzentration und die COX-2-Expression im Vergleich zu zwei unbestrahlten Kontrollen ermittelt. In Petrischalen Typ 1 wurden je 1 Mio. HaCaT-Zellen in 3 ml Medium ausplattiert und wie in Abschnitt 2.2., 2.6. und 2.9. beschrieben behandelt. Die beiden Kontrollen wurden nicht bestrahlt. Die Ansätze wurden vor Entnahme der Überstände für 15 min mit Arachidonsäure (AA) inkubiert, wobei ein Kontrollansatz („K ohne AA, unbestrahlt“) nicht mit AA versetzt wurde.

In der Abb. 19 sind die von HaCaT-Zellen produzierten PGE₂-Konzentrationslevel bei unterschiedlichen Bestrahlungsintensitäten gezeigt. Der Versuch wurde viermal wiederholt, wobei die gleichen Tendenzen bei geringfügigen Schwankungen der Ergebnisse zu beobachten waren. Die gemessenen Basalkonzentrationen von PGE₂ befanden sich auf einem niedrigen Niveau, wobei sich die Kontrolle „K ohne AA, unbestrahlt“ unterhalb der Nachweisgrenze (781,25 pg/ml) befand. Durch die Zugabe von AA, als direktes Substrat der COX-2 konnte sie um mindestens 55% gesteigert werden.

Die UV-B-Bestrahlung bis zu einer Dosis von 60 mJ/cm² bewirkte eine dosisabhängige Steigerung der PGE₂-Konzentration. Die Konzentration bei 15 mJ/cm² war im Vergleich zur Kontrolle „K mit AA, unbestrahlt“ um den Faktor 12 erhöht. Von 15 auf 30 mJ/cm² fand eine Verdreifachung der PGE₂-Konzentration statt. Bei einer Intensität von 60 mJ/cm² erhöhte sich die Menge an PGE₂ im Verhältnis zu 30 mJ/cm² um 36%. Durch die Bestrahlungsintensität 120 mJ/cm² sank die PGE₂-Konzentration wieder in einen ähnlich hohen Bereich wie bei 15 mJ/cm².

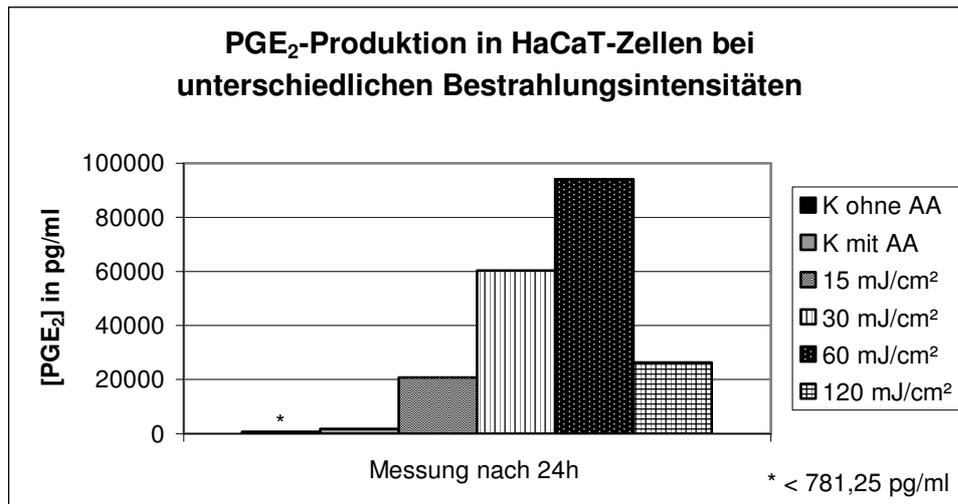


Abb. 19: Nach Steigerung der Intensität der UV-B-Bestrahlung von HaCaT-Zellen ist eine dosisabhängige Steigerung der PGE₂-Konzentrationen zu verzeichnen. Die Zellen wurden unterschiedlichen Bestrahlungsintensitäten (15-120 mJ/cm²) ausgesetzt (siehe Legende). Zur Messung der Basalkonzentration an PGE₂ dienten die zwei unbestrahlten Kontrollen („K ohne AA“ und „K mit AA“). Alle Ansätze bis auf „K ohne AA“ wurden vor Entnahme der Überstände für 15 min mit 30 µM Arachidonsäure (AA) inkubiert. Die PGE₂-Konzentrationen wurden mittels *ELISA* (Doppeltbestimmung) gemessen.

Mikroskopisch wurde bei einer Steigerung der Bestrahlungsintensität ein vermehrtes Zellsterben beobachtet. Es kam zu einer dosisabhängigen Vermehrung von abgestorbenen, frei im Medium schwimmenden Zellen und sich abrundenden, noch haftenden Zellen. Zwischen den Intensitäten 30 und 60 mJ/cm² waren nur geringfügige Unterschiede zu verzeichnen. Wohingegen sich bei 120 mJ/cm² viele Zellen, teilweise sogar ganze Zellverbände, von der Unterfläche ablösten.

Des Weiteren wurde der Einfluss der Bestrahlungsintensitäten auf der Ebene des COX-2-Proteins untersucht, welches ebenfalls durch UV-B-Bestrahlung verstärkt exprimiert wird. Mit einer Lysatmenge, die 30 µg/ml Protein enthielt, wurde nach einer elektrophoretischen Auftrennung des Lysatgemisches ein *Western Blot* durchgeführt. Der *Western Blot* zeigte eine verstärkte Expression der COX-2 (Bande bei 72 kDa) mit steigender Bestrahlungsintensität bis 60 mJ/cm². Als Ladungskontrolle diente das ubiquitär vorkommende Protein Actin (Bande bei 42 kDa). Dies zeigte sich in allen Ansätzen gleich stark exprimiert. Das Experiment wurde wie in Abschnitt 2.10. beschrieben durchgeführt. Die gewählten Intensitäten und Kontrollen sind mit denen der Ansätze der PGE₂-Messung identisch. Auf eine Bestrahlung mit 120 mJ/cm² wurde aufgrund des oben beschriebenen vermehrten Zellsterbens jedoch verzichtet. In der folgenden Abb. 20 ist die dosisabhängige Steigerung der Expression der COX-2 gezeigt.

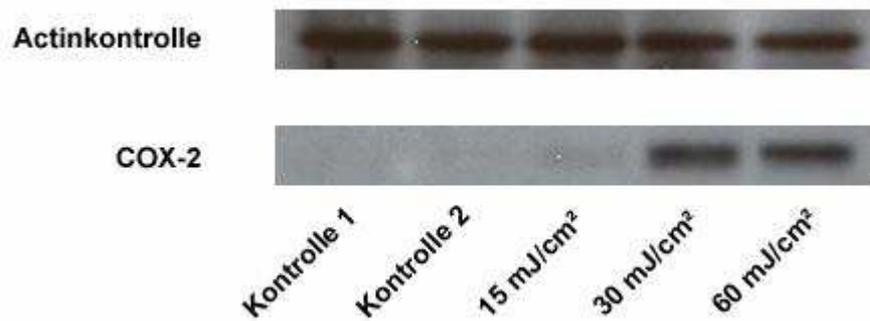


Abb. 20: In steigenden Bestrahlungsdosen von 15-60 mJ/cm² steigerte sich die Expression der COX-2 dosisabhängig. Zur Messung der Basalkonzentration an PGE₂ dienten die zwei unbestrahlten Kontrollen (Kontrolle 1 [„K ohne AA“] und Kontrolle 2 [„K mit AA“]). Alle Ansätze bis auf Kontrolle 1 wurden mit Arachidonsäure (AA) versetzt. Die Actinkontrolle wurde zum Nachweis der korrekten Ladung gleicher Mengen des Proteingemisches mitgeführt.

Durch 30 mJ/cm² zeigte sich sowohl eine Steigerung der Konzentration von PGE₂ als auch eine Steigerung der Expression der COX-2. Für alle folgenden Experimente mit Zusatz von Pflanzenextrakten wurde die Bestrahlungsintensität 30 mJ/cm² gewählt.

3.2.2. Bestimmung der Inkubationsdauer (Zeitkinetik)

Um die optimale Inkubationsdauer vor Abnahme der Überstände der Zellkultur nach UV-B-Bestrahlung zu ermitteln, wurde zu den Stunden 0, 6, 12 und 24 nach Bestrahlung der Gehalt an PGE₂ im Überstand bestimmt. Zu diesem Zweck wurden in Petrischalen Typ 1 in 3 ml Medium 1 Mio. HaCaT-Zellen ausplattiert und wie in Abschnitt 2.2., 2.6. und 2.9. beschrieben behandelt. Zu jedem Abnahmezeitpunkt wurden neben der mit 30 mJ/cm² bestrahlten Petrischale zwei unbestrahlte Kontrollen („K ohne AA, unbestrahlt“ und „K mit AA, unbestrahlt“) mitgeführt. Die bestrahlten Petrischalen und eine der Kontrollen („K mit AA, unbestrahlt“) wurden mit AA inkubiert. Die Abb. 21 zeigt die reproduzierbare, zeitabhängige Steigerung der PGE₂-Konzentration der Überstände zu den oben genannten Zeitpunkten. Der PGE₂-Gehalt der Kontrollen blieb über einen Zeitraum von 24 h bis auf geringe Schwankungen nahezu konstant. In den ersten 6 h nach Bestrahlung verdoppelte sich die PGE₂-Konzentration und nach weiteren 6 h hatte sie sich auf eine fast siebenfache Konzentration gesteigert. Eine Inkubation von 24 h resultierte in mehr als einer Verzehnfachung der Werte (Wert lag oberhalb der Nachweisgrenze von 50000 pg/ml). Unterhalb der Nachweisgrenze (390,63 pg/ml) lagen die Kontrollwerte ohne Inkubation mit AA zur Stunde 0 und 24.

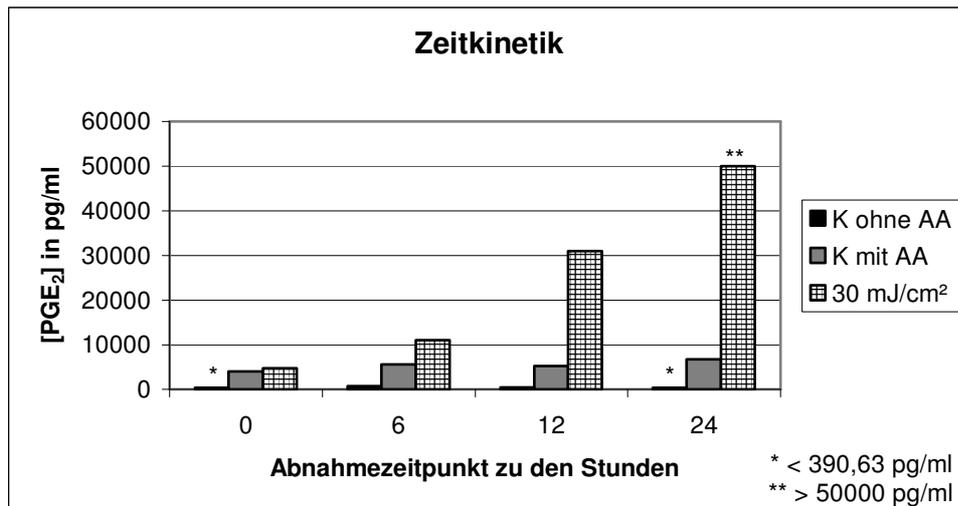


Abb. 21: PGE₂-Konzentrationen gemessen zu unterschiedlichen Zeitpunkten (Zeitkinetik). Die PGE₂-Konzentrationen steigen mit Zunahme der Inkubationsdauer kontinuierlich an. Zu jeder Stunde wurden drei Ansätze, die je aus zwei unbestrahlten Kontrollen („K ohne AA, unbestrahlt“ und „K mit AA, unbestrahlt“) und einem mit 30 mJ/cm² bestrahlten Ansatz bestanden, untersucht. Die entsprechenden Ansätze wurden für 15 min mit 30 μM Arachidonsäure (AA) inkubiert. Die PGE₂-Konzentrationen wurden mittels *ELISA* (Doppeltbestimmung) gemessen.

Mikroskopisch konnte bezüglich der Absterberate der Zellen zwischen den Inkubationszeiten 12 und 24 h kaum ein mikroskopischer Unterschied ausgemacht werden. Die Kontroll-Ansätze zeigten lediglich marginale Veränderungen im Sinne einer leichten Vermehrung toter Zellen im Medium.

Daraufhin wurde die Expressionssteigerung der COX-2 zeitabhängig untersucht. Die Behandlung der Ansätze war identisch mit der im zuvor beschriebenen Versuch. Das Proteingemisch wurde wie in Abschnitt 2.10. beschrieben gewonnen und nach elektrophoretischer Auftrennung des Lysatgemisches (je 30 μg/ml Protein) wurde die COX-2 (Bande bei 72 kDa) im *Western Blot* detektiert (hier gezeigt Stunde 12 und 24; siehe Abb. 22). Zur Stunde 0 zeigte kein Ansatz eine COX-2-Bande, wobei nach 6 h Inkubation der bestrahlte Ansatz eine marginale Bande auf Höhe der COX-2 zeigte (Daten nicht dargestellt). Das COX-2-Protein konnte 12 h nach Bestrahlung stärker detektiert werden. Nach weiteren 12 h (nach 24 h Inkubation) konnte eine weitere Steigerung der Expression der COX-2 vermerkt werden, wobei die Bande eine wesentlich stärkere COX-2-Expression als die nach 12 h aufwies. Nach 24 h stellten sich schwache Banden der beiden Kontrollen dar. Der *Blot* der Ladungskontrolle (Actinnachweis, Bande bei 42 kDa) zeigte schwache Banden, die Unterschiede in ihrer Stärke aufwiesen.

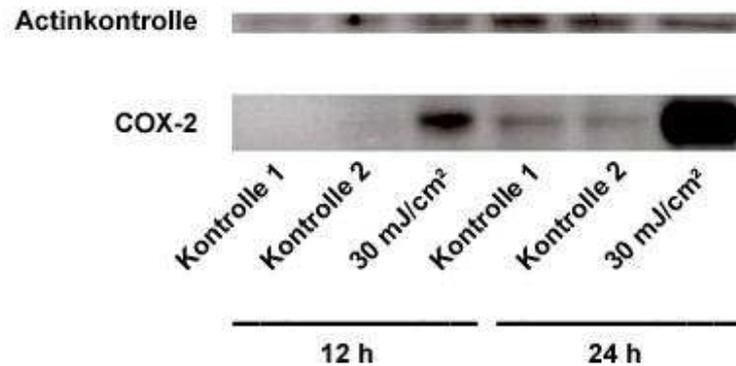


Abb. 22: Die COX-2 ließ sich nach 12 und 24 h Inkubation nach UV-B-Bestrahlung nachweisen. Durch UV-B-Bestrahlung steigert sich die COX-2-Expression zeitabhängig in HaCaT-Zellen. Zu jeder Stunde wurden drei Ansätze untersucht. Zwei Ansätze stellten Kontrollen dar, die nicht bestrahlt wurden (Kontrolle 1: „K ohne AA, unbestrahlt“ und Kontrolle 2: „K mit AA, unbestrahlt“). Ein Ansatz wurde mit 30 mJ/cm² bestrahlt. Die Kontrollen zeigten zum Vergleich die Basalkonzentration der COX-2 in nicht stimulierten Zellen an. Die Actinkontrollen wurden zum Nachweis der korrekten Ladung gleicher Mengen des Proteingemisches mitgeführt.

Nach einer Inkubationsdauer von 24 h steigerte sich sowohl die Konzentration von PGE₂, als auch die Expression der COX-2. Aufgrund dieser Vorversuche wurde für alle Experimente mit Pflanzenextrakte eine Inkubationsdauer von 24 h eingehalten.

3.3. Zellbasierte Versuche mit Pflanzenextrakten

Für die Beurteilung der antiinflammatorischen Wirkung der Pflanzenextrakte in HaCaT-Zellen wurden die Ansätze 24 h inkubiert und mit 30 mJ/cm² bestrahlt. Dabei wurden mit jedem Pflanzenextrakt drei Versuchsreihen (V-1, V-2 und V-3) durchgeführt (siehe 2.5.). In dieser Arbeit sind die Ergebnisse der V-2 exemplarisch graphisch dargestellt und die der Versuche V-1 und V-3 gesondert beschrieben. V-2 beinhaltet eine LDH- und PGE₂-Konzentrationsmessung, wobei jeder Pflanzenextrakt in fünf Konzentrationen eingesetzt wurde. Es existierten von jeder Konzentration ein unbestrahlter und ein bestrahlter Ansatz. Jeder Pflanzenextrakt-Versuch bestand insgesamt aus 14 Ansätzen. Zur Messung der Basalkonzentration an LDH und PGE₂ wurden je zwei Kontrollpaare (siehe 2.5.) untersucht. Alle Ansätze mit Zusatz eines Extraktes und ein Kontrollpaar wurden mit AA inkubiert. Weiterführend wurden die Einflüsse von Salbei, Usnea und Tormentilla-Gesamtextrakt auf die Expression der COX-2 in je vier Konzentrationen untersucht.

3.3.1. Anserina

Der Anserinaextrakt wurde in den Konzentrationen 0,0094; 0,0188; 0,0375; 0,075 und 0,15 mg/ml eingesetzt. Zu jeder Konzentration existierte neben einem bestrahlten Ansatz parallel ein unbestrahlter Ansatz. Zum Vergleich dienten zwei Kontrollpaare (siehe 2.5.) ohne Zusatz von Anserinaextrakt.

3.3.1.1. Anserina: Toxizitätsprüfung

Die unbestrahlten Kontrollansätze zeigten eine LDH-Aktivität von unter 50 U/l. Bestrahlung mit UV-B bewirkte eine Steigerung der LDH-Aktivität der Kontrollansätze auf etwa die vierfache Aktivität. Alle Aktivitäten der unbestrahlten Ansätze mit Anserinaextrakt lagen, abgesehen von geringfügigen Schwankungen, auf dem Level der Kontrollen. Durch die Bestrahlung der Ansätze mit Anserinaextrakt wurde die LDH-Aktivität ähnlich wie die Kontrollansätze von unter 50 U/l auf das Vier- bis Fünffache gesteigert, wie in Abb. 23 ersichtlich ist.

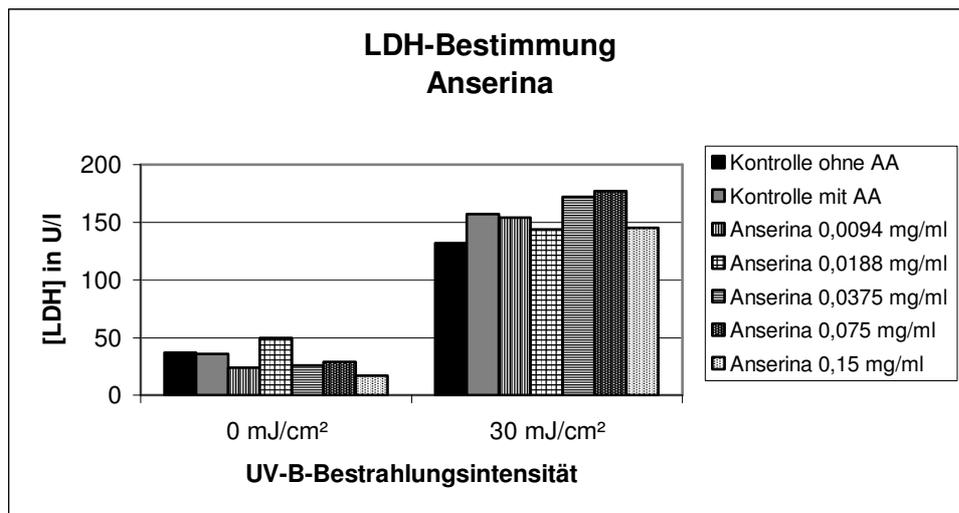


Abb. 23: Der Anserinaextrakt bewirkte keine Veränderung auf die LDH-Aktivitäten in HaCaT-Zellen nach UV-B-Bestrahlung. Unter dem Einfluss des Anserinaextraktes in fünf Konzentrationen wurde die Aktivität der LDH im Überstand ohne und mit UV-B-Bestrahlung bestimmt. Zum Vergleich wurden zwei Kontrollpaare mitgeführt: je eine Kontrolle (K) ohne und mit Arachidonsäure (AA) inkubiert, jeweils unbestrahlt und bestrahlt. Alle Ansätze außer den „K ohne AA“ wurden für 15 min mit AA inkubiert.

Die mikroskopische Begutachtung zeigte ein normales Aussehen der HaCaT-Zellen, wobei im Verhältnis zu den unbehandelten Kontrollen kein Unterschied zu erkennen war. Dies konnte bei allen Versuchsreihen (V1-V3) in gleicher Weise festgestellt werden.

3.3.1.2. Anserina: PGE₂-Bestimmung

In unbestrahlten Kontrollen sowie in unbestrahlten Ansätzen mit Anserinaextrakt zeigte sich die PGE₂-Konzentration im Überstand auf einem niedrigen Niveau (<7200 pg/ml). Durch UV-B-Bestrahlung wurden die PGE₂-Konzentrationen der Kontrollansätze erhöht, wobei das Niveau der Kontrollen sich um den Faktor 13 (ohne AA) beziehungsweise um den Faktor 15 (mit AA) steigerte. Durch Zugabe der verschiedenen Konzentrationen des Anserinaextraktes waren weder ein charakteristischer Effekt in der Dosissteigerung noch ein charakteristischer Effekt im Vergleich zur Kontrolle festzustellen (siehe Abb. 24).

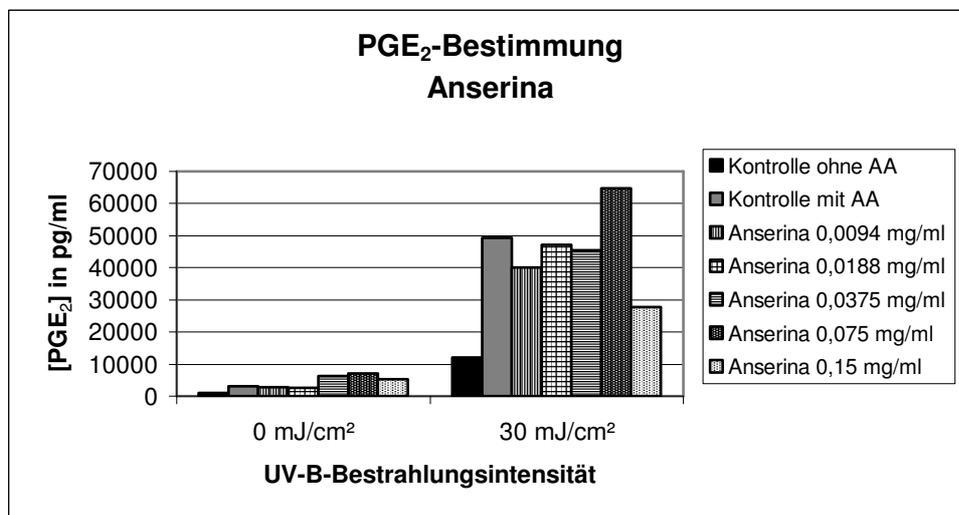


Abb. 24: Der Anserinaextrakt zeigte keinen charakteristischen Effekt auf die PGE₂-Konzentrationen in HaCaT-Zellen nach Bestrahlung mit UV-B. Unter dem Einfluss des Anserinaextraktes in fünf Konzentrationen wurde die PGE₂-Konzentration im Überstand ohne und mit UV-B-Bestrahlung bestimmt. Zum Vergleich wurden zwei Kontrollpaare mitgeführt: je eine Kontrolle (K) ohne und mit Arachidonsäure (AA) inkubiert, jeweils unbestrahlt und bestrahlt. Alle Ansätze außer den „K ohne AA“ wurden für 15 min mit AA inkubiert. Die PGE₂-Konzentrationen wurden mittels *ELISA* (Doppeltbestimmung) gemessen.

Die Ergebnisse der drei Versuchsreihen mit Anserinaextrakt waren inhomogen. Bei V-1 zeigte der Anserinaextrakt eine dosisabhängige Hemmung. In V-3 wurde wie in V-2 keine Tendenz des Extraktes erkennbar.

3.3.2. Rosmarin

Der Rosmarinextrakt wurde in den Konzentrationen 0,0008; 0,0016; 0,0031; 0,0063; und 0,0125 mg/ml eingesetzt. Zum Vergleich existierte zu jedem bestrahlten Ansatz parallel ein unbestrahlter Ansatz. Als Kontrollen dienten die in 3.3. erwähnte Ansätze ohne Zusatz von Pflanzenextrakt.

3.3.2.1. Rosmarin: Toxizitätsprüfung

Die mikroskopische Begutachtung zeigte in allen drei Versuchsreihen eine vermehrte, konzentrationsabhängige Zellschädigung. Teilweise wurden ganze Zellrasenstücke abgelöst. Aufgrund der Waschschriffe waren mit zunehmender Konzentration im Medium kaum mehr Zellen am Boden der Petrischalen adhären. Die LDH-Aktivitäten der drei Versuchsreihen waren sehr inhomogen und aufgrund der stark variablen Rest-Zellmenge wurden diese nicht verwertet. Auch bei dem Versuch durch weitere Reduktion der Rosmarinkonzentration auf bis zu 0,0005 mg/ml konnte keine Änderung erzielt werden.

3.3.2.2. Rosmarin: PGE₂-Bestimmung

Die unbestrahlten Kontrollen und die unbestrahlten Ansätze mit Rosmarinextrakt lagen alle unter 5000 pg/ml PGE₂. Die Werte der Konzentrationen 0,0016 und 0,0031 mg/ml lagen noch unterhalb der Nachweisgrenze von 782,25 pg/ml. Nach Bestrahlung zeigte sich eine Steigerung der Kontrollwerte, wobei die Konzentration durch die Inkubation mit AA um den Faktor 15 gesteigert wurde. Durch die Steigerung der Dosis des Rosmarinextraktes konnte nach Bestrahlung ein dosisabhängiger Abfall der PGE₂-Konzentration beobachtet werden. Der Level der bestrahlten Kontrolle „K ohne AA“ wurde ab einer Konzentration von 0,0031 mg/ml unterschritten. Bei den Konzentrationen von 0,0063 und 0,0125 mg/ml lag die PGE₂-Konzentration auf Höhe der unbestrahlten Kontrollen, wobei sich der Wert bei 0,0063 mg/ml unter der Nachweisgrenze (781,25 pg/ml) befand (siehe Abb. 25).

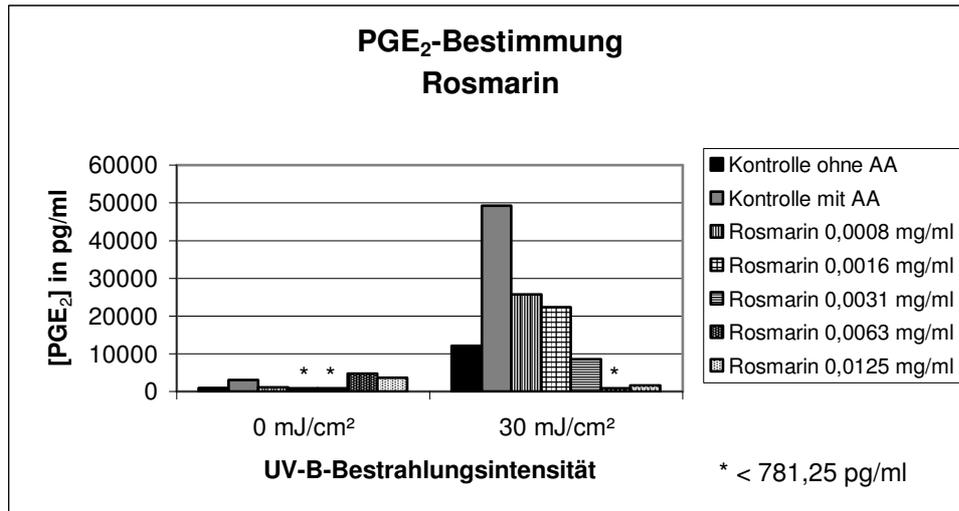


Abb. 25: Reduzierende Wirkung des Rosmarinextraktes auf die PGE₂-Konzentration in HaCaT-Zellen nach UV-B-Bestrahlung. Unter dem Einfluss des Rosmarinextraktes in fünf Konzentrationen wurde die PGE₂-Konzentration im Überstand ohne und mit UV-B-Bestrahlung bestimmt. Zum Vergleich wurden zwei Kontrollpaare mitgeführt: je eine Kontrolle (K) ohne und mit Arachidonsäure (AA) inkubiert, jeweils unbestrahlt und bestrahlt. Alle Ansätze außer den „K ohne AA“ wurden für 15 min mit AA inkubiert. Die PGE₂-Konzentrationen wurden mittels *ELISA* (Doppeltbestimmung) gemessen.

Die Ergebnisse der PGE₂-Konzentrationsmessungen aller Versuchsreihen waren rein vom Aspekt der Messwerte her dosisabhängig hemmend (Verwertung im Zusammenhang mit der Toxizitätsprüfung siehe 4.4.2.).

3.3.3. Salbei

Der Salbeiextrakt wurde in den Konzentrationen 0,0005; 0,0009; 0,0019; 0,0038 und 0,0075 mg/ml eingesetzt. Zu jeder Konzentration existierte neben einem bestrahlten Ansatz parallel ein unbestrahlter Ansatz. Zur Beurteilung des Effektes auf die Basislevel von LDH, PGE₂ und COX-2 dienten die Kontrollen ohne Zusatz von Salbeiextrakt (siehe 2.5.).

3.3.3.1. Salbei: Toxizitätsprüfung

Die LDH-Aktivitäten der unbestrahlten Kontrollen lagen unter 50 U/l. Durch die UV-B-Bestrahlung wurden diese Aktivitäten um das Drei- bis Vierfache gesteigert. Die unbestrahlten Ansätze mit Salbeiextrakt zeigten eine niedrigere Aktivität als ihre Kontrollwerte und lagen knapp unterhalb des Levels der bestrahlten Kontrolle „K ohne AA“ (siehe Abb. 26).

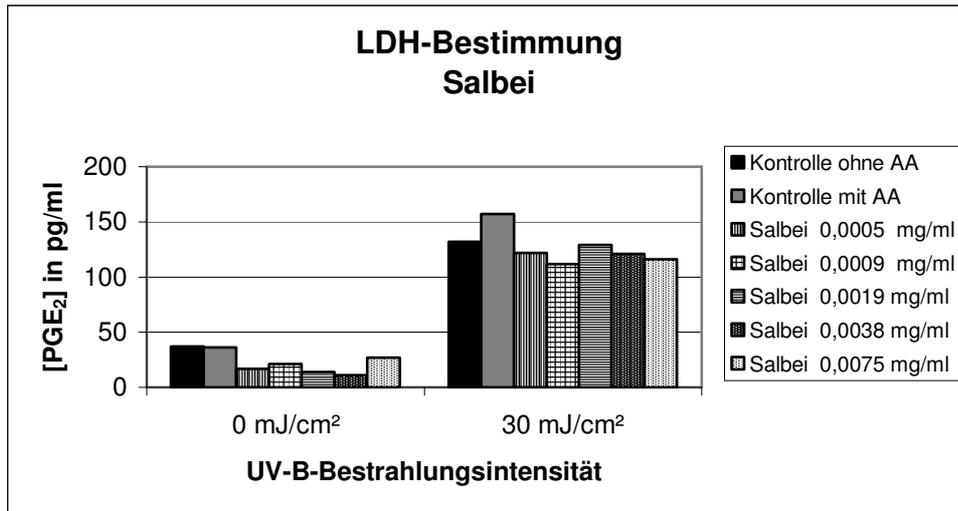


Abb. 26: Durch den Salbeiextrakt wurde die LDH-Aktivität in keinem Ansatz mit HaCaT-Zellen erhöht. Unter dem Einfluss des Salbeiextraktes in fünf Konzentrationen wurde die Aktivität der LDH im Überstand ohne und mit UV-B-Bestrahlung bestimmt. Zum Vergleich wurden zwei Kontrollpaare mitgeführt: je eine Kontrolle (K) ohne und mit Arachidonsäure (AA) inkubiert, jeweils unbestrahlt und bestrahlt. Alle Ansätze außer den „K ohne AA“ wurden für 15 min mit AA inkubiert.

Bei der mikroskopischen Begutachtung wurden in den jeweiligen Versuchsreihen (V1-3) lediglich marginale Veränderungen der HaCaT-Zellen im Vergleich zu den Kontrollen beobachtet.

3.3.3.2. Salbei: PGE₂-Bestimmung

Die PGE₂-Konzentrationen lagen bei allen unbestrahlten Ansätzen mit Zusatz von Salbei bis auf die Konzentration 0,0005 mg/ml unterhalb der „K mit AA, unbestrahlt“. Die physiologische PGE₂-Kumulation („K ohne AA, unbestrahlt“) wurde durch die höchst eingesetzte Dosierung von 0,0075 mg/ml unterschritten.

Durch die Bestrahlung mit UV-B wurde die PGE₂-Konzentration sowohl der Kontrollen als auch der Ansätze mit Salbeiextrakt gesteigert. Der Salbeiextrakt hatte nach UV-B-Bestrahlung einen hemmenden Einfluss auf die PGE₂-Produktion ab einer Konzentration von 0,0009 mg/ml im Verhältnis zur Bezugskontrolle („K mit AA, bestrahlt“). Die höchst eingesetzte Konzentration von 0,0075 mg/ml reduzierte die PGE₂-Produktion um 35%. Keine der eingesetzten Konzentrationen konnte die physiologische Basalproduktion von PGE₂ nach Bestrahlung durch UV-B erreichen („K ohne AA, bestrahlt“; siehe Abb. 27).

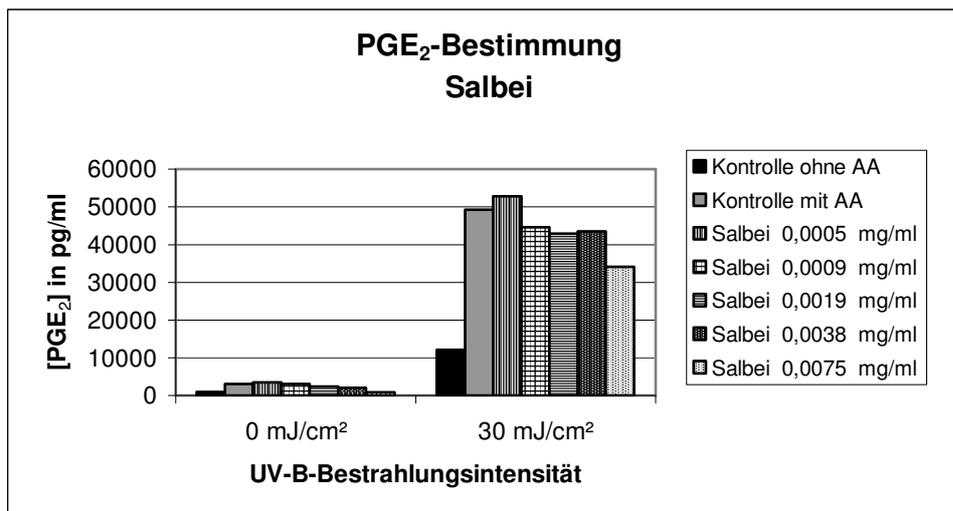


Abb. 27: Salbei bewirkte in höchster Dosierung eine moderate Hemmung der PGE₂-Produktion in HaCaT-Zellen nach UV-B-Bestrahlung. Unter dem Einfluss des Salbeiextraktes in fünf Konzentrationen wurde die PGE₂-Konzentration im Überstand ohne und mit UV-B-Bestrahlung bestimmt. Zum Vergleich wurden zwei Kontrollpaare mitgeführt: je eine Kontrolle (K) ohne und mit Arachidonsäure (AA) inkubiert, jeweils unbestrahlt und bestrahlt. Alle Ansätze außer den „K ohne AA“ wurden für 15 min mit AA inkubiert. Die PGE₂-Konzentrationen wurden mittels *ELISA* (Doppelbestimmung) gemessen.

Im Rahmen der Versuche von V-1 und V-3 konnte eine Hemmung der PGE₂-Produktion gezeigt werden, so dass die PGE₂-Konzentrationen unterhalb der jeweiligen Bezugskontrollen („K ohne/mit AA“) lagen. Diese Hemmung war im Verhältnis zu V-2 deutlicher ausgeprägt.

Aufgrund dieser Ergebnisse wurde Salbei hinsichtlich einer Reduktion der Expression des COX-2-Enzyms untersucht.

3.3.3.3. Salbei: COX-2-Western Blot

Das Experiment wurde wie in Material und Methoden (2.10.) beschrieben durchgeführt. Die Ansätze entsprachen den in 3.3. beschriebenen, wobei die Konzentration 0,0005 mg/ml nicht auf ihren Einfluss auf die Expression der COX-2 untersucht wurde. Alle unbestrahlten Ansätze zeigten lediglich sehr schwache Banden der COX-2 (Daten nicht gezeigt). Nach UV-B-Bestrahlung war bei den Kontrollen und allen eingesetzten Konzentrationen des Salbeiextraktes die Dicke der COX-2-Banden (bei 72 kDa) ähnlich stark ausgeprägt und es war kein charakteristischer Unterschied zwischen ihnen auszumachen (siehe Abb. 28). Als Kontrolle wurde Actin in den Ansätzen nachgewiesen, wobei sich diese Banden (bei 42 kDa) zum Teil inhomogen darstellten.

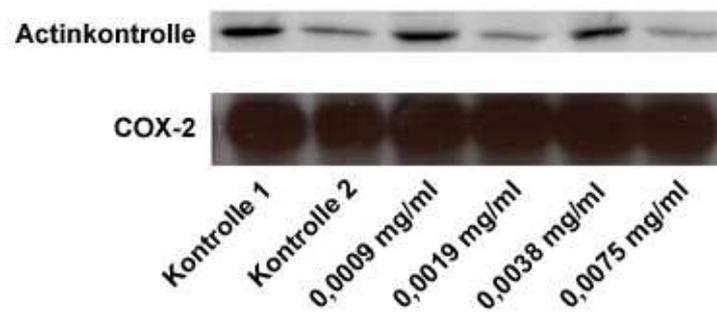


Abb. 28: Die COX-2-Expression wurde nach UV-B-Bestrahlung bei allen verwendeten Konzentrationen verstärkt exprimiert und durch den Salbeiextrakt nicht beeinflusst. Für die Beurteilung der Basalexpression der COX-2 vor und nach Bestrahlung dienten die Kontrolle 1 („K ohne AA, bestrahlt“) und die Kontrolle 2 („K mit AA, bestrahlt“). Alle Ansätze außer den „K ohne AA“ wurden für 15 min mit AA inkubiert. Die Actinkontrolle wurde zum Nachweis der korrekten Ladung gleicher Menge des Proteingemisches mitgeführt.

3.3.4. Usnea

Der Usneaextrakt wurde in den Konzentrationen 0,0195; 0,0391; 0,0781; 0,1563 und 0,3125 mg/ml untersucht. Wie bei den vorherigen Experimenten wurde von jeder Konzentration neben einem bestrahlten Ansatz parallel ein unbestrahlter Ansatz untersucht. Zur Beurteilung des Effektes auf die Basislevel der zytotoxischen und Endzündungsmarkern wurden Kontrollen ohne Zusatz von Pflanzenextrakten untersucht.

3.3.4.1. Usnea: Toxizitätsprüfung

Die unbestrahlten Ansätze zeigten bis auf die „K ohne AA, unbestrahlt“ eine LDH-Aktivität von unter 50 U/l. Die LDH-Aktivität der „K ohne AA, unbestrahlt“ zeigte sich im Verhältnis zu den Kontrollen anderer Versuche leicht erhöht auf 73 U/l. UV-B-Bestrahlung erhöhte die LDH-Aktivität der Kontrollen. Nach UV-B-Bestrahlung war die Aktivität der „K mit AA, bestrahlt“ doppelt so hoch wie die der „K ohne AA, bestrahlt“. Alle Werte der bestrahlten Ansätze mit Extraktzugabe waren bis auf den Wert der Konzentration 0,3125 mg/ auf dem Level der „K ohne AA, bestrahlt“. Bei 0,3125 mg/ml wurde eine gesteigerte Aktivität der LDH gemessen, die um 30% höher lag, als die der anderen Konzentrationen (siehe Abb. 29).

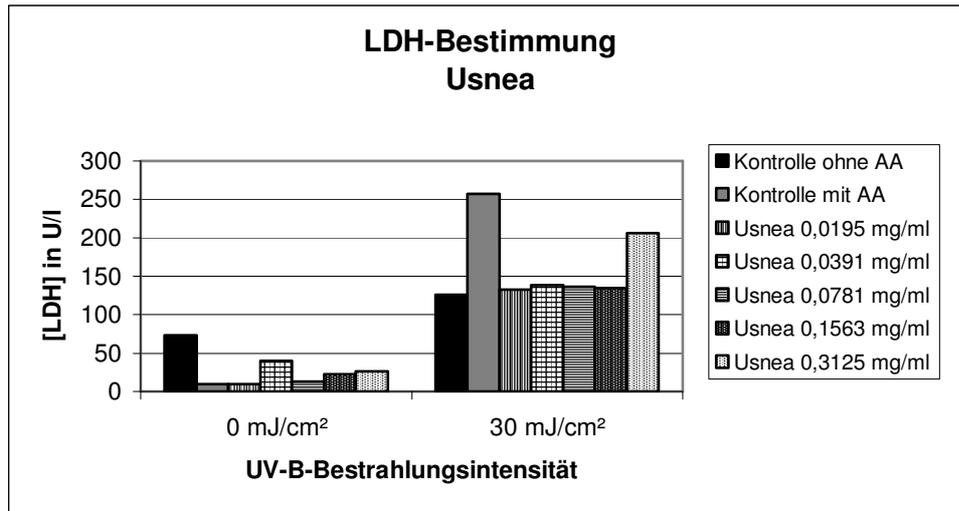


Abb. 29: Usneaextrakt zeigte keine erhöhten LDH-Aktivitäten in HaCaT-Zellen nach Bestrahlung. Unter dem Einfluss des Usneaextraktes in fünf Konzentrationen wurde die Aktivität der LDH im Überstand ohne und mit UV-B-Bestrahlung bestimmt. Zum Vergleich wurden zwei Kontrollpaare mitgeführt: je eine Kontrolle (K) ohne und mit Arachidonsäure (AA) inkubiert, jeweils unbestrahlt und bestrahlt. Alle Ansätze außer den „K ohne AA“ wurden für 15 min mit AA inkubiert.

Mikroskopisch konnte in keiner der Versuchsreihen eine morphologische Veränderung der HaCaT-Zellen im Vergleich zu den Kontrollen beobachtet werden.

3.3.4.2. Usnea: PGE₂-Bestimmung

Die PGE₂-Konzentrationen der unbestrahlten Ansätze lagen alle auf einem niedrigen Niveau. Die „K ohne AA, unbestrahlt“ lag sogar unter der Nachweisgrenze von 781,25 pg/ml. Durch die UV-B-Bestrahlung wurde die PGE₂-Basisproduktion der Kontrollen gesteigert. Bei den Ansätzen mit Usneaextrakt ließ sich eine dosisabhängige Reduktion der PGE₂-Konzentration beobachten. Bei einer Konzentration von 0,0781 mg/ml wurde eine Halbierung der PGE₂-Konzentration der „K mit AA, bestrahlt“ erreicht, bei 0,1563 und 0,3125 mg/ml konnte eine Reduktion um 90% verzeichnet werden, wobei diese sogar unter der „K ohne AA, bestrahlt“ lag (siehe Abb. 30).

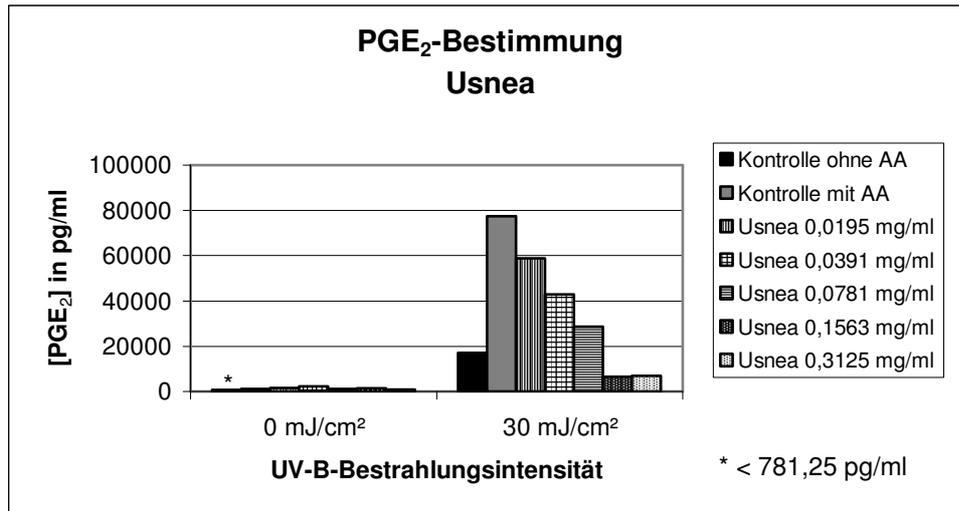


Abb. 30: Usneaextrakt bewirkte eine dosisabhängige Reduktion der PGE₂-Konzentration in HaCaT-Zellen nach Bestrahlung mit UV-B. Unter dem Einfluss des Usneaextraktes in fünf Konzentrationen wurde die PGE₂-Konzentration im Überstand ohne und mit UV-B-Bestrahlung bestimmt. Zum Vergleich wurden zwei Kontrollpaare mitgeführt: je eine Kontrolle (K) ohne und mit Arachidonsäure (AA) inkubiert, jeweils unbestrahlt und bestrahlt. Alle Ansätze außer den „K ohne AA“ wurden für 15 min mit AA inkubiert. Die PGE₂-Konzentrationen wurden mittels *ELISA* (Doppeltbestimmung) gemessen.

Die im Rahmen von V-2 beobachtete dosisabhängige Reduzierung der PGE₂-Konzentration stellte sich in den anderen Versuchsreihen ebenso dar. Aufgrund dieser Ergebnisse wurde die Wirkung des Usneaextraktes auf die Expression der COX-2 im *Western Blot* untersucht.

3.3.4.3. Usnea: COX-2-Western Blot

Die Zellen wurden wie im Abschnitt 2.10. beschrieben behandelt. Nach erfolgter elektrophoretischer Auftrennung des Zelllysates wurde im *Western Blot* die COX-2 detektiert. Die Banden aller unbestrahlten Ansätze stellten sich lediglich marginal dar (Daten nicht gezeigt). Durch die Bestrahlung mit UV-B konnten deutliche Banden auf Höhe der COX-2 (bei 72 kDa) dargestellt werden. Bestrahlte Ansätze mit Zugabe des Usneaextraktes zeigten eine dosisabhängige Hemmung, wobei diese bei einer Konzentration von 0,3125 mg/ml am stärksten ausgeprägt war (siehe Abb. 31). Die Banden des HDAC-2-Kontroll-Blots (bei 56 kDa) stellten sich homogen in gleicher Stärke dar.

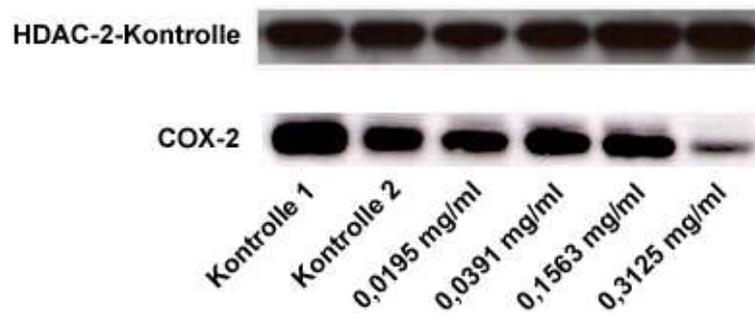


Abb. 31: Der Usneaextrakt zeigte eine dosisabhängige Hemmung der COX-2-Expression in HaCaT-Zellen nach UV-B-Bestrahlung. Für die Beurteilung der Basalexpression der COX-2 ohne und mit Bestrahlung dienten zum Vergleich die Kontrolle 1 („K ohne AA, bestrahlt“) und die Kontrolle 2 („K mit AA, bestrahlt“). Alle Ansätze außer den „K ohne AA“ wurden für 15 min mit AA inkubiert. Die ADAC-2-Kontrolle wurde zum Nachweis der korrekten Ladung gleicher Mengen des Proteingemisches mitgeführt.

3.3.5. Tormentilla-Gesamtextrakt

Der Extrakt wurde in den Konzentrationen 0,0078; 0,0156; 0,0313; 0,0625 und 0,125 mg/ml eingesetzt. Zu jeder Konzentration existierte neben einem bestrahlten Ansatz parallel ein unbestrahlter Ansatz. Zur Messung der Basislevel wurden wie zuvor Kontrollen untersucht, die nicht mit Extrakten behandelt wurden.

3.3.5.1. Tormentilla-Gesamtextrakt: Toxizitätsprüfung

Die LDH-Aktivitäten der beiden unbestrahlten Kontrollen zeigten niedrige Werte von unter 100 U/l an, wobei die Kontrolle „K mit AA, unbestrahlt“ unterhalb der der „K ohne AA, unbestrahlt“ lag. Mit steigender Konzentration des Tormentilla-Gesamtextraktes stiegen die LDH-Aktivitäten der unbestrahlten Ansätze dosisabhängig bis auf Werte von über 400 U/l an.

Nach Bestrahlung zeigten die Kontrollen einen typischen Anstieg der LDH-Aktivitäten, wobei die LDH-Aktivitäten der bestrahlten, mit Tormentilla-Gesamtextrakt behandelten Ansätze oberhalb der Kontrolle „K ohne AA, bestrahlt“, jedoch unterhalb der der „K mit AA, bestrahlt“ (Ausnahme 0,0313 mg/ml; siehe Abb. 32) lagen. Nach UV-B-Bestrahlung wurden somit keine erhöhten LDH-Aktivitäten gemessen.

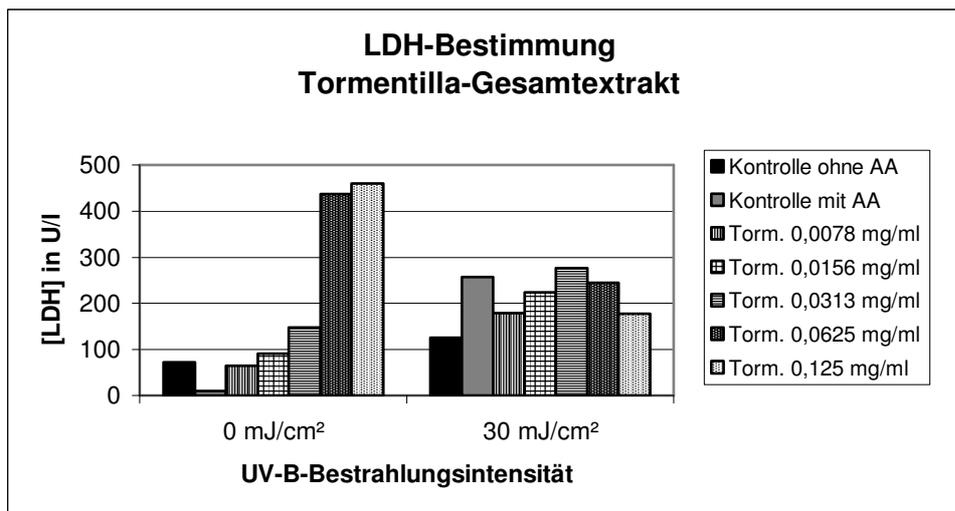


Abb. 32: Der Tormentilla-Gesamtextrakt führte ohne Bestrahlung zu einer dosisabhängigen Steigerung und mit Bestrahlung zu keinen deutlichen Veränderungen der LDH-Aktivität in HaCaT-Zellen. Unter dem Einfluss des Tormentilla-Gesamtextraktes in fünf Konzentrationen wurde die Aktivität der LDH im Überstand ohne und mit UV-B-Bestrahlung bestimmt. Zur Bestimmung der Basislevel wurden zwei Kontrollpaare mitgeführt: je eine Kontrolle (K) ohne und mit Arachidonsäure (AA) inkubiert, jeweils unbestrahlt und bestrahlt. Alle Ansätze außer den „K ohne AA“ wurden für 15 min mit AA inkubiert.

Die mikroskopische Begutachtung ergab eine leicht rötlich braune Farbe durch den Zusatz von Tormentilla-Gesamtextrakt, der auch bei einer Konzentration von 0,0078 mg/ml noch zu beobachten war. Nach Bestrahlung mit UV-B waren kaum abgelöste Zellen im Medium zu finden. Alle Versuchsreihen zeigten gleiche mikroskopische Befunde.

3.3.5.2. Tormentilla-Gesamtextrakt: PGE₂-Bestimmung

Die PGE₂-Konzentrationen der unbestrahlten Kontrollen lagen bei diesem Versuch insgesamt auf einem niedrigen Level. Die Kontrolle „K ohne AA, unbestrahlt“ lag unterhalb der Nachweisgrenze von 781,25 pg/ml. Durch die UV-B-Bestrahlung wurde eine typische Steigerung der PGE₂-Konzentrationen der Kontrollen gemessen.

Durch Zusatz des Tormentilla-Gesamtextraktes wurde insgesamt eine dosisabhängige Reduktion der PGE₂-Konzentrationen gemessen (siehe Abb. 33). Schon eine Konzentration des Tormentilla-Gesamtextraktes von 0,0078 mg/ml reduzierte die PGE₂-Konzentration um 50%. Ab einer Konzentration von 0,0313 mg/ml lagen die Werte unterhalb der Werte der Kontrolle „K ohne AA, bestrahlt“. Durch eine Konzentration von 0,0625 mg/ml wurde die PGE₂-Produktion um 96%, durch 0,125 mg/ml um 97% gehemmt. Die gemessenen PGE₂-Werte der

eingesetzten Konzentrationen 0,0625 und 0,125 mg/ml lagen unterhalb ihrer dazugehörigen unbestrahlten Werte.

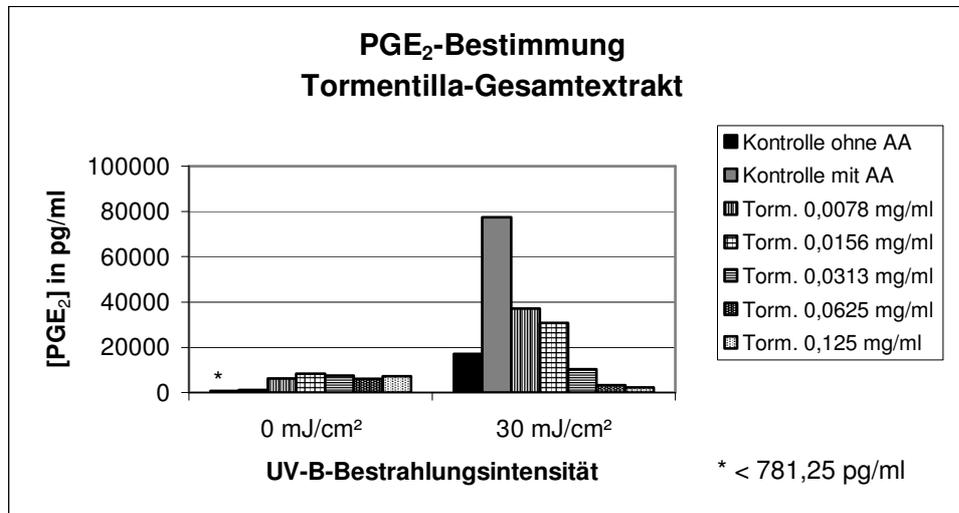


Abb. 33: Tormentilla-Gesamtextrakt bewirkt eine dosisabhängige Reduktion der PGE₂-Konzentration in HaCaT-Zellen nach Bestrahlung mit UV-B. Unter dem Einfluss des Tormentilla-Gesamtextraktes in fünf Konzentrationen wurde die PGE₂-Konzentration im Überstand ohne und mit UV-B-Bestrahlung bestimmt. Zum Vergleich wurden zwei Kontrollpaare mitgeführt: je eine Kontrolle (K) ohne und mit Arachidonsäure (AA) inkubiert, jeweils unbestrahlt und bestrahlt. Alle Ansätze außer den „K ohne AA“ wurden für 15 min mit AA inkubiert. Die PGE₂-Konzentrationen wurden mittels *ELISA* (Doppeltbestimmung) gemessen.

Auch in V-1 und V-3 wurde eine dosisabhängige Reduktion der PGE₂-Konzentrationen gemessen. Aufgrund dieser Ergebnisse wurde die Wirkung des Tormentilla-Gesamtextraktes auf die Expression der COX-2 im *Western Blot* untersucht.

3.3.5.3. Tormentilla-Gesamtextrakt: COX-2-Western Blot

Der Tormentilla-Gesamtextrakt wurde in vier Konzentrationen (0,0156; 0,0313; 0,0625 und 0,125 mg/ml) im *Western Blot* untersucht. Die Zellen wurden wie im Abschnitt 2.10. beschrieben behandelt. Nach erfolgter elektrophoretischer Auftrennung des Zelllysates wurde im *Western Blot* die COX-2 (Bande bei 72 kDa) detektiert. Im Abschnitt der unbestrahlten Ansätze stellten sich lediglich bei den Ansätzen unter Einfluss des Tormentilla-Gesamtextraktes in Konzentrationen von 0,0313 und 0,0625 mg/ml marginale Banden der COX-2-Banden dar (Daten nicht gezeigt). Durch die Bestrahlung mit UV-B konnten deutliche Banden der COX-2 visualisiert werden. Dabei konnte auf Proteinebene eine Hemmung der Expression durch den Tormentilla-Gesamtextrakt ab einer Konzentration von 0,0625 mg/ml

gezeigt werden. Die Bande der „K ohne AA, bestrahlt“ war im Vergleich zur Bande „K mit AA, bestrahlt“ schwächer ausgeprägt. Die Banden des Tormentilla-Gesamtextraktes in den Konzentrationen von 0,0625 und 0,125 mg/ml waren im Vergleich zu den Kontrollbanden abgeschwächt (siehe Abb. 34). Als Kontrolle einer korrekten Ladung der Menge des Proteingemisches erfolgte die Detektion des Proteins Actin (Bande bei 42 kDa).

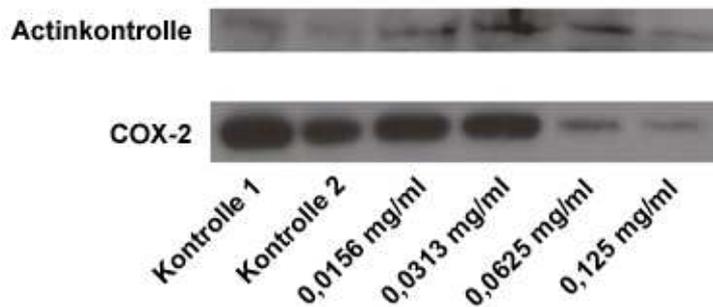


Abb. 34: Tormentilla-Gesamtextrakt bewirkte eine Reduktion der COX-2-Expression in HaCaT-Zellen nach Bestrahlung mit UV-B. Für die Beurteilung der Basalexpression der COX-2 ohne und mit Bestrahlung dienten zum Vergleich die Kontrolle 1 („K ohne AA, bestrahlt“) und die Kontrolle 2 („K mit AA, bestrahlt“). Alle Ansätze außer der Kontrolle 1 wurden für 15 min mit AA inkubiert. Die Actinkontrolle wurde zum Nachweis der korrekten Ladung gleicher Mengen des Proteingemisches mitgeführt.

3.3.6. Tormentilla Fraktionen 1-4

Der Tormentilla-Gesamtextrakt konnte durch die Firma HWI-Analytik mittels der *High Performance Liquid Chromatography* (HPLC) in vier Fraktionen aufgetrennt werden. Diese wurden in zwei Konzentrationen (0,25 und 2,5 mg/ml) im UV-B-Modell eingesetzt. Es wurden pro Ansatz 1 Mio. HaCaT-Zellen ausplattiert und diese wie in Abschnitt 2.6. behandelt. Die Fraktionen 1-4 (siehe Abb. 35-42) zeigten unterschiedliche Wirkungen auf die PGE₂-Produktion in HaCaT-Zellen. Eine hemmende Wirkung von Fraktion 2 bis 4 wurde in einem weiteren Versuch in den eingesetzten Konzentrationen 0,0195 bis 2,5 mg/ml bestätigt. Die Wirkung der Fraktion 1 wurde nicht weiter verfolgt.

Im Rahmen der mikroskopischen Begutachtung zeigten alle Ansätze mit Zusatz der Fraktionen 1-4 mikroskopisch eine leichte rötlich-braune Färbung. Durch Zusatz des jeweiligen Tormentillaextraktes der Fraktionen 1-4 waren nach UV-B-Bestrahlung im

Verhältnis zu den Kontrollen lediglich wenige tote Zellen in den Überständen zu finden. Beide Versuchsreihen zeigten gleiche mikroskopische Befunde.

3.3.6.1. Fraktion 1: LDH-Bestimmung

Die LDH-Aktivität der unbestrahlten Ansätze lag unterhalb von 100 U/l, wobei die Kontrollen und die Ansätze mit Zusatz der Fraktion 1 bei geringfügigen Schwankungen auf dem gleichen LDH-Level lagen. Durch die Bestrahlung wurden die LDH-Aktivitäten aller Ansätze gesteigert, wobei sie bei Ansätzen mit Zusatz von Fraktion 1 höher lagen als bei den Kontrollen und ein dosisabhängiges Verhalten zeigten (siehe Abb. 35).

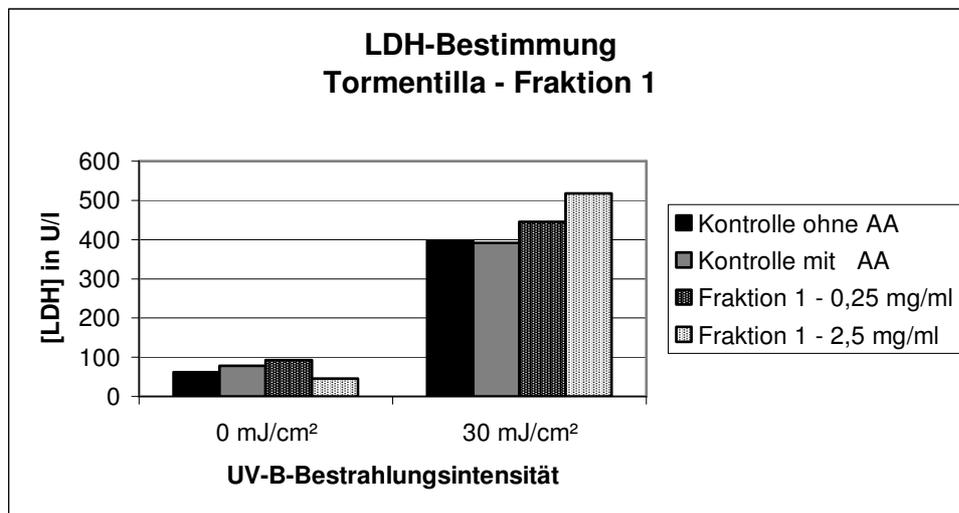


Abb. 35: Tormentilla Fraktion 1 bewirkte eine leichte Steigerung der LDH-Aktivität in HaCaT-Zellen nach Bestrahlung. Unter dem Einfluss der Fraktion 1 in zwei Konzentrationen wurde die Aktivität der LDH im Überstand ohne und mit UV-B-Bestrahlung bestimmt. Zum Vergleich wurden zwei Kontrollpaare mitgeführt: je eine Kontrolle (K) ohne und mit Arachidonsäure (AA) inkubiert, jeweils unbestrahlt und bestrahlt. Alle Ansätze außer den „K ohne AA“ wurden für 15 min mit AA inkubiert.

3.3.6.2. Fraktion 1: PGE₂-Bestimmung

Die PGE₂-Konzentrationen der unbestrahlten Ansätze lagen auf niedrigem Niveau, wobei die Ansätze mit Zusatz der Fraktion 1 geringfügig höher lagen. Durch die Bestrahlung wurde die Konzentration an gemessenem PGE₂ gesteigert. In diesem Fall lag die Konzentration der „K ohne AA“ über der „K mit AA“. Fraktion 1 führte im Verhältnis zu den Kontrollen zu keiner deutlichen Reduktion der PGE₂-Konzentration. Bei einer Extraktkonzentration von 0,25 mg/ml lag die Konzentration an PGE₂ weit über der der Kontrolle (siehe Abb. 36).

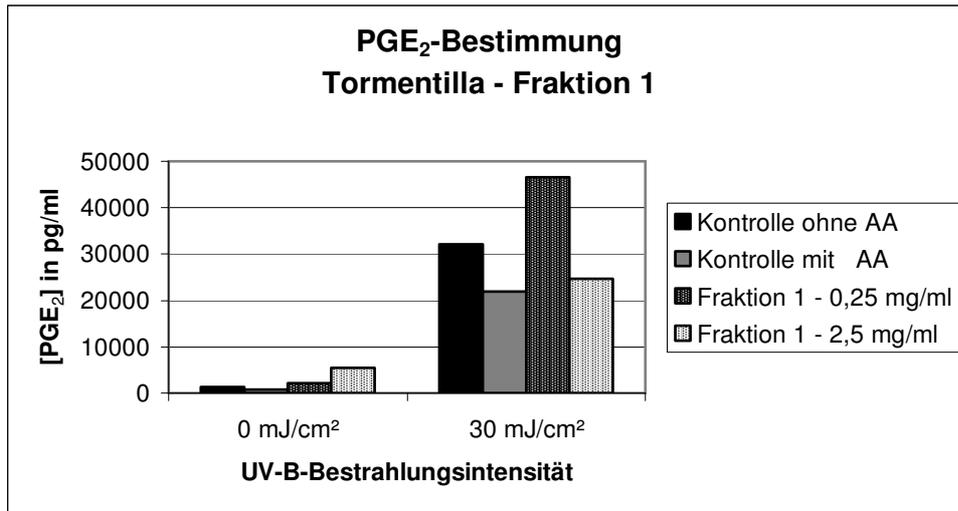


Abb. 36: Die Fraktion 1 der Tormentilla bewirkte keine Hemmung der PGE₂-Produktion in HaCaT-Zellen nach UV-B-Bestrahlung. Unter dem Einfluss der Fraktion 1 in zwei Konzentrationen wurde die PGE₂-Konzentration im Überstand ohne und mit UV-B-Bestrahlung bestimmt. Zum Vergleich wurden zwei Kontrollpaare mitgeführt: je eine Kontrolle (K) ohne und mit Arachidonsäure (AA) inkubiert, jeweils unbestrahlt und bestrahlt. Alle Ansätze außer den „K ohne AA“ wurden für 15 min mit AA inkubiert. Die PGE₂-Konzentrationen wurden mittels *ELISA* (Doppeltbestimmung) gemessen.

3.3.6.3. Fraktion 2: LDH-Bestimmung

Die LDH-Aktivitäten der unbestrahlten Ansätze lagen unterhalb von 100 U/l, wobei mit Zusätzen der Fraktion 2 diese niedriger lagen als die der Kontrollen. Durch die Fraktion 2 in einer Konzentration von 0,25 mg/ml wurde die Aktivität um 20% im Verhältnis zur „K mit AA, bestrahlt“ gesteigert. Durch den Zusatz der Fraktion 2 in der Konzentration 2,5 mg/ml lag eine um 93% deutlich erniedrigte LDH-Aktivität im Vergleich zur Kontrolle „K mit AA, bestrahlt“ vor. Diese befand sich sogar auf dem Niveau ihres dazugehörigen unbestrahlten Ansatzes (siehe Abb. 37).

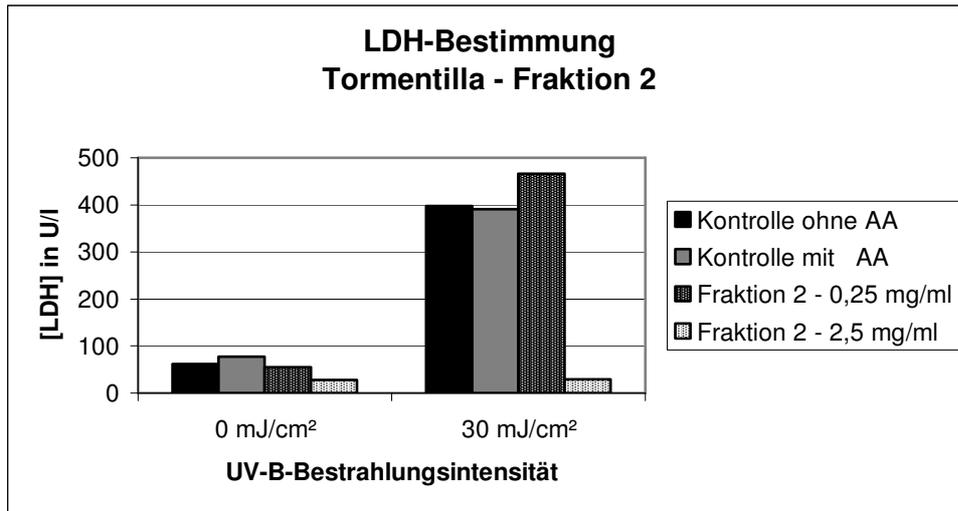


Abb. 37: Fraktion 2 der Tormentilla bewirkte in höherer Konzentration eine starke Reduktion der LDH-Aktivität in HaCaT-Zellen. Unter dem Einfluss von zwei Konzentrationen der Fraktion 2 wurde die Aktivität der LDH im Überstand ohne und mit UV-B-Bestrahlung bestimmt. Zum Vergleich wurden zwei Kontrollpaare mitgeführt: je eine Kontrolle (K) ohne und mit Arachidonsäure (AA) inkubiert, jeweils unbestrahlt und bestrahlt. Alle Ansätze außer den „K ohne AA“ wurden für 15 min mit AA inkubiert.

3.3.6.4. Fraktion 2: PGE₂-Bestimmung

Die PGE₂-Konzentrationen der unbestrahlten Ansätze lagen unter 5000 pg/ml. Durch die Zusätze der Fraktion 2 blieben die Werte konstant beziehungsweise waren im Verhältnis leicht erhöht. Durch die Bestrahlung mit UV-B wurden die PGE₂-Konzentrationen der Kontrollen gesteigert, wobei die „K mit AA, bestrahlt“ eine niedrigere PGE₂-Konzentration als die „K ohne AA, bestrahlt“ aufwies. Es zeigte sich eine dosisabhängige Reduktion der PGE₂-Konzentration in den Ansätzen mit Fraktion 2. Die PGE₂-Konzentration wurde im Vergleich zur „K mit AA, bestrahlt“ durch die Extraktkonzentration von 0,25 mg/ml um 50% und von 2,5 mg/ml um 81% reduziert (siehe Abb. 38).

In einem Bestätigungsversuch wurde Fraktion 2 in weiteren Konzentrationen von 0,0391 bis 2,5 mg/ml eingesetzt und zeigte auch in diesem Experiment eine deutliche dosisabhängige Hemmung der PGE₂-Konzentration.

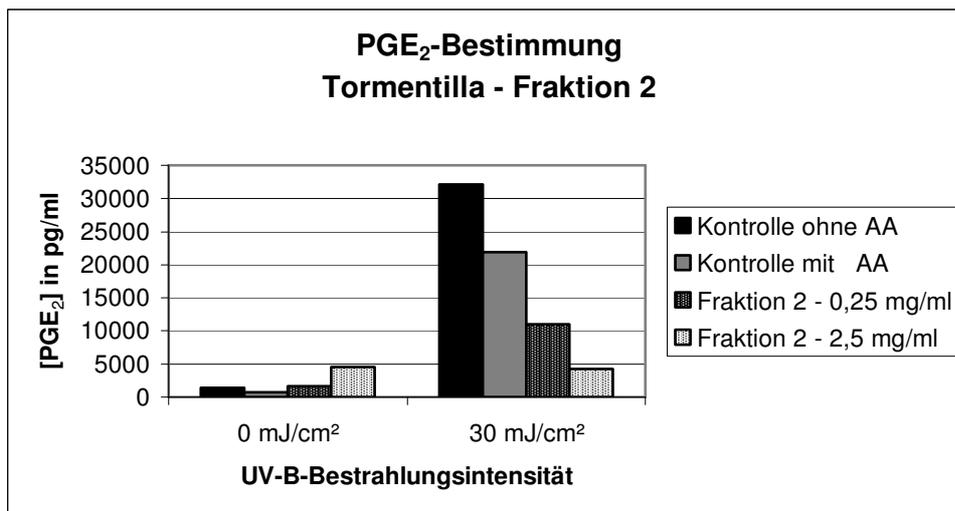


Abb. 38: Fraktion 2 zeigte eine dosisabhängige Reduktion der PGE₂-Konzentration in HaCaT-Zellen nach UV-B-Bestrahlung. Unter dem Einfluss von zwei Konzentrationen der Fraktion 2 wurden die PGE₂-Konzentrationen im Überstand ohne und mit UV-B-Bestrahlung bestimmt. Zum Vergleich wurden zwei Kontrollpaare mitgeführt: je eine Kontrolle (K) ohne und mit Arachidonsäure (AA) inkubiert, jeweils unbestrahlt und bestrahlt. Alle Ansätze außer den „K ohne AA“ wurden für 15 min mit AA inkubiert. Die PGE₂-Konzentrationen wurden mittels *ELISA* (Doppelbestimmung) gemessen.

3.3.6.5. Fraktion 3: LDH-Bestimmung

Die LDH-Aktivitäten der unbestrahlten Kontrollen lagen unter 100 U/l. Durch die Bestrahlung mit UV-B wurden die LDH-Aktivitäten der Kontrollen auf etwa 400 U/l gesteigert. Unbestrahlt wurde durch den Zusatz von Fraktion 3 in einer Konzentration von 0,25 mg/ml eine stark erhöhte LDH-Aktivität gemessen, während der Zusatz der Fraktion 3 in einer Konzentration von 2,5 mg/ml eine erniedrigte LDH-Aktivität aufwies, die niedriger als die der dazugehörigen unbestrahlten Kontrollen lag.

Nach Bestrahlung lag die Aktivität nach Zugabe von Fraktion 3 in einer Konzentration von 0,25 mg/ml oberhalb der der Kontrollen. In der Konzentration von 2,5 mg/ml reduzierte die Fraktion 3 die LDH-Aktivität im Verhältnis zur „K mit AA, bestrahlt“ um 91% (siehe Abb. 39).

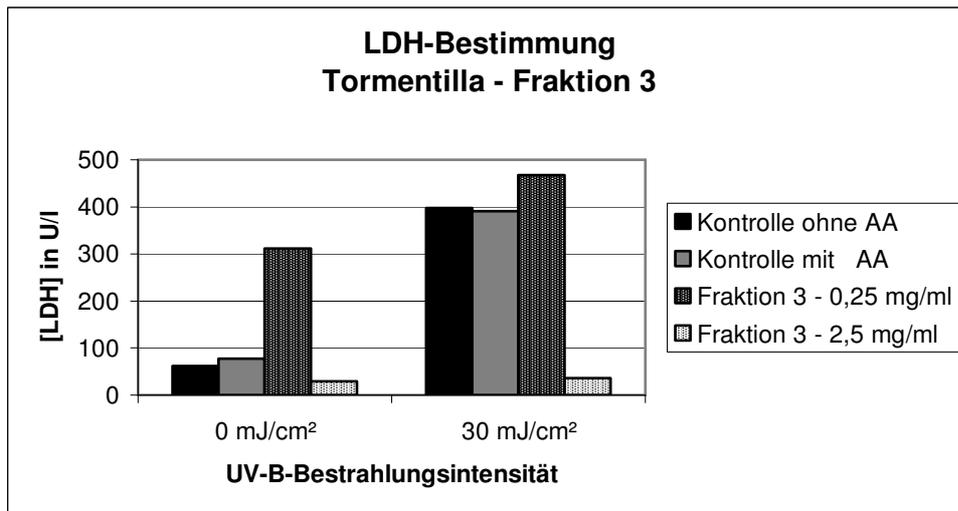


Abb. 39: Tormentilla Fraktion 3 bewirkte in höherer Konzentration eine starke Hemmung der LDH-Aktivität in HaCaT-Zellen nach UV-B-Bestrahlung. Unter dem Einfluss von zwei Konzentrationen der Fraktion 3 wurde die Aktivität der LDH im Überstand ohne und mit UV-B-Bestrahlung bestimmt. Zum Vergleich wurden zwei Kontrollpaare mitgeführt: je eine Kontrolle (K) ohne und mit Arachidonsäure (AA) inkubiert, jeweils unbestrahlt und bestrahlt. Alle Ansätze außer den „K ohne AA“ wurden für 15 min mit AA inkubiert.

3.3.6.6. Fraktion 3: PGE₂-Bestimmung

Die PGE₂-Konzentrationen der unbestrahlten Kontrollen lagen alle auf einem niedrigen Niveau (unter 5000 pg/ml), wobei die „K ohne AA, unbestrahlt“ eine höhere Konzentration an PGE₂ aufwies als die „K mit AA, unbestrahlt“. Nach Bestrahlung mit UV-B lag auch hier die Konzentration der Kontrolle „K ohne AA, bestrahlt“ höher als die der „K mit AA, bestrahlt“. Die Zellen zeigten eine dosisabhängige Verringerung der Produktion an PGE₂ in Anwesenheit von Fraktion 3. Tormentilla Fraktion 3 in einer Konzentration von 0,25 mg/ml reduzierte die gemessene PGE₂-Konzentration um 82%. Durch eine Konzentration von 2,5 mg/ml wurde sie sogar um 94% verringert (siehe Abb. 40).

In einem weiter durchgeführten Versuch wurde die Fraktion 3 in den Konzentrationen von 0,0391 bis 2,5 mg/ml untersucht. Die PGE₂-Konzentration wurde dabei dosisabhängig reduziert. Schon unter dem Einfluss der Fraktion 3 in der niedrigst eingesetzten Konzentration (0,0391 mg/ml) konnte die PGE₂-Konzentration im Verhältnis zur Bezugskontrolle mehr als halbiert werden.

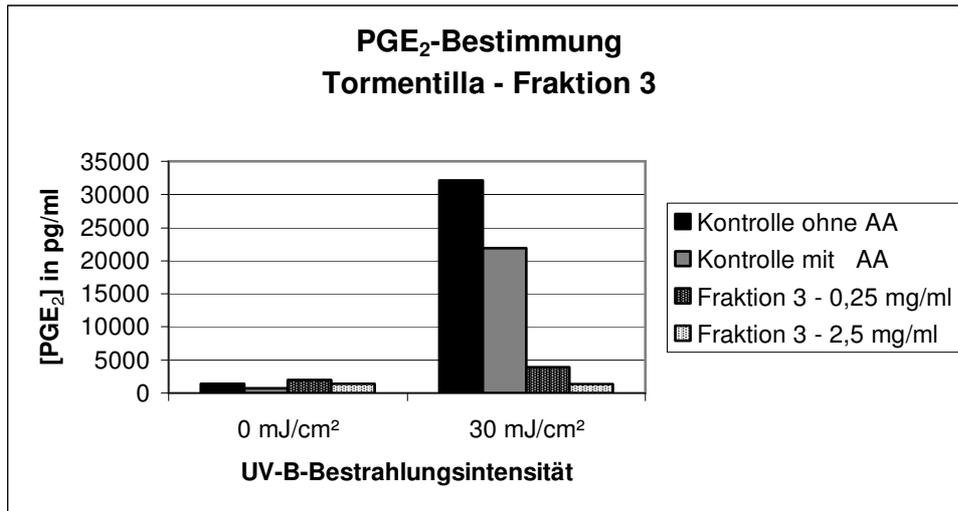


Abb. 40: Tormentilla Fraktion 3 zeigte eine deutliche dosisabhängige Reduktion der PGE₂-Konzentration in HaCaT-Zellen nach UV-B-Bestrahlung. Unter dem Einfluss von Fraktion 3 in zwei Konzentrationen wurde die PGE₂-Konzentrationen im Überstand ohne und mit UV-B-Bestrahlung bestimmt. Zum Vergleich wurden zwei Kontrollpaare mitgeführt: je eine Kontrolle (K) ohne und mit Arachidonsäure (AA) inkubiert, jeweils unbestrahlt und bestrahlt. Alle Ansätze außer den „K ohne AA“ wurden für 15 min mit AA inkubiert. Die PGE₂-Konzentrationen wurden mittels *ELISA* (Doppeltbestimmung) gemessen.

3.3.6.7. Fraktion 4: LDH-Bestimmung

Die unbestrahlten Ansätze zeigten eine LDH-Aktivität von unter 100 U/l, wobei die LDH-Aktivitäten mit Zugabe von Fraktion 4 unterhalb ihrer Kontrollen lagen. Die UV-B-Bestrahlung der Zellen bewirkte eine deutliche Zunahme der LDH-Aktivitäten der Kontrollen auf Werte im Bereich von 400 U/l. Die Zugabe der Fraktion 4 des Tormentilla-Gesamtextraktes in den Konzentrationen 0,025 und 0,25 mg/ml erniedrigte nach Bestrahlung die LDH-Aktivität um 95% und 93% im Verhältnis zur „K mit AA, bestrahlt“. Sowohl in den Ansätzen ohne Bestrahlung als auch in den Ansätzen mit Bestrahlung lagen die LDH-Aktivitäten der Fraktion 4 in etwa auf dem gleichen Niveau (siehe Abb. 41).

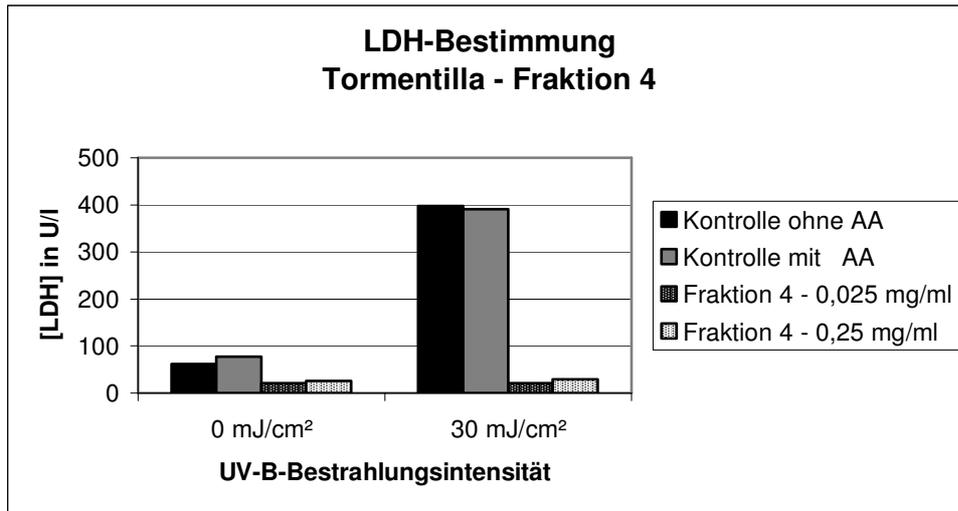


Abb. 41: Tormentilla Fraktion 4 reduzierte deutlich die LDH-Aktivitäten in HaCaT-Zellen nach UV-B-Bestrahlung. Unter dem Einfluss von Fraktion 4 in zwei Konzentrationen wurde die Aktivität der LDH im Überstand ohne und mit UV-B-Bestrahlung bestimmt. Zum Vergleich wurden zwei Kontrollpaare mitgeführt: je eine Kontrolle (K) ohne und mit Arachidonsäure (AA) inkubiert, jeweils unbestrahlt und bestrahlt. Alle Ansätze außer den „K ohne AA“ wurden für 15 min mit AA inkubiert.

3.3.6.8. Fraktion 4: PGE₂-Bestimmung

Die unbestrahlten Ansätze zeigten insgesamt PGE₂-Konzentrationen unterhalb von 5000 pg/ml, wobei die Kontrolle „K ohne AA, unbestrahlt“ oberhalb der „K mit AA, unbestrahlt“ lag. Durch die Bestrahlung mit UV-B wurden die PGE₂-Konzentrationen der Kontrollen gesteigert. Die Fraktion 4 hatte einen ausgeprägten, hemmenden Einfluss auf die PGE₂-Produktion. Diese wurde durch Zugabe von Fraktion 4 in einer Konzentration von 0,025 mg/ml um 94% beziehungsweise in einer Konzentration von 0,25 mg/ml um 98% im Vergleich zur Bezugskontrolle reduziert. Diese Werte lagen auf Höhe der dazugehörigen unbestrahlten Ansätze der Fraktion 4 (siehe Abb. 42). Nach weiterer Untersuchung der Fraktion 4 in den Konzentrationen von 0,0039 bis 0,25 mg/ml konnte die deutliche dosisabhängige Reduktion der PGE₂-Konzentration bestätigt werden. Durch den Einfluss der Fraktion 4 selbst in der niedrigst eingesetzten Konzentration von 0,0039 mg/ml konnte die PGE₂-Konzentration im Verhältnis zur Bezugskontrolle mehr als halbiert werden.

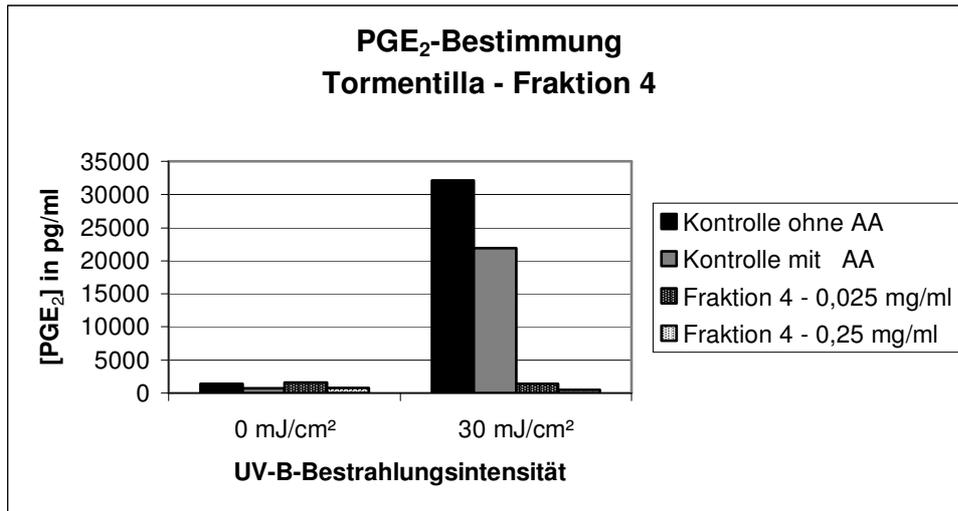


Abb. 42: Tormentilla Fraktion 4 zeigte auch in niedrigen Konzentrationen eine sehr starke Hemmung der PGE₂-Produktion in HaCaT-Zellen nach UV-B-Bestrahlung. Unter dem Einfluss der Fraktion 4 in zwei Konzentrationen wurde die PGE₂-Konzentration im Überstand ohne und mit UV-B-Bestrahlung bestimmt. Zum Vergleich wurden zwei Kontrollpaare mitgeführt: je eine Kontrolle (K) ohne und mit Arachidonsäure (AA) inkubiert, jeweils unbestrahlt und bestrahlt. Alle Ansätze außer den „K ohne AA“ wurden für 15 min mit AA inkubiert. Die PGE₂-Konzentrationen wurden mittels *ELISA* (Doppeltbestimmung) gemessen.

3.3.7. Tormentilla Unterfraktionen der Fraktion 4

Die Fraktion 4 des Tormentilla-Gesamtextraktes konnte durch die Firma HWI-Analytik in weitere vier Unterfraktionen (4-1, 4-2, 4-3, 4-4) aufgetrennt werden (siehe auch 2.7.). Diese wurden ebenfalls im UV-B-Modell untersucht, um ihren Einfluss auf die PGE₂-Produktion zu untersuchen. Die Unterfraktionen wurden in sieben verschiedenen Konzentrationen eingesetzt (0,0391; 0,0781; 0,1563; 0,3125; 0,625; 1,25 und 2,5 mg/ml). Auf die Bestimmung der LDH-Aktivität der Ansätze wurde in dieser Versuchsreihe verzichtet.

Eine mikroskopische Begutachtung fand vor und nach UV-B-Bestrahlung statt. Der Zusatz der einzelnen Unterfraktionen resultierte in allen Fällen in leichter Braunfärbung der Zellen. Nach der Bestrahlung mit UV-B waren lediglich wenige tote Zellen im Kulturmedium vorhanden.

3.3.7.1. Unterfraktion 4-1: PGE₂-Bestimmung

Die PGE₂-Konzentrationen der unbestrahlten, mit Unterfraktion 4-1 behandelten Ansätze lagen alle außer die der Konzentrationen 1,25 und 2,5 mg/ml oberhalb der dazugehörigen unbestrahlten Kontrolle („K mit AA, unbestrahlt“). Als Ausreißer stellte sich der unbestrahlte Ansatz mit der Konzentration von 0,625 mg/ml dar, bei dem die PGE₂-Konzentration auf einem höheren Niveau als bei den anderen unbestrahlten

Ansätzen lag. Allgemein waren bei den Kontrollen hohe Level an PGE₂ zu messen, vor allem nach erfolgter UV-B-Bestrahlung.

Unter Zusatz der Unterfraktion 4-1 wurde eine weitgehend dosisabhängige Hemmung der PGE₂-Produktion nach UV-B-Bestrahlung beobachtet. Die PGE₂-Konzentrationen der eingesetzten Konzentrationen lagen unterhalb der Kontrolle „K mit AA, bestrahlt“. Ferner lagen die Werte ab der Konzentration von 0,1563 mg/ml sogar unterhalb der Kontrolle „K ohne AA, bestrahlt“. Eine Reduktion von mehr als 50% im Verhältnis zur „K mit AA, bestrahlt“ wurde bereits ab einer Konzentration von 0,0781 mg/ml erreicht. Die bestrahlten Ansätze mit den Konzentrationen 1,25 und 2,5 mg/ml lagen sogar unterhalb der Kontrolle „K ohne AA, unbestrahlt“, also damit unterhalb der physiologischen Basalexpression von PGE₂ in HaCaT-Zellen ohne UV-B-Bestrahlung. In Abb. 43 ist die dosisabhängige Hemmung der PGE₂-Produktion der Unterfraktion 4-1 ersichtlich.

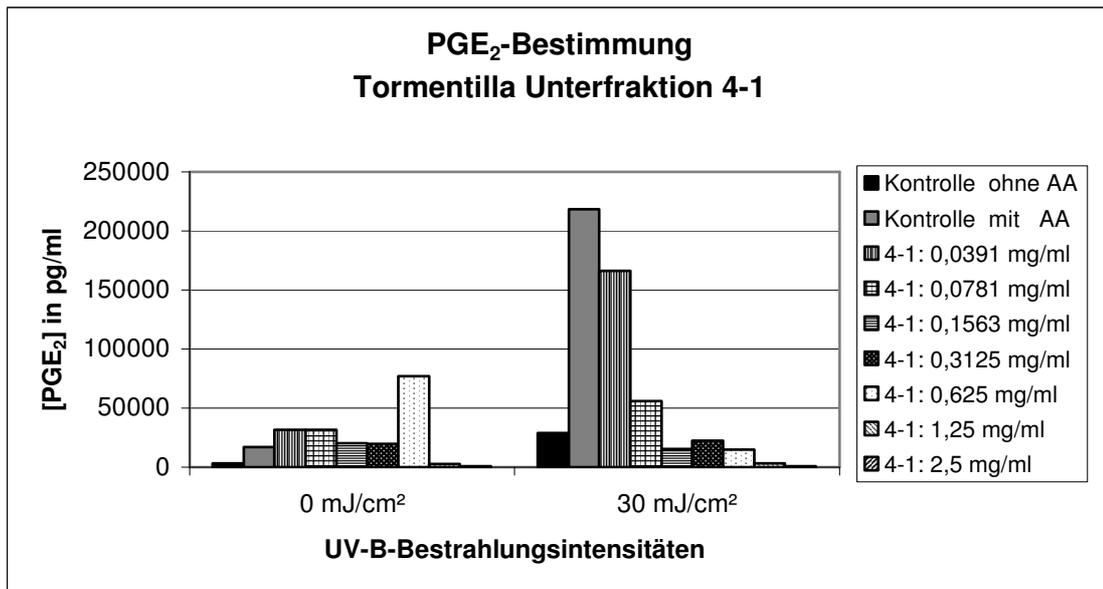


Abb. 43: Tormentilla Unterfraktion 4-1 zeigte eine annähernd dosisabhängige Reduktion der PGE₂-Konzentration nach UV-B-Bestrahlung. Unter dem Einfluss der Unterfraktion 4-1 in sieben Konzentrationen wurde die PGE₂-Konzentration im Überstand ohne und mit UV-B-Bestrahlung bestimmt. Zum Vergleich wurden zwei Kontrollpaare mitgeführt: je eine Kontrolle (K) ohne und mit Arachidonsäure (AA) inkubiert, jeweils unbestrahlt und bestrahlt. Alle Ansätze außer den „K ohne AA“ wurden für 15 min mit AA inkubiert. Die PGE₂-Konzentrationen wurden mittels *ELISA* (Doppeltbestimmung) gemessen.

3.3.7.2. Unterfraktion 4-2: PGE₂-Bestimmung

Die Unterfraktion 4-2 zeigte eine ähnlich starke Hemmungseigenschaft wie die Unterfraktion 4-1. Da die Wirkungen der beiden Unterfraktionen parallel untersucht wurden, wurde für beide nur ein Kontrollpaar verwendet (siehe auch 3.3.7.1). Unter Zugabe der Unterfraktion 4-2 lagen die PGE₂-Konzentrationen in den unbestrahlten Ansätzen außer bei 0,0391 mg/ml, die oberhalb, und 1,25 mg/ml sowie 2,5 mg/ml, die unterhalb lagen, auf dem Level der unbestrahlten Kontrolle („K mit AA, unbestrahlt“).

Nach UV-B-Bestrahlung bewirkte der Zusatz der Fraktion 4-2 eine dosisabhängige Hemmung der PGE₂-Konzentration. Bei einer Konzentration von 0,1563 mg/ml lagen die PGE₂-Konzentrationen bereits unterhalb der „K ohne AA, bestrahlt“. Im Vergleich zu den unbestrahlten korrespondierenden Ansätzen lagen diese ab einer Konzentration von 0,1563 mg/ml auf dem gleichen Niveau (siehe Abb. 44).

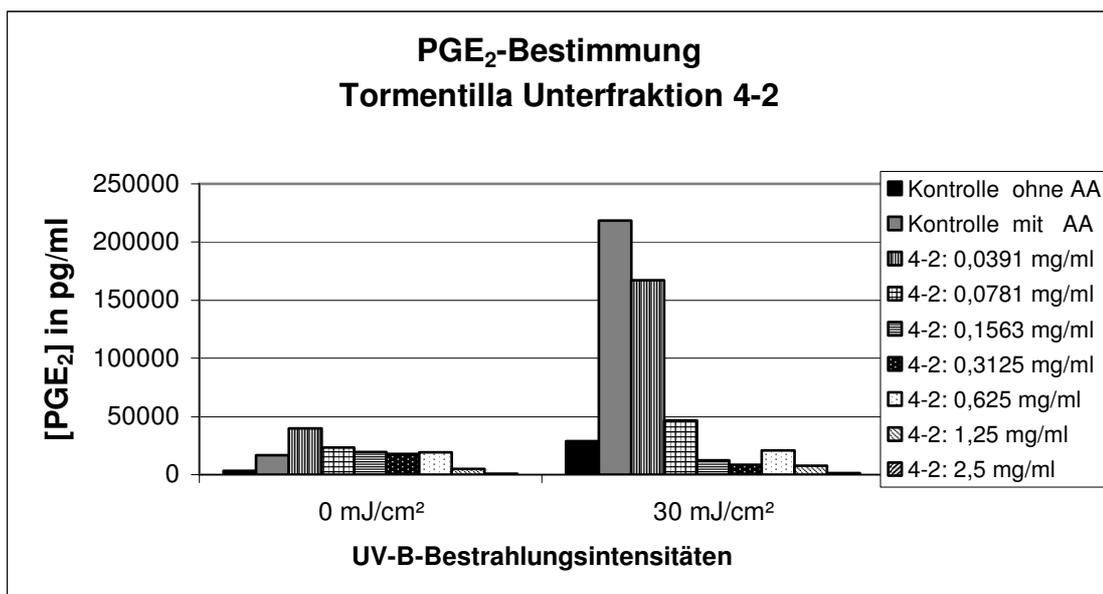


Abb. 44: Tormentilla Unterfraktion 4-2 zeigte eine annähernd dosisabhängige Reduktion der PGE₂-Konzentration nach UV-B-Bestrahlung. Unter dem Einfluss der Unterfraktion 4-2 in sieben Konzentrationen wurden die PGE₂-Konzentrationen im Überstand ohne und mit UV-B-Bestrahlung bestimmt. Zum Vergleich wurden zwei Kontrollpaare mitgeführt: je eine Kontrolle (K) ohne und mit Arachidonsäure (AA) inkubiert, jeweils unbestrahlt und bestrahlt. Alle Ansätze außer den „K ohne AA“ wurden für 15 min mit AA inkubiert. Die PGE₂-Konzentrationen wurden mittels ELISA (Doppeltbestimmung) gemessen.

3.3.7.3. Unterfraktion 4-3: PGE₂-Bestimmung

Durch die Bestrahlung mit UV-B wurde die PGE₂-Konzentration der Kontrollen gesteigert, wobei die Kontrolle mit Inkubation von AA zu einer PGE₂-Konzentration von über 200000 pg/ml führte. Die gemessenen PGE₂-Konzentrationen der unbestrahlten Ansätze mit Zusatz von Unterfraktion 4-3 (0,0391; 0,0781; 0,1563 und 0,3125 mg/ml) lagen oberhalb der unbestrahlten „K mit AA“. Alle weiteren eingesetzten Konzentrationen zeigten jedoch einen PGE₂-Level, der unterhalb dieser Kontrolle lag. Jede getestete Konzentration der Unterfraktion 4-3 bewirkte eine Reduktion der PGE₂-Produktion in hohem Maße von minimal 85% bis maximal 99% im Vergleich zur Kontrolle „K mit AA, bestrahlt“. Ab einer Konzentration von 0,1563 mg/ml wurde die PGE₂-Produktion in dem Maße beeinflusst, dass sie unterhalb der „K ohne AA, bestrahlt“ lag. Diese lagen im Vergleich zu den korrespondierenden unbestrahlten Ansätzen in einem ähnlichen Konzentrationsbereich (siehe Abb. 45).

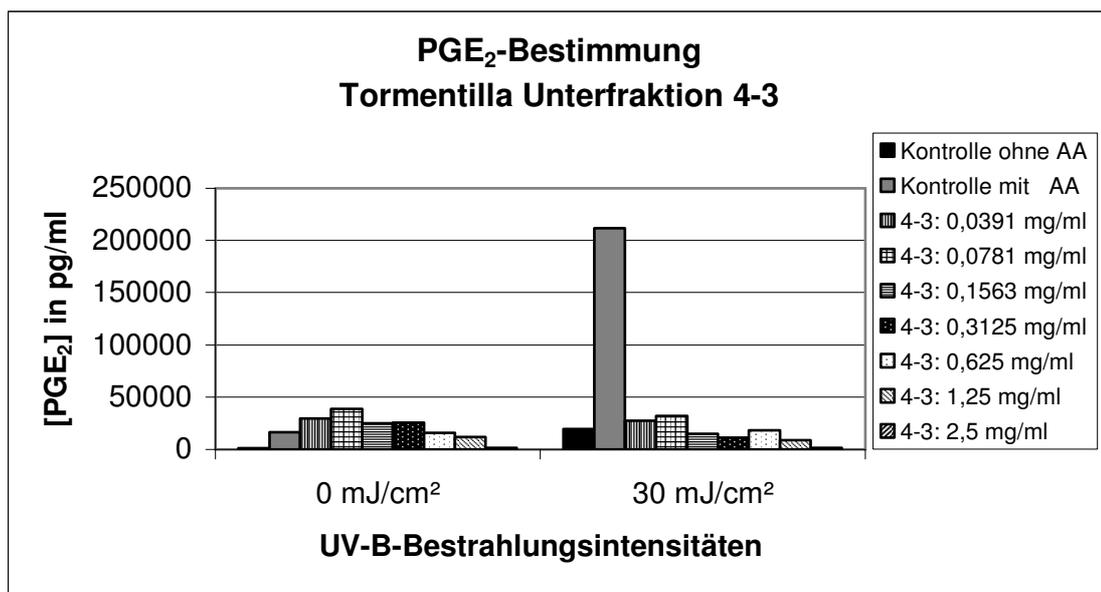


Abb. 45: Die Tormentilla Unterfraktion 4-3 bewirkte auch in niedrigen Konzentrationen eine sehr starke Hemmung der PGE₂-Produktion in HaCaT-Zellen nach UV-B-Bestrahlung. Unter dem Einfluss der Unterfraktion 4-3 in sieben Konzentrationen wurde die PGE₂-Konzentration im Überstand ohne und mit UV-B-Bestrahlung bestimmt. Zum Vergleich wurden zwei Kontrollpaare mitgeführt: je eine Kontrolle (K) ohne und mit Arachidonsäure (AA) inkubiert, jeweils unbestrahlt und bestrahlt. Alle Ansätze außer den „K ohne AA“ wurden für 15 min mit AA inkubiert. Die PGE₂-Konzentrationen wurden mittels *ELISA* (Doppelbestimmung) gemessen.

3.3.7.4. Unterfraktion 4-4: PGE₂-Bestimmung

Da die Wirkungen der beiden Unterfraktionen 4-3 und 4-4 parallel untersucht wurden, wurde für beide nur ein Kontrollpaar verwendet (siehe auch 3.3.7.3). Allgemein lagen in dieser Versuchsreihe die PGE₂-Level der Kontrollen hoch. Durch die Bestrahlung mit UV-B wurde die PGE₂-Konzentration der Kontrollen gesteigert. Nach Bestrahlung kam es in der Kontrolle „K mit AA, bestrahlt“ zur Verachtfachung der PGE₂-Konzentration. In den unbestrahlten Ansätzen mit Unterfraktion 4-4 fanden sich mit Ausnahme der Konzentration 2,5 mg/ml höhere Konzentrationen an PGE₂ als in den unbestrahlten Kontrollen. Unter Zusatz von Unterfraktion 4-4 in der Konzentration 0,0391 mg/ml kam es zu einer weiteren Konzentrationssteigerung an PGE₂. In der Konzentration von 0,0781 mg/ml kam es zum Absinken der PGE₂-Konzentration um 50%. In den höheren Konzentrationen der Unterfraktion 4-4 sank die PGE₂-Konzentration weiter ab, bei 2,5 mg/ml bis auf unter 10% (siehe Abb. 46).

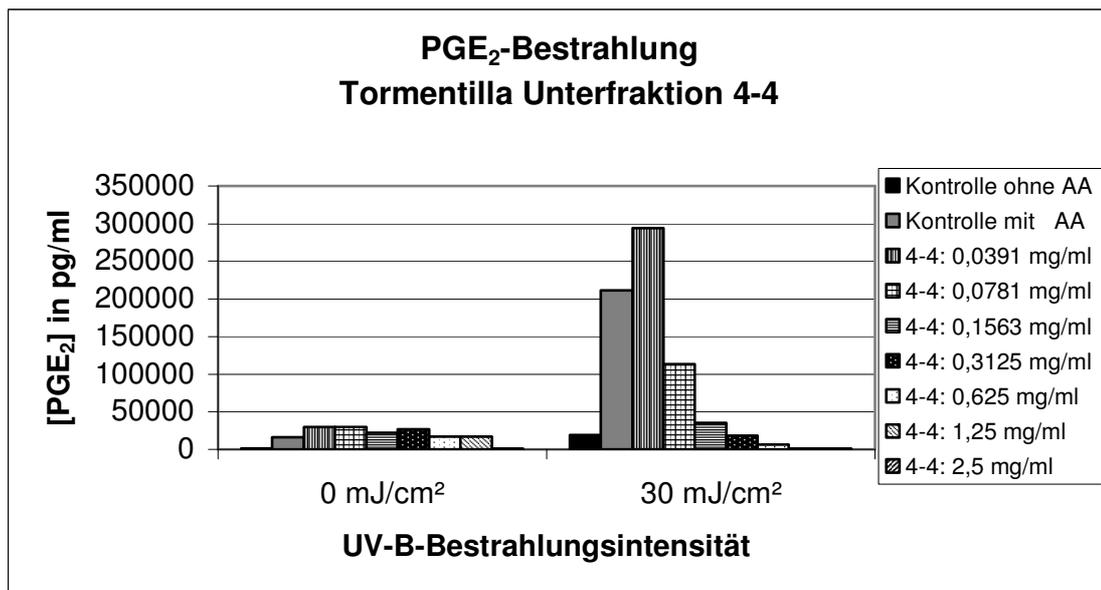


Abb. 46: Unterfraktion 4-4 zeigte eine dosisabhängige Reduktion der PGE₂-Konzentration in HaCaT-Zellen nach UV-B-Bestrahlung. Unter dem Einfluss der Unterfraktion 4-4 in sieben Konzentrationen wurde die PGE₂-Konzentration im Überstand ohne und mit UV-B-Bestrahlung bestimmt. Zum Vergleich wurden zwei Kontrollpaare mitgeführt: je eine Kontrolle (K) ohne und mit Arachidonsäure (AA) inkubiert, jeweils unbestrahlt und bestrahlt. Alle Ansätze außer den „K ohne AA“ wurden für 15 min mit AA inkubiert. Die PGE₂-Konzentrationen wurden mittels ELISA (Doppeltbestimmung) gemessen.

3.4. Saugblasen-Experiment

Auf der Basis der bisherigen Ergebnisse wurde die Unterfraktion 4-3 des Tormentilla-Gesamtextraktes exemplarisch *in vivo* im Saugblasen-Modell überprüft (siehe 2.11.). Die Unterfraktion 4-3 wurde in einer Creme in einer Endkonzentration von 5% eingearbeitet. Eine Stammlösung der Unterfraktion 4-3 wurde zu diesem Zweck frisch hergestellt. Als Salbengrundlage wurde die Basiscreme DAC verwendet. Zu zwei Zeitpunkten wurde die Hautrötung mit Hilfe einer Mexametersonde ermittelt. Die erste Messung fand an Tag 1 vor UV-B-Bestrahlung und vor Auftragung der Creme statt. Die entsprechenden Hautareale wurden mit 180 mJ/cm² bestrahlt und entsprechend behandelt (siehe 2.11.3.). 24 h nach Bestrahlung und Aufbringung der mit Extrakt versetzten Creme fand an Tag 2 eine zweite Messung der Hautrötung statt. Ein Mittelwert aus je drei Messungen jedes Feldes wurde errechnet. Dieser Mittelwert sowie die Differenz zwischen Tag 1 und Tag 2 sind in Tabelle 1 abgebildet. Die Hautrötung ging nach 24 h in jedem Feld leicht zurück.

Tabelle 1: Erythemindex-Werte der vier Felder gemessen an Tag 1 und 2 sowie die entsprechende Differenz. Die Hautrötung der vier Testfelder wurde dreimal kurz vor und 24 h nach UV-B-Bestrahlung gemessen. Aus diesen Werten wurde die Differenz gebildet.

Testfelder	Tag 1	Tag 2	Differenz (Tag 1-Tag 2)
1) Unbestrahlt / unbehandelt	584	567,3	16,7
2) Bestrahlt / unbehandelt	587,3	573	14,3
3) Bestrahlt / DAC	581	559,3	21,7
4) Bestrahlt / Torm. 4-3	575,7	574,3	1,4

Nach erfolgter Messung der Hautrötung wurden die Saugblasen wie in Abschnitt 2.11.3. beschrieben gesetzt und nach der Bildung einer großen Blase die Flüssigkeit abpunktiert. Anschließend wurde im Punktat die Konzentration an PGE₂ bestimmt (siehe 2.9.).

Durch die Behandlung mit Basiscreme DAC mit Zusatz der Unterfraktion 4-3 (Testfeld 4) wurde die PGE₂-Konzentration im Verhältnis zur bestrahlten Blase ohne Behandlung (Testfeld 1) um 30% verringert. Bei der Messung der Blasenflüssigkeit des Feldes, das nur mit DAC behandelt wurde (Testfeld 3), lag die PGE₂-Konzentration um 25% höher als die des bestrahlten und unbehandelten Feldes (Testfeld 2). Die PGE₂-Konzentration der Blasenflüssigkeit mit Behandlung des erwähnten Tormentillaextraktes lag im Vergleich zur unbestrahlten und

unbehandelten Kontrolle um 19% höher. In Abb. 47 sind die Verhältnisse der verschiedenen Felder ersichtlich.

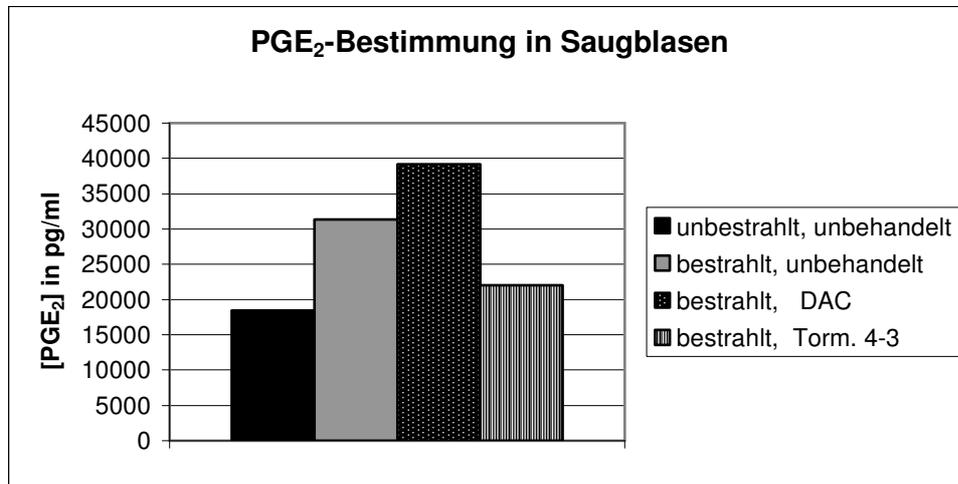


Abb. 47: Tormentilla Unterfraktion 4-3 bewirkte eine Reduktion der im Punktat gemessenen PGE₂-Konzentration nach UV-B-Bestrahlung im Verhältnis zur unbestrahlten Kontrolle um 42%. Drei der Testfelder wurden 24 h vorher mit UV-B bestrahlt (Bestrahlungsintensität: 180 mJ/cm²). Die Kontrollen sind der Legende zu entnehmen. Die PGE₂-Konzentrationen wurden mittels *ELISA* (Doppeltbestimmung) gemessen.

4. Diskussion

In der Dermatologie besteht allgemein ein hoher Bedarf an entzündungshemmenden Medikamenten und das Interesse an pflanzlichen Alternativen ist gerade in letzter Zeit gestiegen (Augustin, 2004 [a]). Trotz des steigenden Interesses sind wissenschaftliche Arbeiten zu diesem Thema nach wie vor rar. Gerade bei chronisch entzündlichen Hauterkrankungen existieren nur wenige Alternativen, die eine gute Wirkung zeigen und bei dauerhafter Anwendung nebenwirkungsarm sind.

In der Phase der akuten Entzündung spielen Prostaglandine eine wichtige Rolle (Löffler, Petrides, 2003). Durch die Aktivierung der COX, insbesondere der COX-2, kommt es zu ihrer vermehrten Synthese aus Arachidonsäure (Brock *et al.*, 1999). Die COX-2 ist durch verschiedene Stimuli induzierbar, hierzu gehören Verletzungen, Infektionen, die akute irritative Kontaktdermatitis sowie UV-Bestrahlung (Muller-Decker *et al.*, 2004).

In dieser Arbeit wurden die fünf Pflanzenextrakte *Potentilla anserina* L., *Rosmarinus officinalis* L., *Salvia officinalis* L., *Usnea barbata* L. und *Potentilla tormentilla* (L.) Raeuschel auf ihr antiinflammatorisches Potential untersucht. Der Schwerpunkt der Untersuchungen lag in der Messung der PGE₂-Konzentration und der Bestimmung der Expression der COX-2, die sich im Laufe von Entzündungsreaktionen charakteristisch verändern und somit durch antiinflammatorische Zusätze beeinflusst werden können.

Die Pflanzenextrakte wurden aus verschiedenen Gründen ausgewählt: zum einen aufgrund von Ergebnissen des zellfreien COX-Inhibitor-Screening-Assay, zum anderen aufgrund der Inhaltsstoffe, über die antioxidative und antiinflammatorische Wirkungen bekannt sind, aufgrund von beschriebenen antiinflammatorischen Eigenschaften in anderen Geweben als der Haut sowie aufgrund von Überlieferungen bezüglich der Anwendungsgebiete. Zusätzlich wurde darauf geachtet, dass die Extrakte kaum Allergisierungspotential besitzen.

Den zellfreien Versuchen schlossen sich *in vitro*-Untersuchungen mit Keratinozyten (HaCaT-Zellen) im Rahmen des UV-B-Modells an.

4.1. UV-B-Modell

Das UV-B-Modell (siehe 2.4.) ist ein gut zu handhabendes und reproduzierbares Modell, um die antiinflammatorischen Effekte von Pflanzenextrakten zu testen. Einflussnehmende Faktoren können konstant gehalten werden, so dass auch

zwischen verschiedenen Extrakten verglichen werden kann. Ein weiterer Vorteil liegt darin, dass das Modell es ermöglicht, eine definierte Entzündungsreaktion zu verursachen, wobei das Modell sowohl *in vitro* als auch *in vivo* angewendet werden kann. Die Ergebnisse von *in vitro*- und *in vivo*-Experimenten unterscheiden sich aus diesem Grund nicht in allen Variablen. Wirkstoffe, die *in vitro* nach UV-Bestrahlung hemmende Wirkung zeigen, können *in vivo* zum Beispiel mit Hilfe des UV-Erythemtests oder in Kombination mit dem Saugblasen-Modell untersucht werden.

4.2. Vorversuche des UV-B-Modells mit HaCaT-Zellen

Die Vorversuche zum UV-B-Modell dienten der Festlegung von Rahmenbedingungen (Bestrahlungsintensität und Inkubationsdauer), um die Voraussetzungen für die Testung der Pflanzenextrakte auf Inhibition im UV-B-Modell zu optimieren. Ashida *et al.* haben gezeigt, dass sich die PGE₂-Konzentration durch eine UV-B-Bestrahlung von HaCaT-Zellen dosisabhängig steigern lässt (Ashida *et al.*, 2003). Die Rahmenbedingungen für den Einsatz von Pflanzenextrakten im UV-B-Modell mussten so ausgewählt werden, dass durch die Bestrahlungsintensität und den Abnahmezeitpunkt eine moderate Schädigung der Keratinozyten erreicht wurde, damit ein mögliches antiinflammatorisches Potential der Extrakte seine Wirkung entfalten konnte. Ziel war es eine Dosis zu finden, die die Zellen zwar reizte, jedoch nur in einem Umfang, der eine Hemmung der Entzündung möglich machen konnte. Die Bestrahlungsintensitäten 15, 30 und 60 mJ/cm² führten zu einem stetigen Anstieg der PGE₂-Konzentration, wohingegen sie bei 120 mJ/cm² wieder absank (siehe 3.2.1.). Dies ist möglicherweise auf eine zunehmende Apoptose der Zellen durch die UV-B-Bestrahlung zurückzuführen, außerdem konnte in der Mikroskopie ein vermehrtes Absterben der Zellen beobachtet werden.

Parallel zu dem Anstieg der PGE₂-Konzentrationen kam es nach UV-B-Bestrahlung zu einer Hochregulation des COX-2-Proteins, wobei sich die Banden bei 30 und 60 mJ/cm² ähnlich stark ausgeprägt darstellten, während die Bestrahlungsintensität 15 mJ/cm² zu keiner klar darstellbaren Bande führte (siehe 3.2.1.). Die Actinkontrolle zeigte die homogene Ladung mit gleichen Mengen an Protein.

Andere Arbeitsgruppen, die anhand des UV-B-Modells in HaCaT-Zellen unterschiedliche Fragestellungen untersuchten, wählten Intensitäten zwischen 10 und 50 mJ/cm² (Blaudschun *et al.*, 2000; Ahn *et al.*, 2002; Ashida *et al.*, 2003). Aufgrund dessen, dass bei 15 mJ/cm² der Reiz im Verhältnis zu den Kontrollen zu gering und bei 120 mJ/cm² zu ausgeprägt ausfiel, wurde zwischen den

Bestrahlungsintensitäten 30 und 60 mJ/cm² ausgewählt. Die Zellen wiesen bei 60 mJ/cm² mikroskopisch jedoch eine größere Schädigung auf als bei 30 mJ/cm², so dass als Bestrahlungsintensität 30 mJ/cm² für alle Versuche mit Pflanzenextrakten verwendet wurde.

Es wurde außerdem der geeignete Zeitpunkt gesucht, der eine ausreichende Produktion von Entzündungsmediatoren gewährleistete, wobei in Anlehnung an Ashida *et al.* zunächst verschiedene Zeitpunkte getestet wurden (Ashida *et al.*, 2003). In den Messungen der Zeitkinetiken konnte eine kontinuierliche Steigerung über die Zeit sowohl der PGE₂-Konzentration als auch der COX-2-Expression nachgewiesen werden, wobei Inkubationszeiträume bis 24 h nach Bestrahlung untersucht wurden (siehe 3.2.2.). Die COX-2 konnte erstmals nach 6 h Inkubation marginal nachgewiesen werden, wobei sich die Expression zur Stunde 12 und 24 steigerte und stark ausgeprägte Banden nachgewiesen werden konnten. Die Banden des Actinnachweis stellten sich inhomogen dar. Sie wurden jedoch aufgrund von schwächer ausgeprägten Actin-Banden bei verstärkt ausgeprägten Banden der dazugehörigen COX-2 und umgekehrt verwertet.

In der Literatur sind Abnahmezeitpunkte bis zu 60 h nach Bestrahlung beschrieben (Blaudschun *et al.*, 2000; Ahn *et al.*, 2002). Aufgrund der Ergebnisse von Ashida *et al.* wurden keine längeren Inkubationsperioden überprüft, da die Arbeitsgruppe ein Absinken der Konzentration an COX-2-Protein in HaCaT-Zellen nach 24 h zeigen konnte (Ashida *et al.*, 2003).

Da zum einen die höchst gemessene Konzentration an PGE₂ und stärkste Steigerung der COX-2-Expression nach 24 h zu verzeichnen war und zum anderen das mikroskopische Aussehen als angemessen bewertet wurde, wurde dieser Zeitpunkt gewählt. Diese Rahmenbedingungen (30 mJ/cm² und 24 h Inkubation) wurden als die geeignete Grundlage für den Einsatz der Pflanzenextrakte im UV-B-Modell angesehen.

4.3. Zytotoxizität der Pflanzenextrakte

Jeder Pflanzenextrakt wurde auf eine mögliche Zytotoxizität hin untersucht. Eine Schädigung der Zellen durch die Extrakte sollte ausgeschlossen werden, da das Risiko einer Hautreizung bei einem eventuellen späteren therapeutischen Einsatz bei entzündlichen Hauterkrankungen minimiert werden sollte. Dies kann durch *in vitro*-Ergebnisse zwar nicht ausgeschlossen werden, jedoch können Anhaltspunkte für eine spätere *in vivo*-Testung gesammelt werden, da eine Einstufung als nicht

zytotoxisch eine beobachtete antiinflammatorische Wirkung eines Extraktes untermauern kann.

Als quantitativer Parameter wurde die LDH-Aktivität (siehe 2.8.2.) und als qualitativer Parameter die mikroskopische Begutachtung (siehe 2.8.1.) eingesetzt. Die Ergebnisse dieser Bestimmungen flossen in die Interpretation der antiinflammatorischen Wirksamkeit der Extrakte ein. Im Rahmen der Experimente konnte bei Zugabe des Rosmarinextraktes eine massive Schädigung der Zellen gezeigt werden (siehe 3.3.2.1.). Die alleinige PGE₂-Messung nach Zusatz von Rosmarinextrakt ließ zunächst eine sehr gute Hemmung durch den Extrakt vermuten. Die Zellen der Ansätze wurden durch den Rosmarinextrakt jedoch dosisabhängig geschädigt, so dass es bei hohen Dosen kaum noch zu einer PGE₂-Produktion kommen konnte, weil ein Großteil der Zellen bereits nicht mehr adhärent war beziehungsweise in Waschschritten entfernt worden war.

Bei einem Großteil der Publikationen, die pflanzliche Substanzen auf ihre *in vitro*-Wirksamkeit testeten, wurden keine Parameter der Zytotoxizität bestimmt oder angegeben. Dies kritisierten Tunon *et al.* schon 1995 in ihrer Übersichtsarbeit über das antiinflammatorische Potential von verschiedenen schwedischen Pflanzen (Tunon *et al.*, 1995). Aufgrund der Ergebnisse dieser Arbeit erscheint eine Untersuchung der Zytotoxizität beim Einsatz von Pflanzenextrakten in Zellkulturen generell sinnvoll, wenn nicht sogar mitentscheidend für die Einstufung der antiinflammatorischen Wirksamkeit, da die Extrakte auch aufgrund von Zytotoxizität und einer möglichen Nekrose beziehungsweise Apoptose eine falsch hemmende Aktivität zeigen können.

4.4. Antiinflammatorische Wirksamkeitstestung der fünf Pflanzenextrakte

Die Extrakte wurden im zellfreien COX-Inhibitor-Screening-Assay untersucht. Dieser Assay ist sehr empfindlich. Es ist möglich, dass Pflanzenextrakte mit dem *EIA*-Assay interferieren und aus diesem Grund keine Enzymhemmung oder sogar einen höheren Wert als die 100%ige Initialaktivität der COX-2 ergeben. Die Ergebnisse sind daher nur als Anhaltspunkte für die weiteren Experimente zu sehen. Dem Screening schloss sich die PGE₂-Messung im UV-B-Modell an. Bei viel versprechenden Ergebnissen wurden diese auf der COX-2-Proteinebene untersucht.

4.4.1. *Potentilla anserina* L.

In der Volksmedizin wird das Gänsefingerkraut unter anderem bei entzündlichen Erscheinungen der Mund- und Rachenschleimhaut eingesetzt (siehe 1.6.1.). Aufgrund dieser überlieferten Anwendungsgebiete und der bekannten Inhaltsstoffe schien der Extrakt für die Testung der Entzündungshemmung in Hautzellen interessant zu sein.

Durch den Einsatz des Extraktes in steigenden Konzentrationen innerhalb des zellfreien COX-Inhibitor-Screening-Assay wurde die COX-2-Aktivität zunächst gesteigert und fiel bei höheren Konzentrationen ab, wobei die Konzentration von 1,2 mg/ml in ähnlichem Ausmaß hemmend auf die COX-2 wirkte wie die 1 µM Indometacin-Kontrolle (siehe 3.1.1.). Die anfängliche Steigerung der Aktivität der COX-2 ist wahrscheinlich auf eine unspezifische Interferenz des Extraktes innerhalb des *EIA*-Arbeitsschrittes zurückzuführen. Ähnliche Interferenzen wurden vom Hersteller *Cayman Chemicals* beschrieben.

Der Einsatz des Anserinaextraktes in den zellbasierten Experimenten veränderte die LDH-Aktivität der Ansätze im Vergleich zu den Kontrollen nicht wesentlich. Bei der mikroskopischen Begutachtung konnten keine auffälligen Veränderungen festgestellt werden. In allen eingesetzten Konzentrationen wurde der Extrakt als nicht zytotoxisch eingestuft (siehe 3.3.1.1.).

Die Ergebnisse der PGE₂-Messung innerhalb der drei Versuchsreihen zeigten eine Inhomogenität der Wirkung des Extraktes mit keiner aussagekräftigen Hemmung. Aufgrund dessen wurde auf eine Detektion des COX-2-Proteins im *Western Blot* verzichtet (siehe 3.3.1.2.).

Die erzielten Ergebnisse lassen keinen Schluss auf ein hemmendes Potential der Anserina zu und stehen damit kontrovers zu den Angaben der Verwendungsgebiete in der Volksmedizin. In der Literatur sind außer ihren überlieferten Eigenschaften, meist in Form von Pflanzenportraits, kaum wissenschaftlich-experimentelle Angaben zu finden.

Tunon *et al.* kamen bei der Untersuchung eines Anserinaextraktes zum gleichen Ergebnis und stufen das Hemmpotential als unbedeutend ein (Tunon *et al.*, 1995).

Diese uncharakteristische, nicht hemmende Wirkung stellt aufgrund ähnlicher Anwendungsgebiete eine Diskrepanz zu der verwandten Blutwurz dar, bei der in dieser Arbeit ein stark entzündungshemmendes Potential beobachtet werden konnte (siehe 4.4.5.). Ein Grund dafür könnten die unterschiedlichen Konzentrationen an

Gerbstoffen der beiden *Potentilla*-Arten sein. Je nach Literaturangaben besitzt die Anserina 2-10% (Jänicke, 2003 [c]; Schulz, 2004 [c]), wohingegen die Blutwurz 15-25% (Jänicke, 2003 [b]; Augustin, 2004 [d]) Gerbstoffe enthält. Einige Autoren bescheinigen der *Potentilla anserina* L. aufgrund der Dominanz des hydrolysierbaren Gerbstoffes Catechin eine Sonderstellung in der Gattung *Potentilla* und befürworten eine gesonderte Einteilung der Anserina (Hager-Rom, 2001 [Anserina]).

Die ihr bescheinigten Wirkungen, die sich wahrscheinlich vor allem durch Überlieferungen bis in die heutige Zeit gehalten haben, beruhen eventuell auch auf ihrer optischen Ähnlichkeit zur Tormentilla.

Eine im Tierexperiment bestätigte antidysmenorrhoeische Wirkung, die ihr früher zugesprochen wurde, konnte nach Fintelmann und Weiss bei Testung am Menschen nicht gefunden werden. Diese Überlieferung hält sich jedoch hartnäckig und Anserina-Zusätze werden weiterhin in Präparaten für dysmenorrhoeische Beschwerden eingesetzt (Fintelmann, 2002 [a]). Dies zeigt die Schwierigkeit, aus neuen Erkenntnissen, die der Volksmedizin widersprechen, Konsequenzen für die Therapie alltäglicher Erkrankungen mit nicht-verschreibungspflichtigen Präparaten zu ziehen. Es wäre somit interessant, die postulierten anderen Wirkungen der Anserina, gerade die der Positivmonographie (siehe 1.6.1.), zu überprüfen und damit ihre Wirksamkeit oder Unwirksamkeit zu zeigen.

Ein hemmender Effekt der Anserina im UV-B-Modell konnte in dieser Arbeit somit nicht gefunden werden und eine weitere Untersuchung der Anserina hinsichtlich einer antiinflammatorischen Wirksamkeit erscheint nicht sinnvoll.

4.4.2. *Rosmarinus officinalis* L.

Huang *et al.* beobachteten im Tiermodell eine entzündungshemmende Wirkung des Rosmarins, vermutlich auf Carnosolsäure beruhend, und schrieben ihm auch eine antioxidative Wirkung zu (Huang *et al.*, 1994). Es schien daher viel versprechend, das antiinflammatorische Potential des Rosmarinextraktes auch in dieser Arbeit zu untersuchen.

Der Rosmarinextrakt zeigte eine deutliche dosisabhängige Hemmung der COX-2-Aktivität im COX-Inhibitor-Screening-Assay (siehe 3.1.2.). Bereits ab einer Konzentration des Extraktes von 0,0125 mg/ml wurde die COX-2-Aktivität um 97% reduziert und war damit gleichwertig der Indometacin-Kontrolle von 10 µM.

Beim Einsatz im zellbasierten Modell zeigte sich, dass der Extrakt die HaCaT-Zellen massiv schädigte und zu einem Ablösen der HaCaT-Zellen von der Unterfläche

führte, wobei teilweise ganze Zellrasenstücke im Überstand zu finden waren. Die Zellen hatten ihre Adhärenz am Petrischalenboden verloren, waren jedoch von normalem Aussehen. Die gemessenen LDH-Aktivitäten waren nicht aussagekräftig, da durch die Waschschriffe und die damit ausgewaschenen Zellen die Zelldichte in den Petrischalen sehr variabel war (siehe 3.3.2.1.). Interessanterweise zeigte Salbei, der die gleichen Leitsubstanzen enthält, in HaCaT-Zellkultur keine vergleichbaren zytotoxischen Effekte (siehe 3.3.3.1.).

Die Ergebnisse der PGE₂-Messung konnten ebenfalls nicht verwertet werden, da die scheinbar dosisabhängige Reduktion wahrscheinlich aufgrund der Schädigung der HaCaT-Zellen durch den Extrakt zustande kam (siehe 3.3.2.2.). Die Detektion der COX-2 wurde daher nicht durchgeführt.

Ohne die zytotoxischen Untersuchungen hätte der Rosmarinextrakt viel versprechend sein können. Da jedoch durch steigende Konzentrationen mehr und mehr Zellen abgelöst und durch die Waschschriffe entfernt wurden, konnten die übrig gebliebenen Zellen dementsprechend weniger PGE₂ nach UV-B-Bestrahlung produzieren. In allen Versuchsreihen stellten sich die Ergebnisse ähnlich dar, wobei selbst bei Verdünnungen bis zu Konzentrationen von 0,0005 mg/ml dieser zytotoxische Effekt zu beobachten war. Dies zeigt die Wichtigkeit der zytotoxischen Bewertung eines Extraktes (siehe 4.3.).

Rosmarinextrakt und Rosmarinsäure werden diverse Wirkungen zugeschrieben, die wiederum zu bestimmten Anwendungsgebieten geführt haben. So wirkt die Rosmarinsäure, die auch in *Salvia officinalis* L. enthalten ist, unspezifisch hemmend auf die Komplementaktivierung sowie mittels Inhibition der Lipoxygenase hemmend auf die Leukotriensynthese (Hänsel, 2004 [b]). Der Rosmarinextrakt wurde von einigen Arbeitsgruppen als antimikrobiell und antioxidativ eingestuft (Mangena *et al.*, 1999; Hager-Rom, 2001 [Rosmarin]; Weckesser, 2006). Diese antioxidativen Eigenschaften macht man sich in der kosmetischen Industrie zu Nutze, wo Rosmarin als *Antiagingmittel* eingesetzt wird. Dermatologische Studien hatten vor der industriellen Nutzung die Wirkung als *Antiagingmittel* bestätigt (Calabrese *et al.*, 2000; del Bano *et al.*, 2003). Rosmarinöl wiederum wirkt hyperämisiertend und wird in der Therapie von rheumatoiden Erkrankungen eingesetzt (Kraft, 2000 [d]).

Aufgrund dieser Forschungsergebnisse müssen die Ergebnisse dieser Arbeit bezüglich des Rosmarinextraktes kritisch gesehen werden. Laut Hänsel und Sticher ist eine Hautreizung durch Rosmarin umstritten und wird kontrovers diskutiert

(Hänsel, 2004 [b]). Eine Erklärung für diese kontroverse Diskussion könnten die in ihren Zusammensetzungen unterschiedlichen Rosmarinextrakte darstellen. Das UV-B-Modell mit HaCaT-Zellen ist möglicherweise in diesem Zusammenhang nicht optimal zur Beurteilung der Wirkung des Rosmarinextraktes. Eine Testung im UV-Erythemtest könnte eventuell zeigen, ob der verwendete Extrakt auch *in vivo* toxisch beziehungsweise hautschädigend wirkt. Im Rahmen des UV-Erythemtests ist es zudem möglich den Extrakt auf eine Entzündungshemmung zu überprüfen. Es wäre außerdem interessant, unterschiedliche Rosmarinextrakte und Reinsubstanzen auf ihre Verträglichkeit zu testen. Dies wäre sicherlich auch im Hinblick auf die Popularität der Pflanze im alltäglichen Leben von Relevanz, um gegebenenfalls bei anfälligen Patienten von einer äußerlichen Behandlung mit Rosmarin abraten zu können.

Im Rahmen der Experimente konnte aufgrund der zytotoxischen Eigenschaft des untersuchten Rosmarinextraktes eine antiinflammatorische Wirkung weder bejaht noch verneint werden. Aufgrund der in der Literatur beschriebenen Inhibition und der zusätzlichen antimikrobiellen Eigenschaft der Pflanze ist es sicherlich sinnvoll diese näher zu untersuchen.

4.4.3. *Salvia officinalis* L.

Salbei wird in der Volksmedizin gegen Juckreiz, bei Fieber, Mund- und Rachenentzündungen, nervösen Zuständen, Appetitstörungen sowie bei Verdauungsstörungen angewendet. Entzündungshemmende Wirkungen sind zum Teil beschrieben worden. So wurde *Salvia miltiorrhiza* (chinesischer Salbei) eine antientzündliche Wirkung bescheinigt (Kim *et al.*, 2002). Auch im Tiermodell konnten Baricevic *et al.* eine Inhibition eines durch Kroton induzierten Ödems am Mäuseohr durch Salbei und seine Inhaltsstoffe zeigen. Ursolsäure war hierbei wesentlich für die Entzündungshemmung verantwortlich (Baricevic *et al.*, 2001). Es schien daher interessant, das antiinflammatorische Potential des Salbeiextraktes zu untersuchen.

Im Rahmen des COX-2-Inhibitor-Screening-Assay zeigte Salbei eine dosisabhängige Hemmung der COX-2, wobei bei einer Konzentration von 0,03 mg/ml eine Hemmung vergleichbar mit der von 1 μ M Indometacin erreicht wurde (siehe 3.1.3.). Die Resultate der LDH-Messung und der mikroskopischen Begutachtung ließen eine Einstufung als nicht zytotoxisch zu (siehe 3.3.3.1.). Salbei hatte durchgehend inhibitorischen Einfluss auf die PGE₂-Produktion, jedoch unterschied sich das Ausmaß der Hemmung innerhalb der drei Versuchsreihen (siehe 3.3.3.2.). Ein Grund

der hier gefundenen unterschiedlich starken Hemmungen könnte die schwierige Handhabung bei Herstellung und Lagerung der Stammlösung des Extraktes sowie das schlechte Lösungsverhalten von *Salvia officinalis* sein. Durch vorangegangene Untersuchungen zur Herstellung einer Stammlösung des Extraktes wurde bereits versucht dies bestmöglich zu lösen (Weckesser, 2006).

Auf Ebene des COX-2-Proteins zeigte sich in keiner der Konzentrationen eine Hemmung. Die COX-2-Banden stellten sich unter dem Einfluss aller Konzentrationen ähnlich dar. Der zur Ladungskontrolle durchgeführte Actinnachweis stellte sich zum Teil inhomogen dar. Da trotz steigender Konzentration die Bande der COX-2 sich homogen darstellte, wurde die Kontrolle verwertet (siehe 3.3.3.3.). Dieses Ergebnis deckte sich mit Kim *et al.*, die bei der Untersuchung von einem Extrakt aus *Salvia miltiorrhiza* zeigen konnten, dass dieser hemmend auf die PLA₂, nicht jedoch hemmend auf die COX-2 wirkte (Kim *et al.*, 2002). PLA₂ konnte aus diesem Grunde keine Arachidonsäure (AA) aus Lipidmembranen lösen, wodurch die PGE₂-Konzentration sank. *Salvia officinalis* L., die in dieser Arbeit untersuchte Salbeiart, könnte aufgrund der Ähnlichkeit ebenfalls hemmend auf die PGE₂-Konzentration wirken, ohne dabei hemmend auf die COX-2 zu wirken. Dies könnte eine Erklärung für die beobachteten Effekte des Salbeis in Zellkultur, nämlich den mehr oder weniger ausgeprägten hemmenden Einfluss auf die PGE₂-Konzentration und die ungehemmte Hochregulation der COX-2 durch UV-B-Bestrahlung, sein. Die Hemmung durch *Salvia officinalis* L. könnte außerdem stärker sein als gemessen, da die Ansätze mit AA inkubiert wurden und somit die hochregulierte COX-2 viel Substrat umsetzen konnte. Dies würde nur unter der Voraussetzung gelten, dass ein ähnlicher Hemmungsmechanismus wie bei *Salvia miltiorrhiza* besteht.

Von S. Hornstein konnte in einem UV-Erythemtest eine signifikante Wirkung des Salbeiextraktes *in vivo* nachgewiesen werden. Diese war mit der Wirkung des eingesetzten Hydrokortisons vergleichbar (Hornstein, 2004).

In verschiedenen Arbeiten wird über eine antimikrobielle Wirkung von Salbeiextrakten gegenüber einigen Bakterien berichtet, wobei im Rahmen der Doktorarbeit von S. Weckesser der antimikrobielle Hemmeffekt als gering eingestuft und die therapeutische Relevanz als gering angesehen wurde (Roth, 1994; Sattar *et al.*, 1995; Weckesser, 2006).

In dieser Arbeit konnte eine hemmende Tendenz des Salbeiextraktes gefunden werden. Eine weitere Prüfung des Salbeiextraktes mit Hilfe eines anderen Modells,

unter anderem ohne Gebrauch von Arachidonsäure, ist daher als sinnvoll anzusehen. Gerade die Kombination von antibakteriellen (auch wenn in geringem Umfang) und antiinflammatorischen Eigenschaften in einem Extrakt wäre für den Einsatz in der Dermatologie interessant.

4.4.4. *Usnea barbata* L.

Die Bartflechte wirkt gegen verschiedene bakterielle und virale Erreger, wobei die meist getestete Usninsäure auch gegen multiresistente Keime wirksam ist (Lauterwein *et al.*, 1995). Verschiedene Keime, die empfindlich gegenüber Usninsäure sind, sind oft als Erreger bei entzündlichen Hauterkrankungen zu finden. Laut Cocchietto *et al.* liegen bisher keine *in vitro*-Untersuchungen einer antiinflammatorischen Wirkung der Bartflechte und insbesondere der Usninsäure vor (Cocchietto *et al.*, 2002). Eine Testung auf eine antiinflammatorische Wirkung des Extraktes in Hautzellen schien unter anderem aus diesen Gründen interessant zu sein.

Im COX-2-Inhibitor-Screening-Assay verringerte der auf 4% Usninsäure standardisierte CO₂-Extrakt der Bartflechte zwar die Aktivität dosisabhängig, jedoch lagen die Werte über der 100%ige-Initialaktivität (siehe 3.1.4.). Dies ist wahrscheinlich als eine Interferenz mit dem COX-2-Inhibitor-Screening-Assay zu sehen (laut Anmerkungen des Hersteller *Cayman Chemicals*). Im Zellmodell zeigte *Usnea* in den eingesetzten Konzentrationen keine zytotoxischen Eigenschaften. Es zeigten sich bei allen Versuchsreihen keine nennenswerten mikroskopischen Veränderungen sowie keine Erhöhung der LDH-Aktivitäten (siehe 3.3.4.1.).

Al Bekairi *et al.* beschrieben nach oraler Gabe von Usninsäure einen reversiblen, jedoch eher zytostatischen als zytotoxischen Effekt im Mausmodell (al-Bekairi *et al.*, 1991). Die Arbeitsgruppe Kumar *et al.* untersuchte die Wirkung von Metaboliten verschiedener Lichenarten (unter anderem Usninsäure) in HaCaT-Zellen, wobei sie eine antiproliferative Wirkung feststellen konnten, die vermutlich auf einem zytostatischen Effekt beruht (Kumar *et al.*, 1999). Sie konnten ebenfalls keine Erhöhung der LDH und somit keinen zytotoxischen Effekt auf HaCaT-Zellen feststellen. Die antiproliferative Wirkung des *Usnea*extraktes konnte in einem Versuch mit HaCaT-Zellen in der Arbeitsgruppe Schempp bestätigt werden (Daten nicht veröffentlicht).

Durch den *Usnea*extrakt konnte die induzierte PGE₂-Produktion in bestrahlten HaCaT-Zellen deutlich dosisabhängig reduziert werden (siehe 3.3.4.2.). Die drei

durchgeführten Versuchsreihen zeigten konstante Ergebnisse. Der Extrakt führte bereits in einer Konzentration von 0,0781 mg/ml zur Halbierung der PGE₂-Konzentration im Vergleich zu den Kontrollen. Im *Western Blot* konnte gezeigt werden, dass diese antiinflammatorische Potenz durch die Suppression des COX-2-Proteins hervorgerufen wurde (siehe 3.3.4.3.). Die Banden der HDAC-2-Ladungskontrollen stellten sich bei allen Ansätzen in einer ähnlichen Stärke dar und zeigten die gleiche Proteinladung an.

Vijayakumar *et al.* konnten bei Ratten ein Karrageen-induziertes Ödem (Inflammation) durch Usninsäure dosisabhängig reduzieren (Vijayakumar *et al.*, 2000). Bei Mäusen konnten Okuyama *et al.* nach oraler Gabe einen analgetischen und antipyretischen Effekt der Usninsäure zeigen (Okuyama *et al.*, 1995).

In der Literatur wird beschrieben, dass Usninsäure ein breites antibakterielles Spektrum aufweist (Dobrescu *et al.*, 1993; Lauterwein *et al.*, 1995; Cocchietto *et al.*, 2002; Ingolfsdottir *et al.*, 2002). Verschiedene Bakterien, insbesondere Propionibakterium acnes oder Corynebakterien, Hefepilze und Pityrosporon, die zur Entstehung von Akne, Rosacea und unreiner Haut beitragen, konnten durch Bartflechtenextrakt gehemmt werden (Weckesser, 2006).

Der hier verwendete Usneaextrakt weist potentiell eine sehr starke antiinflammatorische Wirksamkeit auf. Damit konnte gezeigt werden, dass dieser Extrakt nicht nur über gute antibakterielle Eigenschaften, sondern auch über eine ausgezeichnete entzündungshemmende Wirkung verfügt. Wie oben beschrieben hat der Extrakt zudem auch einen antiproliferativen Einfluss auf HaCaT-Zellen (Kumar *et al.*, 1999). Aufgrund dessen könnten Extrakte der *Usnea barbata* für die Behandlung verschiedenster Erkrankungen in der Dermatologie in Frage kommen. Die proliferationshemmende Wirkung könnte beispielsweise bei Hauterkrankungen genutzt werden, die mit einer überschießenden Proliferation einhergehen, wie zum Beispiel der Psoriasis vulgaris. Vor allem auch bei entzündlichen Erkrankungen des seborrhoischen Formenkreises wie zum Beispiel Rosacea, seborrhoisches Ekzem und Akne wäre der Einsatz aufgrund der kombinierten antiinflammatorischen und antibakteriellen Eigenschaften von großem Nutzen. Leichte bis mittelschwere Formen von Akne werden normalerweise mit verschiedenen Lokaltherapeutika behandelt. Zu den üblichen Behandlungsmitteln gehören Peelings (z.B. Benzoylperoxid, Glykolsäure), Antibiotika (z.B. Erythromycin, Clindamycin und Tetrazyklin) und Vitamin A-Säure-Derivate, wobei diese eingesetzten Wirkstoffe aus

verschiedenen Gründen problematisch sind (Leyden *et al.*, 2004). Die lokale Anwendung der Antibiotika ist zwar wirksam, jedoch können Resistenzen entstehen. Dies kann den Einsatz dieser Antibiotika bei anderen schweren Infektionen erschweren (Leyden *et al.*, 2004). Benzoylperoxid und Vitamin A-Säure führen unter anderem zu ausgeprägten Hautreizungen (Braun-Falco, 2005 [b]). Diese eingesetzten Substanzen haben keine nennenswerte entzündungshemmende Wirkung. Aknepatienten, die meist Jugendliche sind, könnten mit einem natürlichen Usnea-basierten Pflegekonzept behandelt werden, welches den Einsatz von Antibiotika reduzieren oder sogar überflüssig machen könnte. Die antioxidativen Eigenschaften des Extraktes könnten eine Kombination mit oxidationsempfindlichen Substanzen möglich machen und damit könnte eine synergistische Wirkung erzielt werden.

Allergien gegen Flechtensäuren, die in der Bartflechte enthalten sind, sind zwar beschrieben, jedoch handelt es sich meist nur um Fallberichte (Heine *et al.*, 1987; Hausen *et al.*, 1993; Hahn *et al.*, 1995; Rademaker *et al.*, 2000). Das sensibilisierende Potential wird als gering eingestuft und wird in der Regel durch andere Flechtensäuren als Usninsäure bedingt. Davon ausgehend sollten bevorzugt Extrakte eingesetzt werden, die einen möglichst geringen Anteil an anderen Flechtensäuren enthalten.

Klinische Untersuchungen zur antiinflammatorischen Wirkung von Usneaextrakt in der Haut liegen bisher nicht vor. Zur fortführenden Untersuchung der antiinflammatorischen Effekte des Bartflechtenextraktes wären *in vivo*-Experimente sinnvoll. Diese könnten im Rahmen von UV-Erythemtest-Studien und Saugblasen-Experimenten erfolgen. Interessant wäre auch ein Therapieversuch bei Akne vulgaris, Psoriasis und bei Patienten, die an Atopischer Dermatitis leiden.

4.4.5. *Potentilla tormentilla* (L.) Raeuschel-Gesamtextrakt

Aufgrund von Überlieferungen wird die Blutwurz unter anderem bei leichten Schleimhautentzündungen im Mund- und Rachenraum und bei unspezifischen Durchfallerkrankungen eingesetzt (Fintelmann, 2002 [b]). Entzündungshemmende Wirkungen dieser Pflanze wurden zum Teil beschrieben, jedoch finden sich keine Aussagen bezüglich einer Hemmung von Entzündungen der Haut.

Bei dem als Screening dienenden COX-2-Inhibitor-Screening-Assay reduzierte sich die Initialaktivität der COX-2 durch Zugabe des Tormentilla-Extraktes dosisabhängig, jedoch lag sie oberhalb dieser (siehe 3.3.5.), woraufhin eine Interferenz des

Extraktes nicht ausgeschlossen werden konnte (siehe Anmerkungen des Herstellers *Cayman Chemicals*).

Durch den Zusatz des Tormentilla-Gesamtextraktes zu den unbestrahlten Ansätzen wurde mit steigender Konzentration eine erhöhte LDH-Aktivität gemessen, wobei die bestrahlten Ansätze LDH-Aktivitäten auf dem Level der bestrahlten Kontrollen aufwiesen (siehe 3.3.5.1.). Unbestrahlt stieg die Zytotoxizität somit potentiell, wohingegen die UV-B-Bestrahlung auf diese einen hemmenden Einfluss zu haben schien. Die Mikroskopie zeigte jedoch in keinem Ansatz mit Zusatz des Tormentilla-Gesamtextraktes ein vermehrtes Zellsterben. Im Gegenteil, es waren im Durchschnitt weniger abgestorbene Zellen im Kulturmedium zu finden. Zwischen den unbestrahlten und bestrahlten Ansätzen unter Einfluss des Tormentilla-Gesamtextraktes waren keine Unterschiede in der Mikroskopie zu sehen. Des Weiteren war die dosisabhängige Steigerung der LDH-Aktivitäten nur in dieser Versuchsreihe-2 (V-2) zu finden. Zusätzlich gab es aus unklaren Gründen in dieser Messreihe Schwierigkeiten bei den LDH-Messungen, in der Weise, dass das Gerät zum Teil erst nach mehrmaligen Messversuchen die LDH-Aktivität in der Probe bestimmen konnte.

Die LDH-Aktivitätsmessungen des Tormentilla-Gesamtextraktes wurden zur Kenntnis genommen, jedoch wird nicht von einer allgemein gültigen Zytotoxizität ausgegangen. Gegen eine generelle Zytotoxizität sprechen auch die Befunde der Mikroskopie und die Werte der LDH-Aktivitätsmessungen der anderen Versuche. Letztendlich lässt sich nur vermuten, dass der Extrakt eventuell durch UV-B in einer Weise verändert wurde, so dass der Extrakt keine Zytotoxizität mehr aufweist. Der Überstand enthielt feine braun-rötliche Partikel des Tormentilla-Gesamtextraktes, die auch nach Zentrifugation in der Probe enthalten waren. Die Messung erfolgte nicht im roten Spektralbereich, so dass die Farbe des Überstandes als Grund nicht wahrscheinlich ist. Eventuell könnte die Menge der Partikel mit der Messung interferiert haben. Aufgrund von Angaben des Herstellers über Interferenzen könnte auch dies zur Erklärung beitragen.

Die PGE₂-Produktion wurde durch den Tormentilla-Gesamtextrakt in hohem Maße dosisabhängig gehemmt (siehe 3.3.5.2.). Die ausgezeichnete Hemmung zeigte sich in allen drei Versuchsreihen. Der daraufhin durchgeführte *Western Blot* zeigte ebenfalls auf Ebene des COX-2-Proteins eine deutliche Reduktion der Expression ab einer Konzentration des Tormentilla-Gesamtextraktes von 0,0625 mg/ml (siehe

3.3.5.3.). Der Actinnachweis als Ladungskontrolle stellte sich zwar inhomogen dar, wurde jedoch verwertet, da sich bei marginalen Actin-Banden kräftige COX-2-Banden detektieren ließen und umgekehrt.

Aufgrund der hervorragenden Hemmeigenschaften der Tormentilla und der Diskrepanz der Ergebnisse zwischen Anserina (siehe auch 4.4.1.) und Tormentilla schien es interessant, das entzündungshemmende Prinzip näher einzugrenzen und eventuell eine Stoffgruppe beziehungsweise einen Stoff identifizieren zu können. Der Gesamtextrakt der Tormentilla wurde in Fraktionen unterteilt und deren entzündungshemmendes Potential wurde einzeln untersucht.

4.4.6. Fraktionen 1, 2, 3, 4 des Tormentilla-Gesamtextraktes

Die vier Fraktionen des Tormentilla-Gesamtextraktes (Schema siehe 2.7.) zeigten in der Mikroskopie keine besonderen Auffälligkeiten. Im Rahmen der LDH-Aktivitätsbestimmung zeigten sich lediglich in Fraktion 1 und 2 erhöhte LDH-Aktivitäten bei einer Konzentration von 2,5 mg/ml, wobei dies durch die hohe Konzentration zu erklären ist. Fraktion 3 und 4 zeigten selbst in hohen Konzentrationen keine Erhöhung der LDH-Aktivitäten.

Insgesamt konnte eine ausgezeichnete entzündungshemmende Wirkung festgestellt werden. Die Fraktionen wiesen jedoch Unterschiede auf. Fraktion 1 zeigte eine leichte Hemmung, wobei Fraktion 2 stärker hemmte (siehe 3.3.6.2. und 3.3.6.4.). Die Fraktionen 3 und 4 zeichneten sich durch eine noch stärkere hemmende Wirkung aus, wobei Fraktion 4 das höchste Inhibitionspotential aufwies (siehe 3.3.6.6. und 3.3.6.8.). Zudem war die Fraktion 4 um den Faktor 10 niedriger dosiert als die anderen Fraktionen. HWI-Analytik konnte als Hauptkomponente Agrimoniin identifizieren. Um die Wirksubstanz näher einzugrenzen, wurde die Fraktion 4 in weitere Unterfraktionen aufgeschlüsselt. Fraktion 3 wurde nicht unterteilt, da laut HWI-Analytik in Fraktion 3 ähnliche Substanzen wie in Fraktion 4, jedoch in niedrigeren Konzentrationen enthalten sind.

4.4.7. Unterfraktionen 4-1, 4-2, 4-3, 4-4 der Fraktion 4

Die vier Unterfraktionen der Fraktion 4 (Schema siehe 2.7.) zeigten alle ein ausgezeichnetes Hemmungsvermögen. Meist lag schon durch die niedrigste eingesetzte Konzentration (0,0391 mg/ml) eine aussagekräftige Hemmung vor (siehe

3.3.7.). Die Unterfraktion 4-3 wurde als Testsubstanz für den Saugblasen-Versuch ausgewählt.

4.4.8. Zusammenfassende Diskussion der Tormentilla-Extrakte

Die potentiell entzündungshemmende Wirkung der Tormentilla übertraf die Erwartungen. Durch den Extrakt wurden die untersuchten Entzündungsparameter PGE₂ und COX-2 in HaCaT-Zellen selbst bei niedrig eingesetzten Konzentrationen stark reduziert. Als Hauptkomponente der wirksamsten Fraktionen konnten polymere Gerbstoffe eingegrenzt werden.

In einem daraufhin durch die Arbeitsgruppe von Prof. Schempp durchgeführten UV-Erythemtest *in vivo* wurde ein signifikantes antiinflammatorisches Potential der Blutwurz nachgewiesen, das mit der Wirkung von Hydrokortison vergleichbar ist (Hornstein, 2004). Ein Potential dieser Art konnte bisher für keinen Pflanzenextrakt gezeigt werden. Zudem wurde von der Arbeitsgruppe von Prof. Schempp ein Pilotprojekt bei der Therapie der Atopischen Dermatitis durchgeführt. Vier Probanden therapierten ihre Hautläsionen mit einer tormentillahaltigen Creme. Dadurch verbesserten sich die Hautläsionen oder heilten ganz ab.

Über eine antiinflammatorische Wirkung der Tormentilla im Rahmen von Hauterkrankungen sind bis jetzt keine Veröffentlichungen erschienen. Entzündungshemmende Wirkungen sind zwar beschrieben, jedoch meist nicht wissenschaftlich belegt. So beschreiben Hänsel und Sticher eine antiinflammatorische Wirkung ohne diese näher zu bezeichnen und charakterisieren (Hänsel, 2004 [c]). Tunon *et al.* testeten verschiedene einheimische Pflanzen Schwedens auf ihre antiinflammatorische Wirksamkeit, wobei *Potentilla tormentilla* in ihrem Modell in die Gruppe der wirkungsvollsten Pflanzenextrakte eingeordnet wurde (Tunon *et al.*, 1995). Ellagitannine, die auch in der Tormentilla enthalten sind, haben bekannte antiinflammatorische Eigenschaften. Sie hemmen die Hyaluronidase und Cyclooxygenase und blockieren die Degranulierung von Mastzellen (Bos *et al.*, 1996). Procyanidine der Blutwurz sind Radikalfänger, die Superoxid-Anionen neutralisieren und die Lipidperoxidation verhindern (Vennat *et al.*, 1994; Bos *et al.*, 1996). Nach Fintelmann und Weiss ist die Blutwurz die wichtigste und ergiebigste Gerbstoffdroge Deutschlands, worin wahrscheinlich ihre ausgezeichnete Wirkung im Verhältnis zu anderen Mitgliedern der *Rosacea*-Familie liegen könnte (Fintelmann, 2002 [b]). Ihr Gehalt an Gerbstoffen variiert von 15-25% (Jänicke, 2003 [b]; Augustin,

2004 [d]). Zudem wirken Agrimoniin, als die Hauptkomponente der Fraktion 4, und andere Tannine proliferationshemmend (Kashiwada *et al.*, 1992; Murayama *et al.*, 1992).

Eine proliferationshemmende Wirkung kann bei Hauterkrankungen genutzt werden, die mit einer überschießenden Proliferation einhergehen. Der Prototyp einer solchen Hautkrankheit ist die Psoriasis. Eine proliferationshemmende Wirkung kann sich auch günstig auf entzündliche Hautkrankheiten wie die Atopische Dermatitis auswirken. Deshalb können allgemein auch Proliferations-Assays wichtige erste Anhaltspunkte für eine Wirksamkeit von Pflanzenextrakten liefern.

Verschiedene Kortisonpräparate stellen nach wie vor die Standardtherapie dar. Diese haben jedoch Nebenwirkungen, in Abhängigkeit von der Wirkstärke, die zu einer Verdünnung der Haut, Hautblutungen, Bindegewebsschwäche und Hautinfektionen führen können (Aktories, 2005; Braun-Falco, 2005 [a]). Ein anderer Therapieansatz für die lokale Anwendung stellen neue Immunsuppressiva wie Tacrolimus und Pimecrolimus dar. Aufgrund ihrer immunsuppressiven Wirkung fördern sie jedoch das Risiko von schweren Hautinfektionen (Nghiem *et al.*, 2002; Graham-Brown *et al.*, 2003). Die bisher verfügbaren pflanzlichen Präparate zeigen gerade im Vergleich zu den kortisonhaltigen Präparaten keine ausreichende Wirkung.

Bereits 1963 wurde gezeigt, dass Extrakte der Blutwurz das Wachstum verschiedener Bakterien hemmen (Pourrat *et al.*, 1963). Diese zusätzliche Eigenschaft kann entzündliche Hauterkrankungen positiv beeinflussen, da Bakterien bei der Genese dieser Erkrankungen zum Teil eine Rolle spielen können.

Zudem sind bis jetzt keine Kontaktsensibilisierungen oder Kontraindikationen beschrieben worden (Kraft, 2000 [c]; Schulz, 2004 [b]). Nebenwirkungen werden lediglich bei innerlicher Anwendung bekannt (Augustin, 2004 [d]).

Auf diesen Grundlagen könnte eine Blutwurz enthaltende Creme zur Behandlung entzündlicher Hautkrankheiten, wie zum Beispiel der Atopischen Dermatitis, entwickelt werden. Mit einer entzündungshemmenden Grundlage, wie die Tormentilla sie darstellen könnte, könnte ein Fortschritt auf dem Gebiet der zum Teil schweren chronisch entzündlichen Hauterkrankungen gelingen. Dies würde für die Patienten eine nebenwirkungsärmere und trotzdem wirksame Therapieoption zu den herkömmlichen Medikamenten darstellen. Eine Verwendung bei entzündlichen Hauterkrankungen, insbesondere der Atopischen Dermatitis ist bisher nicht bekannt

und könnte gerade bei Kindern aufgrund der Nebenwirkungsprofile der aktuellen Behandlungskonzepte eine Alternative zu den Standardtherapeutika darstellen. Weiterführende *in vitro* und *in vivo*-Untersuchungen sollten erfolgen, auch um den genauen Wirkmechanismus der Tormentilla zu klären.

4.5. Saugblasen-Experiment

Das Saugblasen-Modell stellt, wie in 1.5. beschrieben, eine Möglichkeit zur lokalen Messung von Entzündungsvorgängen der Haut dar. Entzündungsparameter, die von Hautzellen gebildet worden sind, können quantitativ und qualitativ nachgewiesen werden (Macdonald *et al.*, 2006). In dieser Arbeit wurde überprüft, ob die Tormentilla-Unterfraktion 4-3 die Konzentration des nach UV-B-Bestrahlung durch Keratinozyten vermehrt produzierten proinflammatorischen PGE₂ vermindern kann. Es ging um die exemplarische Prüfung des Modells und darüber hinaus um die Überprüfung des Versuchsaufbaus und dessen Optimierung für zukünftige Experimente.

Der Versuch wurde wie in 2.11. beschrieben durchgeführt. Die Erythemmessungen 24 h nach Bestrahlung ergaben überraschenderweise eine minimale Verringerung der Hautrötung im Vergleich zu den Messungen vor Bestrahlung (siehe 3.4.). In allen Feldern konnten univakuoläre Blasen produziert werden, wobei die Blase im Feld mit Behandlung des Tormentillaextraktes im Verhältnis zu den anderen Blasen länger bis zur vollen Ausbildung benötigte. Durch den Extrakt wurde die PGE₂-Konzentration im Verhältnis zu den bestrahlten Feldern reduziert, was eine entzündungshemmende Wirkung des Tormentillaextraktes auch *in vivo* wahrscheinlich macht. Zur definitiven Klärung dieser Tendenz sind weitere Untersuchungen erforderlich. Trotz der nicht optimalen Bedingungen dieses Experimentes lässt sich vermuten, dass die im Zellkultur-Modell nachgewiesenen antiinflammatorischen Wirkungen der Unterfraktion 4-3 des Tormentillaextraktes bei Optimierung des Saugblasen-Modells auch *in vivo* bestätigt werden können.

Während und nach der Durchführung des Experimentes stellten sich einige Probleme dar, die für zukünftige Untersuchungen berücksichtigt werden sollten. So war die UV-B-Bestrahlung (180 mJ/cm²) zu unerschwellig gewählt. Die gemessenen Werte des Erythemindex, die lediglich minimale Schwankungen nach Bestrahlung zeigten, sind als Tagesschwankungen zu sehen. Trotz der zu niedrig gewählten Intensität der UV-B-Bestrahlung wurde zwar keine Reaktion auf der Haut, jedoch in

der Haut hervorgerufen. Dies zeigt sich an den gemessenen PGE₂-Konzentrationen der Kontrollen.

Die Bestrahlungsintensität und die abgeschätzte minimale Erythemdosis (MED) des Probanden wurden auf Basis von Erfahrungswerten festgelegt. Aufgrund von intraindividuellen Schwankungen sollte bei weiteren Versuchen eine vorherige Ermittlung der individuellen minimalen Erythemdosis durch eine Lichttreppe in Erwägung gezogen werden, wodurch eine definitivere Bestrahlung des Probanden gewährleistet wäre. Dies kann am Rücken durchgeführt werden und würde die begrenzte Fläche der Unterarme nicht verringern. Trotz der unterschiedlichen Lokalisationen (Rücken und Unterarm) kann eine minimale Erythemdosis bestimmt werden (Jocher *et al.*, 2005).

Beim Entstehen der Saugblasen wurde eine verspätete Entwicklung der Blasen, die mit Tormentilla behandelt wurden, beobachtet. Die Blutwurz bewirkt eine vermehrte Produktion von Kollagen VII und damit eine Stabilisierung der dermoepidermalen Junktionszone (siehe Patentschrift DE 697 19 366 T2). Dies könnte eine mögliche Erklärung für die Latenz bei der Ausbildung der Blase sein.

Die Penetrationsfähigkeit ist durch klinische Tests (UV-Erythemtest) bereits gezeigt worden (Daten nicht veröffentlicht). Durch weitere Versuche müsste auch geklärt werden, ob die Salbengrundlage (Basiscreme DAC) geeignet ist. Die Grundlage soll bei alleiniger Anwendung möglichst keinen Effekt zeigen und die Haut nicht reizen (Jocher *et al.*, 2005).

Als Alternative könnte man in weiteren Versuchen Biopsien entnehmen, diese zum Beispiel immunhistochemisch aufarbeiten und die Konzentration an COX-2 nachweisen. Dieses Verfahren wäre zeitsparender, jedoch entsteht eine bleibende Narbe. Des Weiteren ist zu überlegen, ob anhand des UV-Erythemtests oder anderer Modelle die antientzündliche Aktivität der Pflanzenextrakte in größerem Rahmen besser überprüft werden könnte. Nachteil des UV-Erythemtests ist jedoch, dass nur der *Blanching*-Effekt gemessen werden kann (Jocher *et al.*, 2005). Andere Effekte können damit nicht gemessen werden. Daher können falsch negative Beurteilungen gefällt werden, da nicht alle Extrakte über diesen Effekt verfügen (Jocher *et al.*, 2005).

Bis eine univakuoläre Blase entstanden ist, kann es bis zu vier Stunden dauern. Dieses Modell erfordert somit eine relativ lang andauernde *Compliance*, da der Proband in dieser Zeit eine sitzende Position einnehmen muss und die Arme

möglichst nicht bewegen sollte. Aufgrund der Anordnungsmöglichkeiten auf den Unterarminnenseiten ist die Anzahl an Saugblasen begrenzt und es können nur wenige Testfelder in einem Experiment bearbeitet werden.

Für den Probanden ist die Prozedur schmerzarm. Es wurde ein leichtes Druckgefühl und Ziehen beschrieben. Aufgrund der rein topischen Anwendung der Extrakte und der relativ kleinen Testfläche ist kaum mit einer systemischen Reaktion zu rechnen. Aufgrund der Tatsache, dass die Epidermis abgetrennt wird, also definitionsgemäß eine Erosion verursacht wird, sollten keine Narben zurückbleiben. Die am Untersuchungsort verursachten Erosionen bergen die Gefahr von Hyperpigmentationsstörungen und Entzündungen (Gupta *et al.*, 2000). Diese sind jedoch als gering anzusehen und mögliche Hyperpigmentationen bilden sich meist nach einigen Monaten zurück. Die Erosionen sollten außerdem nicht der Sonne ausgesetzt werden. Die Durchführung von Saugblasen-Experimenten ist daher in den kühlen, sonnenärmeren Monaten des Jahres zu bevorzugen.

Anhand von gleichen Parametern können *in vitro* und *in vivo* Experimente besser verglichen werden. Das Saugblasen-Modell hat zudem den Vorteil, dass in den Saugblasenflüssigkeiten gleichzeitig verschiedene Konzentrationen von Mediatoren bestimmt werden können. Es können außerdem gesunde mit kranken Hautregionen direkt miteinander verglichen werden, zum Beispiel bei Patienten mit Psoriasis vulgaris.

4.6. Ausblick

Für die Behandlung mit Phytopharmaka in der Dermatologie liegen kaum klinische Studien und experimentelle Daten vor. In der vorhandenen Literatur wird selten darauf eingegangen, wie die antiinflammatorische Wirkung untersucht wurde und welcher Hemmstärke sie entspricht, sie wird vielmehr ohne weitere Angaben postuliert, des Weiteren fehlen meist Angaben über eine Entzündungshemmung der Haut. Hinsichtlich dieser geringen Datenlage soll diese Arbeit einen Beitrag dazu leisten, pflanzliche Alternativen auf ihre antiinflammatorische Wirksamkeit hin zu untersuchen. Ein Pflanzenextrakt kann darüber hinaus unter anderem proliferationsfördernde, antiproliferative, antivirale und antimikrobielle Eigenschaften besitzen. Dies ist zum Beispiel bei der Therapie von Akne oder der Atopischen Dermatitis von Bedeutung, auch unter dem Aspekt, dass in der Dermatologie die Nachfrage nach pflanzlichen Alternativen zu Standardtherapeutika unter anderem

aufgrund der Nebenwirkungen von zum Beispiel Kortisonpräparaten gestiegen ist (Augustin, 2004 [a]).

Von besonderer Relevanz für die Therapie in der Dermatologie ist der Nachweis einer potentiellen entzündungshemmenden Wirkung von Usnea- und Tormentillaextrakt. Diese könnten für die topische Anwendungen für verschiedenste Hauterkrankungen geeignet sein. Eventuell können sie sogar mit kortisonhaltigen Präparaten konkurrieren. Die Ergebnisse zeigen auch, dass die Untersuchungen von Phytopharmaka zwar zeit- und kostenintensiv, aber dennoch sinnvoll sind.

5. Zusammenfassung

Phytopharmaka werden immer häufiger bei der Therapie von verschiedenen Erkrankungen eingesetzt. Klinische Studien und experimentelle Daten über deren Wirkungen sind jedoch rar.

Entzündungsreaktionen der Haut, welche *in vitro* anhand einer Hochregulation der COX-2 und konsekutiver Steigerung der Produktion von PGE₂ gemessen werden können, werden unter anderem durch UV-B-Strahlung hervorgerufen. Im Rahmen dieser Arbeit wurde dieses so genannte UV-B-Modell auf HaCaT-Zellkulturen angewendet, um die Pflanzenextrakte Anserina, Salbei, Rosmarin, Usnea und Tormentilla bezüglich ihrer potentiellen inhibitorischen Wirkung auf Entzündungsvorgänge in der Haut zu untersuchen. Ziel war es dabei, unter Einfluss der Pflanzenextrakte die Expression des COX-2-Proteins und die Produktion von PGE₂ in HaCaT-Zellen zu studieren.

Für den Anserinaextrakt konnte keine Entzündungshemmung gefunden werden. Rosmarin und Salbei ließen keine eindeutige Interpretation der Ergebnisse zu und bedürfen zur genauen Charakterisierung ihres Effektes weiterer Experimente.

Usnea und Tormentilla zeigten viel versprechende Hemmungsergebnisse sowohl auf die Expression der COX-2 als auch auf die gemessene PGE₂-Konzentration. Tormentilla, welche die stärkste inhibitorische Wirkung zeigte, wurde in einzelne Fraktionen aufgetrennt. Dabei konnte die Fraktion 4, welche als Hauptbestandteil Agrimoniin enthält, als die wirksamste charakterisiert werden. Eine Auftrennung in Unterfraktionen schloss sich an, wobei die Unterfraktion 4-3 tendenziell am stärksten inhibierte. Diese wurde daher auch *in vivo* im Saugblasen-Experiment getestet. Eine Hemmungstendenz ließ sich auch hier beobachten, jedoch ist eine eingehendere Untersuchung nötig.

Usnea zeigte ebenso wie Tormentilla eine Reduktion der COX-2-Expression und der PGE₂-Produktion. Jedoch war die Inhibition geringer ausgeprägt als bei Tormentilla.

Zusammenfassend zeigen die Ergebnisse dieser Arbeit, dass sowohl der Tormentilla- als auch der Usneaextrakt als potentiell entzündungshemmend eingestuft werden können und somit möglicherweise therapeutisch nutzbar sind. Dies ist für die klinische Dermatologie von großer Bedeutung für die Entwicklung alternativer, pflanzlicher Therapien bei entzündlichen Erkrankungen der Haut. Tormentilla und Usnea könnten in naher Zukunft Alternativen unter anderem zu kortisonhaltigen Standardtherapeutika darstellen.

6. Literaturverzeichnis

- Abe F., Yamauchi T., Nagao T., Kinjo J., Okabe H., Higo H., Akahane H. (2002). "Ursolic acid as a trypanocidal constituent in rosemary." *Biol Pharm Bull* 25(11): 1485-7.
- Ahn S. M., Yoon H. Y., Lee B. G., Park, K. C., Chung, J. H., Moon, C. H., Lee, S. H. (2002). "Fructose-1,6-diphosphate attenuates prostaglandin E2 production and cyclo-oxygenase-2 expression in UVB-irradiated HaCaT keratinocytes." *Br J Pharmacol* 137(4): 497-503.
- Aktories K., Förstermann U., Hofmann F., Starke K. (2005). *Allgemeine und spezielle Pharmakologie und Toxikologie*, Elsevier, Urban&Fischer, München, S. 675-678.
- Alappatt C., Johnson C. A., Clay K. L., Travers J. B. (2000). "Acute keratinocyte damage stimulates platelet-activating factor production." *Arch Dermatol Res* 292(5): 256-9.
- al-Bekairi A. M., Qureshi S., Chaudhry M. A., Krishna D. R., Shah A. H. (1991). "Mitodepressive, clastogenic and biochemical effects of (+)-usnic acid in mice." *J Ethnopharmacol* 33(3): 217-20.
- Alexis F., Wilson Dc., Todhunter JA., Stiller MJ. (1999). "Reassessment of suction blister model of wound healing." *Int J Dermatol*(38): 613-7.
- Armisen M., Rodriguez V., Vidal C. (2003). "Photoaggravated allergic contact dermatitis due to *Rosmarinus officinalis* cross-reactive with *Thymus vulgaris*." *Contact Dermatitis* 48(1): 52-3.
- Ashida M., Bito T., Budiyanto A., Ichihashi M., Ueda M. (2003). "Involvement of EGF receptor activation in the induction of cyclooxygenase-2 in HaCaT keratinocytes after UVB." *Exp Dermatol* 12(4): 445-52.
- Augustin M., Hoch Y. (a) (2004). *Phytotherapie bei Hauterkrankungen - Grundlagen-Praxis-Studien*, Elsevier Urban&Fischer, S. 1-11.
- Augustin M., Hoch Y. (b) (2004). *Phytotherapie bei Hauterkrankungen - Grundlagen-Praxis-Studien*, Urban&Fischer, S. 200-204, 276.
- Augustin M., Hoch Y. (c) (2004). *Phytotherapie bei Hauterkrankungen - Grundlagen-Praxis-Studien*, Urban&Fischer, S. 208-211, 301-302.
- Augustin M., Hoch Y. (d) (2004). *Phytotherapie bei Hauterkrankungen - Grundlagen-Praxis-Studien*, S. 247-249, 274.

- Baden H. P., Kubilus J., Kvedar J. C., Steinberg M. L., Wolman S. R. (1987). "Isolation and characterization of a spontaneously arising long-lived line of human keratinocytes (NM 1)." *In Vitro Cell Dev Biol* 23(3): 205-13.
- Baricevic D., Sosa S., Della Loggia R., Tubaro A., Simonovska B., Krasna A., Zupancic, A. (2001). "Topical anti-inflammatory activity of *Salvia officinalis* L. leaves: the relevance of ursolic acid." *J Ethnopharmacol* 75(2-3): 125-32.
- Bazan N. G., Flower R. J. (2002). "Medicine: lipid signals in pain control." *Nature* 420(6912): 135-8.
- Benfeldt E., Serup J., Menne T. (1999). "Microdialysis vs. suction blister technique for in vivo sampling of pharmacokinetics in the human dermis." *Acta Derm Venereol* 79(5): 338-42.
- Blaudschun R., Brenneisen P., Wlaschek M., Meewes C., Scharffetter-Kochanek K. (2000). "The first peak of the UVB irradiation-dependent biphasic induction of vascular endothelial growth factor (VEGF) is due to phosphorylation of the epidermal growth factor receptor and independent of autocrine transforming growth factor alpha." *FEBS Lett* 474(2-3): 195-200.
- Bos M. A., Vennat B., Meunier M. T., Pouget M. P., Pourrat A., Fialip J. (1996). "Procyanidins from tormentil: antioxidant properties towards lipoperoxidation and anti-elastase activity." *Biol Pharm Bull* 19(1): 146-8.
- Botting, R. M. (2000). "Mechanism of action of acetaminophen: is there a cyclooxygenase 3?" *Clin Infect Dis* 31 Suppl 5: S202-10.
- Boukamp P., Petrussevska R. T., Breitkreutz D., Hornung J., Markham A., Fusenig N. E. (1988). "Normal keratinization in a spontaneously immortalized aneuploid human keratinocyte cell line." *J Cell Biol* 106(3): 761-71.
- Braun-Falco O., Plewig G., Wolff H. H. (a) (2005). *Dermatologie und Venerologie*. Springer Verlag, Heidelberg 5.Auflage, S.1453-1454, 1464.
- Braun-Falco O., Plewig G., Wolff H. H. (b) (2005). *Dermatologie und Venerologie*. Springer Verlag, Heidelberg 5.Auflage, S. 892, 1465.
- Brieskorn, C. H. (1991). *Z. Phytother.* 12(2), S 61-69.
- Brock T., McNish, R.W., Peters-Golden M. (1999). "Arachidonic Acid is preferentially metabolized by Cyclooxygenase-2 to Prostacyclin and PGE2." *J Biol Chem* 274(17): 11660-11666.

- Calabrese V., Scapagnini G., Catalano C., Dinotta F., Geraci D., Morganti P. (2000). "Biochemical studies of a natural antioxidant isolated from rosemary and its application in cosmetic dermatology." *Int J Tissue React* 22(1): 5-13.
- Cardarelli M., Serino G., Campanella L., Ercole P., De Cicco Nardone F., Alesiani O., Rossiello F. (1997). "Antimitotic effects of usnic acid on different biological systems." *Cell Mol Life Sci* 53(8): 667-72.
- Chandrasekharan N. V., Dai H., Roos K. L., Evanson N. K., Tomsik J., Elton T. S., Simmons D. L. (2002). "COX-3, a cyclooxygenase-1 variant inhibited by acetaminophen and other analgesic/antipyretic drugs: cloning, structure, and expression." *Proc Natl Acad Sci U S A* 99(21): 13926-31.
- Chen X., Gresham A., Morrison A., Pentland A. P. (1996). "Oxidative stress mediates synthesis of cytosolic phospholipase A2 after UVB injury." *Biochim Biophys Acta* 1299(1): 23-33.
- Cocchietto M., Skert N., Nimis P. L., Sava G. (2002). "A review on usnic acid, an interesting natural compound." *Naturwissenschaften* 89(4): 137-46.
- Darin N., Kadhom N., Briere J. J., Chretien D., Bebear C. M., Rotig A., Munnich A., Rustin P. (2003). "Mitochondrial activities in human cultured skin fibroblasts contaminated by *Mycoplasma hyorhinis*." *BMC Biochem* 4: 15.
- del Bano M. J., Lorente J., Castillo J., Benavente-Garcia O., del Rio J. A., Ortuno A., Quirin K. W., Gerard, D. (2003). "Phenolic diterpenes, flavones, and rosmarinic acid distribution during the development of leaves, flowers, stems, and roots of *Rosmarinus officinalis*. Antioxidant activity." *J Agric Food Chem* 51(15): 4247-53.
- Dias P. C., Foglio M. A., Possenti A., de Carvalho J. E. (2000). "Antiulcerogenic activity of crude hydroalcoholic extract of *Rosmarinus officinalis* L." *J Ethnopharmacol* 69(1): 57-62.
- Dobrescu D., Tanasescu M., Mezdrea A., Ivan C., Ordosch E., Neagoe F., Rizeanu A., Trifu L., Enescu V. (1993). "Contributions to the complex study of some lichens-*Usnea* genus. Pharmacological studies on *Usnea barbata* and *Usnea hirta* species." *Rom J Physiol* 30(1-2): 101-7.
- Falabella R. (1971). "Epidermal grafting: an original technique and its application in achronic and ganulating areas." *Arch Dermatol*(104), S. 592-600.
- Fintelmann V., Weiss R. (a) (2002). *Lehrbuch der Phytotherapie*, 10. Auflage, Hippokrates Verlag, Stuttgart, S. 6, 493.

- Fintelmann V., Weiss R. (b) (2002). Lehrbuch der Phytotherapie, 10. Auflage, Hippokrates Verlag, Stuttgart, S. 91-92.
- Fintelmann V., Weiss R. (c) (2002). Lehrbuch der Phytotherapie, 10. Auflage, Hippokrates Verlag, Stuttgart, S. 68, 212, 495.
- Frohne D. (a). (2002). Heilpflanzenlexikon - Ein Leitfaden auf wissenschaftlicher Grundlage, 7. Auflage, Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft mbH, Stuttgart, S. 1-23.
- Frohne, D. b. (2002). Heilpflanzenlexikon - Ein Leitfaden auf wissenschaftlicher Grundlage, 7. Auflage, Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft mbH, Stuttgart, S. 448-450.
- Futrell J. M., Rietschel R. L. (1993). "Spice allergy evaluated by results of patch tests." *Cutis* 52(5): 288-90.
- Graham-Brown R. A., Grassberger M. (2003). "Pimecrolimus: a review of pre-clinical and clinical data." *Int J Clin Pract* 57(4): 319-27.
- Greaves M. W., Sondergaard J. (1970). "Pharmacologic agents released in ultraviolet inflammation studied by continuous skin perfusion." *J Invest Dermatol* 54(5): 365-7.
- Grewe M., Trefzer U., Ballhorn A., Gyufko K., Henninger H., Krutmann J. (1993). "Analysis of the mechanism of ultraviolet (UV) B radiation-induced prostaglandin E2 synthesis by human epidermoid carcinoma cells." *J Invest Dermatol* 101(4): 528-31.
- Gupta S., Kumar B. (2000). "Suction blister induction time: 15 minutes or 150 minutes?" *Dermatol Surg* 26(8): 754-6.
- Gupta S., Shroff S. (1999). "Modified technique of suction blistering for epidermal grafting in vitiligo." *Int J Dermatol* 38(4): 306-9.
- Hahn M., Lischka G., Pfeifle J., Wirth V (1995). "A case report of contact dermatitis from lichens in South Germany." *Contact Dermatitis* 32: 55-6.
- Hänzel R., Sticher O. (a) (2004). Pharmakognosie - Phytopharmazie, 7. Auflage, Springer Verlag, Berlin, S. 696-698.
- Hänzel R., Sticher O. (b) (2004). Pharmakognosie - Phytopharmazie, 7. Auflage, Springer Verlag, Berlin, 709, 739.
- Hänzel R., Sticher O. (c) (2004). Pharmakognosie - Phytopharmazie, 7. Auflage, Springer Verlag, Berlin, S. 835-836.

- Haraguchi H., Saito T., Okamura N., Yagi A. (1995). "Inhibition of lipid peroxidation and superoxide generation by diterpenoids from *Rosmarinus officinalis*." *Planta Med* 61(4): 333-6.
- Hausen B. M., Emde L., Marks V. (1993). "An investigation of the allergenic constituents of *Cladonia stellaris* (Opiz) Pous & Vezda ('silver moss', 'reindeer moss' or 'reindeer lichen')." *Contact Dermatitis* 28(2): 70-6.
- Heine A., Tarnick M. (1987). "[Allergic contact eczema caused by usnic acid in deoderant sprays]." *Dermatol Monatsschr* 173(4): 221-5.
- Hjorth A. B., Christophersen C., Hausen B. M., Menne T. (1997). "Occupational allergic contact dermatitis from carnosol, a naturally-occurring compound present in rosemary." *Contact Dermatitis* 37(3): 99-100.
- Hornstein, S. (2004). Untersuchung der antiinflammatorischen Wirkung von lokal applizierten Pharmaka im UV-Erythemtest. Dermatologie Universitätsklinik Freiburg. Freiburg.
- Hruza L. L., Pentland A. P. (1993). "Mechanisms of UV-induced inflammation." *J Invest Dermatol* 100(1): 35S-41S.
- Huang M. T., Ho C. T., Wang Z. Y., Ferraro T., Lou Y. R., Stauber K., Ma W., Georgiadis C., Laskin J. D., Conney A. H. (1994). "Inhibition of skin tumorigenesis by rosemary and its constituents carnosol and ursolic acid." *Cancer Res* 54(3): 701-8.
- Hulthe J., Bokemark L., Wikstrand J., Fagerberg B. (2000). "The metabolic syndrome, LDL particle size, and atherosclerosis: the Atherosclerosis and Insulin Resistance (AIR) study." *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 20(9): 2140-7.
- Ingolfssdottir, K. (2002). "Usnic acid." *Phytochemistry* 61(7): 729-36.
- Jänicke C., Grünwald J., Brendler T. (a) (2003). *Handbuch Phytotherapie*, 1. Auflage, Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft mbH, Stuttgart, S. 43-44.
- Jänicke C., Grünwald J., Brendler T. (b) (2003). *Handbuch Phytotherapie*, 1. Auflage, Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft mbH, Stuttgart, S. 65-67.
- Jänicke C., Grünwald J., Brendler T. (c) (2003). *Handbuch Phytotherapie*, 1. Auflage, Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft mbH, Stuttgart, S. 170-171.
- Jänicke C., Grünwald J., Brendler T. (d) (2003). *Handbuch Phytotherapie*, 1. Auflage, Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft mbH, Stuttgart, S. 442-444.
- Jänicke C., Grünwald J., Brendler T. (e) (2003). *Handbuch Phytotherapie*, 1. Auflage, Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft mbH, Stuttgart, S. 453-456.

- Jocher A., Kessler S., Hornstein S., Schulte Monting J., Schempp C. M. (2005). "The UV erythema test as a model to investigate the anti-inflammatory potency of topical preparations-reevaluation and optimization of the method." *Skin Pharmacol Physiol* 18(5): 234-40.
- Kashiwada Y., Nonaka G., Nishioka I., Chang J. J., Lee K. H. (1992). "Antitumor agents, 129. Tannins and related compounds as selective cytotoxic agents." *J Nat Prod* 55(8): 1033-43.
- Kiistala U. (1968). "Suction blister device for separation of viable epidermis from dermis." *J Invest Dermatol* 50(2): 129-37.
- Kim S. Y., Moon T. C., Chang H. W., Son K. H., Kang S. S., Kim H. P. (2002). "Effects of tanshinone I isolated from *Salvia miltiorrhiza bunge* on arachidonic acid metabolism and in vivo inflammatory responses." *Phytother Res* 16(7): 616-20.
- Kis B., Snipes J. A., Gaspar T., Lenzser G., Tulbert C. D., Busija D. W. (2006). "Cloning of cyclooxygenase-1b (putative COX-3) in mouse." *Inflamm Res* 55(7): 274-8.
- Kraft K. (a). (2000). *Checkliste Phytotherapie*, 1. Auflage, Thieme, Stuttgart, S. 1-17.
- Kraft K. (b). (2000). *Checkliste Phytotherapie*, 1. Auflage, Thieme, Stuttgart, S. 18-22.
- Kraft K. (c). (2000). *Checkliste Phytotherapie*, 1. Auflage, Thieme, Stuttgart, S 115.
- Kraft K. (d) (2000). *Checkliste Phytotherapie*, 1. Auflage, Thieme, Stuttgart, S. 101-102.
- Kraft K. (e) (2000) *Checkliste Phytotherapie*, 1. Auflage, Thieme, Stuttgart, S 247-269.
- Kumar K. C., Muller K. (1999). "Lichen metabolites. 2. Antiproliferative and cytotoxic activity of gyrophoric, usnic, and diffractaic acid on human keratinocyte growth." *J Nat Prod* 62(6): 821-3.
- Lauterwein M., Oethinger M., Belsner K., Peters T., Marre R. (1995). "In vitro activities of the lichen secondary metabolites vulpinic acid, (+)-usnic acid, and (-)-usnic acid against aerobic and anaerobic microorganisms." *Antimicrob Agents Chemother* 39(11): 2541-3.
- Laxmisha C., Thappa D. M. (2005). "Reliable site for suction blister induction and harvesting." *Indian J Dermatol Venereol Leprol* 71(5): 321-4.

- Leal P. F., Braga M. E., Sato D. N., Carvalho J. E., Marques M. O., Meireles M. A. (2003). "Functional properties of spice extracts obtained via supercritical fluid extraction." *J Agric Food Chem* 51(9): 2520-5.
- Leyden J. J. (2004). "Antibiotic resistance in the topical treatment of acne vulgaris." *Cutis* 73(6 Suppl): 6-10.
- Leyden J. J. (2004). "Topical treatment for the inflamed lesion in acne, rosacea, and pseudofolliculitis barbae." *Cutis* 73(6 Suppl): 4-5.
- Löffler G., Petrides P. (2003). *Biochemie&Pathobiochemie*, 7. Auflage, Springer, S. 451-455, 1122, 1151.
- Macdonald N., Cumberbatch M., Singh M., Moggs J. G., Orphanides G., Dearman R. J., Griffiths C. E., Kimber I. (2006). "Proteomic analysis of suction blister fluid isolated from human skin." *Clin Exp Dermatol* 31(3): 445-8.
- Mangena T., Muyima N. Y. (1999). "Comparative evaluation of the antimicrobial activities of essential oils of *Artemisia afra*, *Pteronia incana* and *Rosmarinus officinalis* on selected bacteria and yeast strains." *Lett Appl Microbiol* 28(4): 291-6.
- Masuda T., Inaba Y., Maekawa T., Takeda Y., Tamura H., Yamaguchi H. (2002). "Recovery mechanism of the antioxidant activity from carnosic acid quinone, an oxidized sage and rosemary antioxidant." *J Agric Food Chem* 50(21): 5863-9.
- Muller-Decker K. (2004). "[Cyclooxygenases in the skin]." *J Dtsch Dermatol Ges* 2(8): 668-75.
- Murayama T., Kishi N., Koshiura R., Takagi K., Furukawa T., Miyamoto K. (1992). "Agrimoniin, an antitumor tannin of *Agrimonia pilosa* Ledeb., induces interleukin-1." *Anticancer Res* 12(5): 1471-4.
- Nghiem P., Pearson G., Langley R. G. (2002). "Tacrolimus and pimecrolimus: from clever prokaryotes to inhibiting calcineurin and treating atopic dermatitis." *J Am Acad Dermatol* 46(2): 228-41.
- Offord E. A., Mace K., Ruffieux C., Malnoe A., Pfeifer A. M. (1995). "Rosemary components inhibit benzo[a]pyrene-induced genotoxicity in human bronchial cells." *Carcinogenesis* 16(9): 2057-62.
- Okuyama E., Umeyama K., Yamazaki M., Kinoshita Y., Yamamoto Y. (1995). "Usnic acid and diffractaic acid as analgesic and antipyretic components of *Usnea diffracta*." *Planta Med* 61(2): 113-5.

- Pahlow M. (2000). Das grosse Buch der Heilpflanzen, 3.Auflage, Bechtermünz-Verlag, Augsburg.
- Pitarokili D., Tzakou O., Loukis A., Harvala C. (2003). "Volatile metabolites from *Salvia fruticosa* as antifungal agents in soilborne pathogens." *J Agric Food Chem* 51(11): 3294-301.
- Pourrat A., Coulet M., Pourrat H. (1963). "[Bacteriostatic and agglutinating activities of tannic complexes extracted from tormentil, strawberry-plant and the wild rose.]" *Ann Pharm Fr* 21: 55-8.
- Pupe A., Moison R., De Haes P., van Henegouwen G. B., Rhodes L., Degreef H., Garmyn M. (2002). "Eicosapentaenoic acid, a n-3 polyunsaturated fatty acid differentially modulates TNF-alpha, IL-1alpha, IL-6 and PGE2 expression in UVB-irradiated human keratinocytes." *J Invest Dermatol* 118(4): 692-8.
- Rademaker M. (2000). "Allergy to lichen acids in a fragrance." *Australas J Dermatol* 41(1): 50-1.
- Rancan F., Rosan S., Boehm K., Fernandez E., Hidalgo M. E., Quihot W., Rubio C., Boehm F., Piazena H., Oltmanns U. (2002). "Protection against UVB irradiation by natural filters extracted from lichens." *J Photochem Photobiol B* 68(2-3): 133-9.
- Hager-Rom (2001). Springer Verlag, Berlin.
- Roth L., Dauderer M.; Kormann K. (1994). *Giftpflanzen - Pflanzengift. Vorkommen, Wirkung, Therapie - Allergische und phototoxische Reaktionen.* Landshut 4:630, Ecomed.
- Saller R., Buechi S., Meyrat R., Schmidhauser C. (2001). "Combined herbal preparation for topical treatment of Herpes labialis." *Forsch Komplementarmed Klass Naturheilkd* 8(6): 373-82.
- Santos-Gomes P. C., Fernandes-Ferreira M. (2003). "Essential oils produced by in vitro shoots of sage (*Salvia officinalis* L.)." *J Agric Food Chem* 51(8): 2260-6.
- Sattar A. A., Bankova V., Kujumgiev A., Galabov A., Ignatova A., Todorova C., Popov S. (1995). "Chemical composition and biological activity of leaf exudates from some Lamiaceae plants." *Pharmazie* 50(1): 62-5.
- Schempp C. M., Winghofer B., Langheinrich M., Schopf E., Simon J. C. (1999). "Hypericin levels in human serum and interstitial skin blister fluid after oral single-dose and steady-state administration of *Hypericum perforatum* extract (St. John's wort)." *Skin Pharmacol Appl Skin Physiol* 12(5): 299-304.

- Schempp C. M., Winghofer B., Ludtke R., Simon-Haarhaus B., Schopf E., Simon J. C. (2000). "Topical application of St John's wort (*Hypericum perforatum* L.) and of its metabolite hyperforin inhibits the allostimulatory capacity of epidermal cells." *Br J Dermatol* 142(5): 979-84.
- Scholz E. (1994). "Pflanzliche Gerbstoffe. Pharmakologie und Toxikologie." *Dtsch Apoth Ztg.* 134: 3167-79.
- Schulz V., Hänsel R. (a) (2004). *Rationale Phytotherapie - Ratgeber für Ärzte und Apotheker*, 5. Auflage, Springer Verlag, S. 1-44.
- Schulz V., Hänsel R. (b) (2004). *Rationale Phytotherapie - Ratgeber für Ärzte und Apotheker*. 5. Auflage, Springer Verlag, S. 278.
- Schulz V., Hänsel R. (c) (2004). *Rationale Phytotherapie - Ratgeber für Ärzte und Apotheker*, 5. Auflage, Springer Verlag, S. 353.
- Smith P. K., Krohn R. I., Hermanson G. T., Mallia A. K., Gartner F. H., Provenzano M. D., Fujimoto E. K., Goeke N. M., Olson B. J., Klenk D. C. (1985). "Measurement of protein using bicinchoninic acid." *Anal Biochem* 150(1): 76-85.
- Subbotina M. D., Timchenko V. N., Vorobyov M. M., Konunova Y. S., Aleksandrovih Y. S., Shushunov S. (2003). "Effect of oral administration of tormentil root extract (*Potentilla tormentilla*) on rotavirus diarrhea in children: a randomized, double blind, controlled trial." *Pediatr Infect Dis J* 22(8): 706-11.
- Teuscher E. (a). (2003). *Gewürzdrogen - Ein Handbuch der Gewürze, Gewürzkräuter, Gewürzmischungen und ihrer ätherischen Öle*, 1. Auflage, Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft mbH Stuttgart, S. 308-313.
- Teuscher E. (b). (2003). *Gewürzdrogen - Ein Handbuch der Gewürze, Gewürzkräuter, Gewürzmischungen und ihrer ätherischen Öle*. Stuttgart, 1. Auflage, Wissenschaftliche Vertragsgesellschaft mbH Stuttgart, 320-325.
- Tunon H., Olavsdotter C., Bohlin L. (1995). "Evaluation of anti-inflammatory activity of some Swedish medicinal plants. Inhibition of prostaglandin biosynthesis and PAF-induced exocytosis." *J Ethnopharmacol* 48(2): 61-76.
- Vennat B., Bos M. A., Pourrat A., Bastide P. (1994). "Procyanidins from tormentil: fractionation and study of the anti-radical activity towards superoxide anion." *Biol Pharm Bull* 17(12): 1613-5.
- Vijayakumar C. S., Viswanathan S., Reddy M. K., Parvathavarthini S., Kundu A. B., Sukumar E. (2000). "Anti-inflammatory activity of (+)-usnic acid." *Fitoterapia* 71(5): 564-6.

- Volodina E. V., Maksimovskii Iu M., Lebedev K. A. (1997). "[The combined treatment of lichen ruber planus of the mouth mucosa]." *Stomatologiya (Mosk)* 76(2): 28-32.
- Wang M., Kikuzaki H., Zhu N., Sang S., Nakatani N., Ho C. T. (2000). "Isolation and structural elucidation of two new glycosides from sage (*Salvia officinalis* L.)." *J Agric Food Chem* 48(2): 235-8.
- Warner T. D., Mitchell J. A. (2002). "Cyclooxygenase-3 (COX-3): filling in the gaps toward a COX continuum?" *Proc Natl Acad Sci U S A* 99(21): 13371-3.
- Weckesser S. (2006). *Testung der antibakteriellen und antimykotischen Aktivität ausgewählter Pflanzenextrakte gegenüber dermatologisch relevanten Keimen*. Dermatologie. Freiburg, Freiburg.
- Wichtl M. (2002). *Teedrogen und Phytopharmaka*, 4. Auflage, Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft mbH, Stuttgart, S. XXXV-XXXVIII.
- Willoughby D. A., Moore A. R., Colville-Nash P. R. (2000). "COX-1, COX-2, and COX-3 and the future treatment of chronic inflammatory disease." *Lancet* 355(9204): 646-8.

7. Anhang

7.1. Abkürzungsverzeichnis

AA	Arachidonsäure
BCA-Test	<i>Bicin choninic acid</i> - Test
COX	Cyclooxygenase
DAC	Deutscher Arzneimittel Codex
DMEM	<i>Dulbecco`s modified Eagle`s medium</i>
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EIA	<i>Enzyme Immunoassay</i>
ELISA	<i>Enzyme linked Immunoassay</i>
FBS	<i>Fetal bone serum</i>
HaCaT	H uman a dult skin keratinocytes, low C alcium, high T emperature
HPETE	Hydroperoxyeikosatetraen-Säuren
K (mit/ohne AA)	Kontrolle (mit/ohne Arachidonsäure)
L.	Linne, Carl von
LDH	Laktatdehydrogenase
LT	Leukotriene
LOX	Lipoxygenasen
PBS	<i>Phosphate Buffered Saline</i> - Waschpuffer
PG (-D ₂ , -E ₂ , -F _{2α} , -G ₂ , -H _{2/2α})	Prostaglandin (-D ₂ , -E ₂ , -F _{2α} , -G ₂ , -H _{2/2α})
PGHS	Prostaglandin-H-Synthase
PGI ₂	Prostacyclin
PLA ₍₂₎	Phospholipase A ₍₂₎
PVDF-Membran	Polyvinyliden-Fluorid-Membran
R.	Raeuschel (Räuschel, Ernst Adolf)
SDS (-PAGE)	<i>Sodium Dodecyl Sulfat</i> (-Polyacrylamid Gelelectrophoresis)
TBS(T)	<i>Tris-Buffered Saline (Tween-20)</i>
TX	Thromboxane
UpM	Umdrehungen pro Minute
UV (-B)	Ultraviolettstrahlung (-B)
V-1, -2, -3	Versuchsreihe -1, -2, -3

7.2. Verwendete Materialien und Geräte

Tabelle 2: Verwendete Zelllinie

Zelllinie	Lieferant, Herkunftsland
4 - HaCaT-Zelllinie	Krebsforschungsinstitut, Heidelberg, D

Tabelle 3: Verwendete Pflanzenextrakte

Pflanzenextrakt	Lieferant, Herkunftsland
5 - Anserina-Extrakt	Chemische Fabrik Dr.Hetterich, Fürth, D
6 - Rosmarin-Extrakt	Flavex Naturextrakte GmbH, Rehlingen, D
7 - Salbei-Extrakt	Flavex Naturextrakte GmbH, Rehlingen, D
8 - Tormentilla-Extrakt	Chemische Fabrik Dr.Hetterich, Fürth, D
9 - Usnea-Extrakt	Flavex Naturextrakte GmbH, Rehlingen, D

Tabelle 4: Verwendete Geräte

Produkt	Lieferant, Herkunftsland
10 - Atmos S 351, Saugsystem	Atmos Medizin Technik GmbH&Co. KG, Lenzkirch, D
11 - Bestrahlungsgerät Waldmann 800	Waldmann, Villingen-Schwenningen, D
12 - CO ₂ -Brutschrank	Heraeus Sepatech GmbH, Osterode, D
13 - <i>Laminar Air</i> ® HBB 2472	Heraeus Sepatech GmbH, Osterode, D
14 - Mexameter MX 16	Courage&Khazaka Electronic GmbH, Köln, D
15 - Mikroskop, Axiovert 135	Zeiss, Deisenhofen, Deutschland
16 - Mira-Analysegerät (ABX Pentra, LDH RTU)	Roche, Grenzach-Wyhlen, D
17 - Omnifuge 2.ORS (Zentrifuge 1)	Heraeus Sepatech GmbH, Osterode, D
18 - <i>Perfect Blue</i> [™] Vertical, Elektrophoresekammer, Modell Twin M	Peqlab, Erlangen, D
19 - Sirius HT-TRF, MWGt (<i>ELISA-READER</i>) (KC4-Software für SiriusHT-TRF)	MWG Biotech AG, Ebensberg, D (Bio-Tek Instruments, Vermont, USA)
20 - Ultrazentrifuge 5174 (Zentrifuge 2)	Eppendorf, Hamburg, D
21 - Wärmeblock (Thermomixer 5436)	Eppendorf, Hamburg, D
22 - <i>WetBlot</i> [™] , <i>Tank-Electroblotter</i> , Modell TEB-20	Peqlab, Erlangen, D

Tabelle 5: Verwendete Verbrauchsmaterialien

Produkt	Lieferant, Herkunftsland
23 - <i>Blue Cap</i> 15 ml	Falcon, Heidelberg, D
24 - <i>Blue Cap</i> 50 ml	Greiner Labortechnik, Frickenhausen, D
25 - Chromatographiepapier, 3MM Whatman Papier	Amersham Biosciences, Freiburg i. Brsg., D
26 - <i>Finn chambers</i>	Epitest, Tuusula, Finnland
27 - Hamilton-Spritze	Eppendorf, Köln, D
28 - <i>Hypercassette</i>	Amersham Biosciences, Buckinghamshire, UK
29 - <i>Hyperfilm</i> 18x24	Amersham Biosciences, Buckinghamshire, UK
30 - Kryo-Einfrierrohrchen (1,2 ml)	Corning Costar GmbH, Bodenheim, D
31- Millipore Immobilon-P Membran, Porengröße: 0,45 µm, <i>Polyvinylidene fluoride</i> (PVDF)	Millipore GmbH, Schwallbach, D
32 - Multiwellplatte (6 well)	Greiner Labortechnik, Frickenhausen, D
33 - Neubauer-Zählkammer	Brand, Wertheim, D
34 - Petrischalen beschichtet, (60 x 15 mm)	Falcon, Heidelberg, D
35 - Petrischalen beschichtet, (100 x 20mm)	Falcon, Heidelberg, D
36 - Saugnäpfe (Handarbeit, Spezialanfertigung)	Technikum Universität Freiburg i. Br., Freiburg, D
37 - <i>Save Lock Tubes</i> (0,5 ml; 1,5 ml; 2 ml) (Eppis)	Eppendorf, Köln, D
38 - Tegaderm (Pflaster)	3M Health Care, Borken, D
39 - Zellkulturflasche Typ 1 (175 cm ³ , 750 ml)	Greiner Labortechnik, Frickenhausen, D
40 - Zellkulturflasche Typ 2 (75 cm ³ , 250 ml)	Falcon, Heidelberg, D
41 - Zellschaber steril (25 cm)	Greiner Labortechnik, Frickenhausen, D

Tabelle 6: Verwendete Medien, Reagenzien und Antikörper

Produkt	Lieferant, Herkunftsland
42 - Acrylamide/Bis-acrylamide (30%), für Elektrophorese (37, 5:1)	Sigma Aldrich, Chemie GmbH, Schnelldorf, D
43 - Actin (c-11) HRP konjugierter Antikörper, <i>goat</i> polyklonal IgG	Santa Cruz, Heidelberg, D
44 - <i>all blue</i> -Marker	Biorad, München, D
45 - Ammonium Persulfat (APS)	Sigma Aldrich Chemie GmbH, Schnelldorf, D
46 - Arachidonsäure (AA), 10 mg	Sigma Aldrich, Chemie GmbH, Steinheim, D
47 - Basiscreme DAC	Herdern Apotheke, Freiburg i. Br., D
48 - Bromphenolblau	Serva, Heidelberg, D
49 - <i>Complete Mini (Protease inhibitor cocktail tablets)</i>	Roche Diagnosis GmbH, Mannheim, D
50 - COX-2 (M-19), <i>goat</i> polyklonaler IgG Antikörper	Santa Cruz, Heidelberg, D
51 - DMEM (<i>Dulbecco`s modified Eagle`s medium</i>), 4500 mg/L Glucose, L-Glutamin, Pyruvat (Zellkulturmedium)	Gibco invitrogen GmbH, Karlsruhe, D
52 - Dimethylsulfoxid (DMSO)	Sigma Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, D
53 - ECL Dual- <i>Vue Western, Blotting Markers</i>	Amersham Biosciences, Uppsala, Schweden
54 - ECL-Plus <i>Western Blot</i> Detektions-System	Amersham Biosciences, Uppsala, Schweden
55 - Ethanol 99,8% (verdünnt auf 70%)	Merck, VWR international GmbH, Darmstadt, D
56 - Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA)	Sigma Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen, D
57 - Fetales Kälberserum (FBS)	Biochrom Seromed, Berlin, D
58 - (L-) Glutamin (100x)	Gibco invitrogen GmbH, Karlsruhe, D
59 - Glycerol (Glycerin)	Merck, VWR international GmbH, Darmstadt, D
60 - Glycin (<i>for electrophoresis</i> 99%)	Sigma Aldrich, Chemie GmbH, Schnelldorf, D
61 - HDAC-2 (Primärer Antikörper)	Santa Cruz, Heidelberg, D
62 - H ₂ O-Millipore / Filter	Millipore GmbH Schwalbach, D
63 - Indometacin	Sigma Aldrich, Chemie GmbH, USA
64 - Magermilchpulver	Lasana, Herford, D
65 - (β)-Mercaptoethanol	Sigma Aldrich, Chemie GmbH, USA
66 - Methanol (100%)	Merck, VWR international GmbH, Darmstadt, D
67 - Natriumchlorid (NaCl)	Merck, VWR international GmbH, Darmstadt, D
68 - Natriumorthovanadat	Sigma Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen, D

69 - Nonidet P40 (NP-40)	Sigma Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen, D
70 - (D-) PBS (1x), CaCl ₂ /MgCl ₂	Gibco invitrogen GmbH, Karlsruhe, D
71 - Penicillin/Streptomycin (100x)	Gibco invitrogen GmbH, Karlsruhe, D
72 - Phenylmethylsulphonylfluorid (PMSF)	Roche Diagnosis GmbH, Mannheim, D
73 - <i>Precision Plus Protein™</i> -Standard, <i>Dual Color</i>	Bio Rad, München, D
74 - Sekundärer Antikörper HRP-konjugiert (<i>goat anti rabbit</i>)	Santa Cruz, Heidelberg, D
75 - Sekundärer Antikörper HRP-konjugiert (<i>Bovine anti goat IgG</i>)	Santa Cruz, Heidelberg, D
76 - <i>Sodium azide</i> (Natriumazid)	Sigma-Aldrich, Chemie GmbH, Schnelldorf, D
77 - <i>Sodium dodecyl sulfate</i> (SDS)	Roth, Karlsruhe, D
78 - TEMED N,N,N,N-tetramethyl-ethylendiamin, 1,2-Bis(dimethyl-amino)-ethan, (C ₆ H ₁₆ N ₂)	Sigma-Aldrich, Chemie GmbH, Schnelldorf, D
79 - Tris-Ultrapore	USB Corporation, Cleveland, Ohio, USA
80 - Trypanblau	Merck, Darmstadt, D
81 - Trypsin-EDTA, (1x), (0,25% Trypsin mit EDTA-4Na)	Gibco invitrogen GmbH, Karlsruhe, D
82 - Tween-20	Calbiochem, Merck Bioscience GmbH, Schwallbach, D

Tabelle 7: Verwendete Assays

Produkt	Lieferant, Herkunftsland
83 - <i>Bicinchoninic acid</i> (BCA), <i>Protein-Assay-Kit</i>	Pierce, Rockford, USA
84 - COX-Inhibitor-Screening-Assay	Cayman Chemical Company, Ann Arbor, USA
85 - EIA zum COX-Inhibitor-Screening-Assay	Cayman Chemical Company, Ann Arbor, USA
86 - <i>Mycoplasmen-Detection-Kit</i>	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, D
87 - PGE ₂ <i>High Sensitivity</i>	R&D, Wiesbaden-Nordenstadt, D

Tabelle 8: Trenn- und Sammelgelzusammensetzung

88) 10% Trenngel							
Zusammensetzung	Mengenangabe						
12,5 ml	H ₂ O-Millipore ⁶²						
7,3 ml	Trenngelpuffer <table border="1" data-bbox="833 452 1414 582"> <tr> <td>0,4% SDS⁷⁷</td> <td>0,4 g</td> </tr> <tr> <td>1,5 M Tris⁷⁹, pH 8,8</td> <td>18,171 g</td> </tr> <tr> <td></td> <td>In 100 ml H₂O-Millipore⁶²</td> </tr> </table>	0,4% SDS ⁷⁷	0,4 g	1,5 M Tris ⁷⁹ , pH 8,8	18,171 g		In 100 ml H ₂ O-Millipore ⁶²
0,4% SDS ⁷⁷	0,4 g						
1,5 M Tris ⁷⁹ , pH 8,8	18,171 g						
	In 100 ml H ₂ O-Millipore ⁶²						
10 ml	Acrylamid/Bisarylamid ⁴²						
30 µl	TEMED ⁷⁸						
300µl	APS ⁴⁵ (10% APS in H ₂ O-Millipore ⁶²)						
89) 4,5% Sammelgel							
Zusammensetzung	Mengenangabe						
6 ml	H ₂ O-Millipore ⁶²						
2,5 ml	Sammelgelpuffer <table border="1" data-bbox="833 922 1414 1052"> <tr> <td>0,4% SDS⁷⁷</td> <td>0,4 g</td> </tr> <tr> <td>1 M Tris⁷⁹, pH 6,8</td> <td>12,114 g</td> </tr> <tr> <td></td> <td>In 100 ml H₂O-Millipore⁶²</td> </tr> </table>	0,4% SDS ⁷⁷	0,4 g	1 M Tris ⁷⁹ , pH 6,8	12,114 g		In 100 ml H ₂ O-Millipore ⁶²
0,4% SDS ⁷⁷	0,4 g						
1 M Tris ⁷⁹ , pH 6,8	12,114 g						
	In 100 ml H ₂ O-Millipore ⁶²						
1,8 ml	Acrylamid/Bisarylamid ⁴²						
10 µl	TEMED ⁷⁸						
100µl	APS ⁴⁵ (10% APS in H ₂ O-Millipore ⁶²)						

Tabelle 9: Verwendete Puffer, Lösungen und Kulturmedien

Name	Eingesetzt bei	Zusammensetzung
90 - Kulturmedium	Zellkulturarbeit (siehe 2.2.)	DMEM-Medium ⁵¹ Mit Zugabe von: FBS 10% ⁵⁷ Pen/Strep 1% ⁷¹ L-Glutamin 1% ⁵⁸
91 - Magermedium	Zellkulturarbeit (siehe 2.2.)	DMEM-Medium Zugabe von: Pen/Strep 1% ⁷¹ L-Glutamin 1% ⁵⁸
92 - Trypanblaulösung	Zellkulturarbeit (siehe 2.2.)	54 ml PBS (1x) ⁷⁰ 3ml Trypanblau ⁸⁰ 12 ml <i>Sodium azide</i> ⁷⁶
93 - Lysepuffer	Proteingemisch- Gewinnung (siehe 2.10.1.)	50 mM Tris ⁷⁹ , pH 8,0 150 mM NaCl ⁶⁷ 0,5% NP-40 ⁶⁹ 5 mM EDTA ⁵⁶ 2 mM PMSF ⁷² 20 µM Natriumorthovanadat ⁶⁸ 1 Tbl. <i>Complete Mini Kit</i> ⁴⁹
94 - (2x Laemmli) <i>Sample-Puffer</i>	Gelelektrophorese (siehe 2.10.3.)	160 mM Tris ⁷⁹ , pH 6,8 4% SDS ⁷⁷ 16% Glycerol ⁵⁹ 0,01% Bromphenolblau ⁴⁸ 0,57 M (β)-Mercaptoethanol ⁶⁵
95 - (1x Laemmli)- Elektrophoresepuffer (pH 8,3)	Gelelektrophorese (siehe 2.10.3.)	0,025 M Tris ⁷⁹ 0,192 M Glycin ⁶⁰ 0,1% SDS ⁷⁷ Puffer mit HCl auf pH 8,3 einstellen
96 - (10x) - <i>Western Blot Puffer</i>	<i>Western blotting</i> (siehe 2.10.3.)	250 mM Tris ⁷⁹ 0,1% SDS ⁷⁷ 1,95 M Glycin ⁶⁰
97 - (1x) - <i>Western Blot Puffer</i>	<i>Western blotting</i> (siehe 2.10.3.)	1/10 Volumenteil 10 x <i>Western Blot Puffer</i> ⁹⁶ 1/10 Volumenteil Methanol ⁶⁶ 0,1% SDS ⁷⁷
98 - (10x) - TBS	<i>Western blotting</i> (siehe 2.10.3.)	0,2 M Tris ⁷⁹ 1,5 M NaCl ⁶⁷ pH mit HCl auf 7,6 einstellen
99 - TBST-Puffer (<i>Blocking solution</i>)	<i>Western blotting</i> (siehe 2.10.3.)	0,1% Tween-20 ⁸¹ (10x) TBS ⁹⁸ auf 1 x verdünnt

Tabelle 10: Sonstige, im Text nicht näher erwähnte Materialien und Geräte

Produkt	Lieferant, Herkunftsland
Akalit®, pH 7,5-14, Universalindikatorpapier	Merck, VWR international GmbH, Darmstadt, D
Combitips Plus Eppendorf 5 ml bzw. 2,5 ml	Eppendorf, Köln, D
Einmalinjektionskanüle	Braun, Melsungen, D
Einmalspritze, 5 ml	Braun, Melsungen, D
<i>Pipetboy acu</i>	Integra biosciences, Tecnomara, Fernwald, D
Pipetten 5/10/25/50 ml	Corning Costar GmbH, Bodenheim, D
Skalpel (Nr 15)	Feather pfm, Produkte für die Medizin, Köln, D
Vortexer (<i>Test Tube Shaker</i>)	VWR international, Leuven, Belgien
Universalindikator pH 1-10, pH 0-14, Rollenform	Merck, VWR international GmbH, Darmstadt, D
UV-Meter	Waldmann, Villingen-Schwenningen, D
Waage	Sartorius GmbH, Göttingen, D
(Schüttel-) Wasserbad,	Gesellschaft für Labortechnik, Burgwedel, D

7.3. Curriculum vitae

Name Schmidt, Ute Hanne

Geburtsdatum 03.10.1979

Geburtsort Karlsruhe

Schulbildung

1986 - 1990 Grundschule, Sandweier bei Baden-Baden

1990 - 1999 Markgraf-Ludwig-Gymnasium, Baden-Baden

1999 Allgemeine Hochschulreife

Auslandsaufenthalt

1999 - 2000 Aupair in Annapolis, MD, USA

Studium

Seit WS 2000 Studium der Medizin an der Albert-Ludwigs-Universität, Freiburg

09/2002 Physikum

09/2003 1. Staatsexamen

04/2006 2. Staatsexamen

Famulaturen

02/2003 Innere Medizin, Donau-Ries-Klinik, Oettingen

03/2003 Innere Medizin, Barmherzige Brüder, Wien, Österreich

09-10/2003 Dermatologie, Universitätsklinik, Freiburg

03/2004 Dermatologie, Universitätsklinik, Freiburg

08/2004 Radiologie, Praxis im Josefshaus, Freiburg

02-03/2005 Gynäkologie, Taranaki Base Hospital, New Plymouth, Neuseeland

Praktisches Jahr

04-08/2006 Innere Medizin, Städtisches Klinikum, Karlsruhe

08-11/2006 Viszeral- und Transplantationschirurgie, Inselspital, Bern, Schweiz

Seit 11/2006 Dermatologie, Städtisches Klinikum Karlsruhe

8. Danksagung

Mein besonderer Dank gilt Prof. Christoph M. Schempp für die Überlassung des spannenden Dissertationsthemas und die herzliche Aufnahme in seine Arbeitsgruppe. Ich bedanke mich für die stetige Unterstützung, Diskussionsbereitschaft und die experimentellen Möglichkeiten, die mir im Labor zu Verfügung standen. In diesem Zusammenhang möchte ich der Manfred und Ursula Müller-Stiftung danken, die diese Arbeit im Rahmen des geförderten Forschungsprojektes „Heilpflanzen in der Dermatologie“ unterstützten. Ziel der Stiftung ist die Entwicklung neuer dermatologischer Präparate auf pflanzlicher Basis. Für die perfekte Einarbeitung im Labor und Unterstützung während der Laborzeit sowie danach möchte ich Dr. med. Kathrin Engel danken. Vielen Dank für die Korrekturen, Anregungen und ständige Bereitschaft zu Besprechungen und Diskussionen.

Bei der Arbeitsgruppe Schempp möchte ich mich bedanken, im Besonderen bei Birgit Simon-Haarhaus, die mir immer mit Rat und Tat zur Seite stand.

Ebenfalls gebührt allen anderen Mitarbeitern im Labor, die immer für Fragen offen waren, ein großes Dankeschön. Dabei möchte ich besonders Eva Bachtanian und Dr. rer. nat. Jan Dudda hervorheben, die mich vor allem in den Abendstunden im Labor nicht nur einmal zum Lachen brachten.

Carola Seiler möchte ich für ihre Diskussionsbereitschaft, Anregungen, Korrekturen und aufheiternden Worten danken. Karl Schneider gebührt ebenfalls ein ganz besonderer Dank. Vielen Dank für das aufmunternde *Coaching* bis zur Fertigstellung der Arbeit.

Meiner Familie danke ich sehr für die Ermöglichung meines Studiums und ihrer Unterstützung. Die Arbeit gebührt nicht zuletzt ihnen.

Den Dank, den ich meinem Freund Axel Bullerkotte mitteilen möchte, kann ich kaum in Worte fassen. Ich danke ihm für sein Verständnis für die vielen, vielen Stunden, in denen ich nicht ansprechbar war, und für die immer währende und schier unersättliche Hilfe bis zur Fertigstellung!