

# **Pharmakologische und pharmakokinetische Untersuchungen zu Salicylalkoholderivaten aus Salicis cortex**



Dissertation zur Erlangung des Doktorgrades der Naturwissenschaften (Dr. rer. nat.)  
der Fakultät Chemie und Pharmazie der Universität Regensburg

vorgelegt von  
Susanne Knuth  
aus Osnabrück

2013

Die vorliegende Arbeit entstand zwischen April 2009 und Oktober 2012 am Lehrstuhl für Pharmazeutische Biologie der Universität Regensburg.

Die Arbeit wurde angeleitet von: Prof. Dr. Jörg Heilmann

Promotionsgesuch eingereicht am: 19. Juli 2013

Datum der mündlichen Prüfung: 10. Oktober 2013

Prüfungsausschuss: Prof. Dr. Frank-Michael Matysik	(Vorsitzender)
Prof. Dr. Jörg Heilmann	(Erstgutachter)
Prof. Dr. Mohamed T. Khayyal	(Zweigutachter)
Prof. Dr. Frieder Kees	(Drittprüfer)

## Danksagung

Ich möchte Prof. Dr. Jörg Heilmann ganz herzlich für die Überlassung dieses sehr interessanten Themas, für die stets möglichen Diskussionen und Beratungen sowie die Möglichkeit der Teilnahme an internationalen Kongressen danken. Ganz besonders bedanke ich mich für das mir entgegen gebrachte Vertrauen und die großzügige moralische sowie finanzielle Unterstützung bei der Durchführung der klinischen Prüfung.

Mein ganz besonderer Dank gilt Dr. Guido Jürgenliemk für seine intensive und stets konstruktive Betreuung dieser Arbeit. Für seine fortwährende moralische wie fachliche Unterstützung, seine fruchtbaren Ideen und die gemeinsame, kollegiale Betreuung der Studententaktika möchte ich mich ganz herzlich bedanken. Auch für die genaue Durchsicht dieser Arbeit, sein offenes Ohr für Probleme diversester Art und nicht zuletzt für die nachhaltig amüsanten Momente danke ich ihm sehr.

Sehr herzlich möchte ich mich auch bei Prof. Dr. Mohamed T. Khayyal für die Durchführung der *in vivo* Studien, die Einbringung seines pharmakologischen „Know-How’s“, die Erstellung des Gutachtens zu dieser Arbeit und seine stets heitere, unkomplizierte Hilfsbereitschaft bedanken. In diesem Zusammenhang danke ich ebenso seiner Mitarbeiterin Rania M. Abdelsalam für die Durchführung der pharmakologischen und pharmakokinetischen *in vivo* Untersuchungen an den Wistar-Ratten.

Prof. Dr. Frieder Kees danke ich ganz besonders für seine große Unterstützung bei der Beantragung und Durchführung der klinischen Prüfung. Ohne seine Fachkompetenz und die Möglichkeit der Nutzung des Prüfzentrums des Pharmakologischen Instituts, wäre die Umsetzung der klinischen Prüfung so nicht möglich gewesen. An dieser Stelle bedanke ich mich außerdem bei Astrid Seefeld, Gertraud Wilberg und Katharina Wohlfahrt für die technische Unterstützung während der klinischen Prüfung sowie bei Dr. Martin Kees für die Auswertung der pharmakokinetischen Parameter.

Mein besonderer Dank gilt ferner Dr. Georg Mair für seine Bereitschaft, die Aufgaben des Sponsors und Prüfarztes in der klinischen Prüfung zu übernehmen. Hier möchte ich mich ebenso bei Prof. Dr. Frank Schweda für seine unkomplizierte Unterstützung als Hauptprüfer in der klinischen Studie bedanken.

Ein großes Dankeschön geht außerdem an Monika Untergehrer für die Durchführung des ICAM-1 Assays mit Catecholglucuronid, ihre kollegiale Unterstützung während der klinischen Prüfung und ihre große praktische Hilfe bei technischen Problemen sowie an Beata Kling für die Durchführung der MTT-Assays mit Tremulacin. Daniel Bücherl danke ich sehr für die Unterstützung in der Glucuronidsynthese und die Einbringung seines Synthese-„Know-How's“. Bei Anne Grashuber und Gabriele Brunner möchte ich mich ganz herzlich für die Unterstützung in den Studentenpraktika und im Laboralltag bedanken. Des Weiteren danke ich Josef Kiermaier für die Durchführung der MS-Analysen und seine stets kompetente Hilfsbereitschaft in HPLC-Fragen. Auch Dr. Rudolf Vasold danke ich für seine Hilfestellung in HPLC-Angelegenheiten. Für die großartige Unterstützung in der analytischen Entwicklung möchte ich Claudia Niegel und Prof. Dr. Frank-Michael Matysik besonders danken. Ein herzliches Dankeschön möchte ich ferner Sebastian Schmidt für seine stete Diskussionsbereitschaft und freundschaftliche Unterstützung ausdrücken. Sebastian Gerdes danke ich für seine schnelle Hilfe bei den statistischen Erwägungen für die klinische Studie. Dr. Anne Freischmidt und Dr. Magdalena Motyl möchte ich für die Einführung in die HPLC- und Flash-Chromatographie danken. Ferner danke ich der NMR-Abteilung der Universität Regensburg, insbesondere Fritz Kastner, für die Durchführung der NMR-Experimente. Des Weiteren möchte ich mich bei der Hermes Arzneimittel GmbH für die finanzielle Unterstützung bedanken. Bei Dr. E. Ades und F. J. Candal vom CDC (USA) sowie bei Dr. T. Lawley von der Emory University (USA) bedanke ich mich für die Bereitstellung der HMEC-1-Zellen.

Meinen geschätzten Kollegen Sebastian Schmidt, Daniel Bücherl, Beata Kling, Marcel Flemming, Katharina Zenger, Rosmarie Scherübl, Petr Jirásek, Monika Untergehrer, Dr. Matej Barbic, Tri Hieu Nguyen und Markus Löhr möchte ich für das äußerst angenehme und freundschaftliche Arbeitsklima am Lehrstuhl und für die gemeinsamen, außeruniversitären, schönen Zeiten danken.

Meiner Familie und meinen Freunden möchte ich für ihre Unterstützung, ihre Ermutigungen und ihr Verständnis über die letzten Jahre danken. Meinen Eltern danke ich von ganzem Herzen für ihren immerwährenden Glauben an mich und die Ermöglichung meines Studiums. Von ganzem Herzen danke ich außerdem Dr. Thomas Reintjes für seine Unterstützung, seine Geduld, viele hilfreiche Diskussionen und die wunderschöne, gemeinsame Zeit.

Schließlich möchte ich mich bei all denjenigen bedanken, die nicht namentlich erwähnt wurden, aber einen Teil zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben.

## Publikationsliste

### Teile dieser Arbeit wurden, bzw. werden publiziert:

Knuth S, Schübel H, Hellemann M, Jürgenliemk G. Catechol, a bioactive degradation product of salicortin, reduces TNF- $\alpha$  induced ICAM-1 expression in human endothelial cells. *Planta Medica*. 2011; 77: 1024–26.

Knuth S, Abdelsalam RM, Khayyal MT, Schweda F, Heilmann J, Kees MG, Mair G, Kees F, Jürgenliemk G. Catechol conjugates *in vivo* are metabolites of Salicis cortex. *Planta Medica*. 2013: accepted.

### Posterbeiträge:

Knuth S, Schübel H, Hellemann M, Jürgenliemk G. Catechol als Abbauprodukt von Salicylalkoholderivaten reduziert die TNF- $\alpha$ -induzierte ICAM-1 Expression. *Phytotherapeutika*, Wien, Mai 2012.

Freischmidt A, Knuth S, Untergehrer M, Okpanyi S, Müller J, Kelber O, Weiser D, Jürgenliemk G, Heilmann J. Eine neue Methode zur Quantifizierung von Chalconen und Flavononen in pharmazeutisch verwendeten Weidenrinden-Extrakten. *Phytotherapeutika*, Wien, Mai 2012.

Knuth S, Schübel H, Hellemann M, Jürgenliemk G. Stability control of test substances in *in vitro* assays is necessary to exclude false conclusions. 5<sup>th</sup> international conference on polyphenols and health, Sitges Barcelona, Oktober 2011.

Knuth S, Formisano C, Schübel H, Hellemann M, Jürgenliemk G. *In-vitro* inhibition of TNF- $\alpha$  induced ICAM-1 expression by an extract and fractions of Willow bark. International Symposium: Drugs from nature targeting inflammation, Innsbruck, April 2010.



## Inhaltsverzeichnis

<b>1. Einleitung</b>	<b>1</b>
1.1 <i>Salix</i> : die Weide	1
1.2 Salicis cortex: die Weidenrinde	2
1.2.1 Salicis cortex: von der historischen Verwendung der Weidenrinde zur Entwicklung von Aspirin®	2
1.2.2 Salicis cortex: aktuelle Indikationen und Monographien der Weidenrinde	3
1.2.3 Salicis cortex: Inhaltsstoffe der Weidenrinde	4
1.2.3.1 Phenolglykoside	5
1.2.3.2 Flavonoide	7
1.2.3.3 Gerbstoffe und weitere Inhaltsstoffe	9
1.3 Studien zu Wirkungen der Weidenrinde	10
1.3.1 <i>In vivo</i> Studien (Tiermodelle)	10
1.3.2 Klinische Studien	11
1.4 Verträglichkeit der Weidenrinde und toxikologische Untersuchungen	13
1.5 Pharmakokinetische Studien der Weidenrinde und ihrer Inhaltsstoffe	14
1.6 Studien zum Wirkmechanismus der Weidenrinde <i>in vitro</i>	16
1.7 Pharmakotherapie bei Arthrose, Kreuzschmerz und rheumatoider Arthritis	18
1.8 Zielsetzung der vorliegenden Arbeit	20
<b>2. Bioaktivitätsgeleitete Fraktionierung eines Weidenrindenextraktes</b>	<b>21</b>
2.1 Hintergrund	21
2.1.1 Hintergrund der bioaktivitätsgeleiteten Fraktionierung	21
2.1.2 Hintergrund der phytochemischen Charakterisierungen	23
2.1.2.1 Gesamtsalicinbestimmung	23
2.1.2.2 Flavonoidgehaltsbestimmung	24
2.1.2.3 Gerbstoffgehaltsbestimmung	25
2.2 Ergebnisse und Diskussion	25
2.2.1 Fraktionierung des Weidenrindenextraktes und nachfolgende phytochemische Charakterisierung	25

2.2.1.1	Fraktionierung des Weidenrindenextraktes an Sephadex® LH-20	25
2.2.1.2	Phytochemische Charakterisierung des Extraktes und der Fraktionen S1-S3	26
2.2.2	<i>In vitro</i> Testung des Extraktes und der Fraktionen S1-S3 im ICAM-1 Assay	29
2.2.3	Fraktionierung der S1-Fraktion mittels Flash-Chromatographie	30
2.2.4	<i>In vitro</i> Testung der Fraktionen F1-F8 im ICAM-1 Assay	31
2.2.5	Isolierung und Strukturaufklärung von Salicortin und Tremulacin	32
2.2.5.1	Isolierung und Reinheitsbestimmung von Salicortin	32
2.2.5.2	Strukturaufklärung von Salicortin	33
2.2.5.3	Isolierung und Reinheitsbestimmung von Tremulacin	37
2.2.5.4	Strukturaufklärung von Tremulacin	38
2.2.6	Zusammenfassung und Ausblick	41
2.3	Experimenteller Teil	42
2.3.1	Fraktionierung	42
2.3.1.1	Offene Säulenchromatographie mit Sephadex® LH-20	42
2.3.1.2	Flash-Chromatographie von S1	44
2.3.2	Isolierungen	45
2.3.2.1	Isolierung von Salicortin aus F5 und von Tremulacin aus F7	45
2.3.2.2	Strukturaufklärung der Isolate	47
2.3.2.2.1	NMR-Spektroskopie	47
2.3.2.2.2	Massenspektrometrie	48
2.3.2.3	Reinheitsbestimmungen der Isolate	49
2.3.3	Phytochemische Charakterisierung des verwendeten Weidenrindenextraktes und der Fraktionen S1-S3	50
2.3.3.1	Gehaltsbestimmung des Gesamtsalicins nach europäischem Arzneibuch (Ph. Eur. 6.1)	50
2.3.3.2	Flavonoidgehaltsbestimmung	52
2.3.3.3	Bestimmung des Gerbstoffgehalts	53
2.3.4	ICAM-1 Assay	54
2.3.5	Statistik	55
<b>3.</b>	<b>Entzündungshemmende Eigenschaften von Salicortin und Tremulacin <i>in vitro</i> sowie ihre Stabilitätskontrolle unter Zellkulturbedingungen</b>	<b>57</b>
3.1	Hintergrund der <i>in vitro</i> Testungen	57
3.1.1	Involvierung von ICAM-1 in Entzündungsmechanismen	58



3.1.2 ICAM-1 Assay als Entzündungsmodell <i>in vitro</i>	60
3.1.3 MTT Assay als Cytotoxizitätsmodell	61
3.2 Ergebnisse und Diskussion	62
3.2.1 Aktivität von Salicortin und Tremulacin im ICAM-1 Assay	62
3.2.2 Stabilitätskontrolle von Salicortin und Tremulacin unter Zellkulturbedingungen	63
3.2.3 Aktivität von Catechol im modifizierten ICAM-1 Assay	67
3.2.4 Cytotoxizitäts (MTT)-Assay mit Salicortin, Tremulacin und Catechol	68
3.2.5 Zusammenfassung und Ausblick	70
3.3 Experimenteller Teil	71
3.3.1 Zellkultur – HMEC-1-Zellen	71
3.3.1.1 ICAM-1 Assay	72
3.3.1.1.1 Substanzaufgabe	72
3.3.1.1.2 ICAM-1-Expressionsstimulation	72
3.3.1.1.3 Aufarbeitung der Zellen mit einem FITC-markierten ICAM-1-Antikörper für die FACS-Analyse	73
3.3.1.1.4 FACS-Analyse und Auswertung	73
3.3.1.2 Modifizierter ICAM-1 Assay	74
3.3.1.3 MTT Assay	74
3.3.1.3.1 Substanzaufgabe	74
3.3.1.3.2 MTT-Aufgabe und Auflösung der Zellen	74
3.3.1.3.3 Bestimmung der Absorption und Auswertung	75
3.3.1.4 Verwendete Geräte, Chemikalien, Verbrauchsmaterialien und Zellkulturmedien in Kapitel 3.3.1	75
3.3.2 Stabilitätskontrolle von Salicortin und Tremulacin unter ICAM-1 Assay Bedingungen	76
3.3.2.1 Inkubation und Probenaufarbeitung	76
3.3.2.2 Quantifizierung von Catechol, Salicortin und Tremulacin aus den Proben der Stabilitätsuntersuchungen	76
3.3.3 Statistik	78
<b>4. <i>In vivo</i> Metabolisierung von Salicortin zu Catechol nach peroraler Aufnahme</b>	<b>79</b>
4.1 Hintergrund des Tiermodells	79
4.2 Ergebnisse und Diskussion	80
4.2.1 Aufarbeitung der Serumproben, HPLC-Methode und Validierung	80

4.2.1.1 Vergleichbarkeit von Human- und Rattenserum	80
4.2.1.1.1 Vergleichbarkeit der Selektivität	80
4.2.1.1.2 Vergleichbarkeit der Wiederfindung	82
4.2.2 Catechol- und Salicylsäurekonzentration im Serum von Wistar-Ratten nach peroraler Applikation von Salicortin und enzymatischer Aufarbeitung der Serumproben	83
4.2.3 Catechol- und Salicylsäurekonzentration in nicht enzymatisch aufgearbeiteten Seren von Wistar-Ratten nach peroraler Applikation von Salicortin	85
4.2.4 Catecholkonzentration im Serum von Wistar-Ratten nach peroraler Applikation von Salicortin und nur partieller enzymatischer Aufarbeitung der Serumproben	86
4.2.5 Zusammenfassung und Ausblick	86
4.3. Experimenteller Teil	87
4.3.1 Tiermodell	87
4.3.1.1 Tiere	88
4.3.1.2 Salicortin-Applikation, Blutnahme und Serumgewinnung	88
4.3.2 Analytik der Serumproben	88
4.3.3 Statistik	89
4.3.4 Pharmakokinetische Parameter	89
<b>5. Synthese des Catecholmetabolits Catecholglucuronid und seine Aktivität im ICAM-1 Assay</b>	<b>91</b>
5.1 Hintergrund	91
5.1.1 Hintergrund der Testung von Metaboliten	91
5.1.2 Hintergrund der Glucuronidsynthese	92
5.2 Ergebnisse und Diskussion	93
5.2.1 Synthese des Catecholglucuronids	93
5.2.1.1 Synthese der geschützten Catecholglucuronidvorstufe (peracetylierter Catecholglucuronsäuremethylester)	93
5.2.1.2 Entschützung der geschützten Vorstufe zum Catecholglucuronid	96
5.2.1.3 Strukturaufklärung des synthetisierten Catecholglucuronids	96
5.2.1.4 Reiheitsbestimmung des synthetisierten Catecholglucuronids	99
5.2.2 <i>In vitro</i> Aktivität des Catecholglucuronids im ICAM-1 Assay	99
5.2.3 Zusammenfassung und Ausblick	101
5.3 Experimenteller Teil	103

5.3.1 Synthese des Catecholglucuronids	103
5.3.1.1 Synthese des geschützten (peracetylierten) Catecholglucuronids	103
5.3.1.2 Entschützung des peracetylierten Catecholglucuronids zu Catecholglucuronid	105
5.3.1.3 Strukturaufklärung und Reinheitsbestimmung des Catecholglucuronids	106
5.3.1.4 Sonstige verwendete Chemikalien und Verbrauchsmaterialien in Kapitel 5.3.1	107
5.3.2 ICAM-1 Assay von Catecholglucuronid und Catechol	107
<b>6. Entzündungshemmende Eigenschaften von Salicortin <i>in vivo</i></b>	<b>109</b>
6.1 Hintergrund	109
6.1.1 Hintergrund der <i>in vivo</i> Testung von Salicortin	109
6.1.2 Carrageen-induzierte Entzündung im „Six-day-old air pouch Modell“ als Entzündungsmodell <i>in vivo</i>	110
6.1.3 Quantifizierte Entzündungsmarker im <i>in vivo</i> Modell	111
6.1.3.1 Zytokine	111
6.1.3.1.1 Interleukin 1 beta (IL-1 $\beta$ )	111
6.1.3.1.2 Tumor Nekrose Faktor alpha (TNF- $\alpha$ )	112
6.1.3.1.3 Interleukin 6 (IL-6)	113
6.1.3.2 Marker des oxidativen Stresses	113
6.1.3.2.1 Glutathion (GSH)	113
6.1.3.2.2 Malondialdehyd (MDA)	114
6.1.3.2.3 Myeloperoxidase (MPO)	114
6.2 Ergebnisse und Diskussion	115
6.2.1 Zytokine im Exsudat und Plasma	115
6.2.1.1 IL-1 $\beta$	115
6.2.1.2 TNF- $\alpha$	117
6.2.1.3 IL-6	118
6.2.2 Marker des oxidativen Stresses im Plasma und / oder im Exsudat	120
6.2.2.1 GSH	120
6.2.2.2 MDA	121
6.2.2.3 MPO	122
6.2.3 Zusammenfassung und Ausblick	123
6.3 Experimenteller Teil	126
6.3.1 „Six-day-old air pouch Modell“	126

6.3.1.1 Carrageen induzierte Entzündung im „Six-day-old air pouch Modell“	126
6.3.1.2 Applikation der Testsubstanzen	126
6.3.1.3 Exsudat- und Plasmagewinnung	127
6.3.2 Quantifizierung der Entzündungsmarker	127
6.3.2.1 Zytokine	127
6.3.2.2 Marker des oxidativen Stresses	128
6.3.2.2.1 Glutathion	128
6.3.2.2.2 Malondialdehyd	128
6.3.2.2.3 Myeloperoxidase	129
6.3.3 Auswertung	129
6.3.4 Reagenzien	130
<b>7. Pharmakokinetische Studie: Identifizierung phenolischer Metabolite im Serum gesunder Probanden nach Einnahme eines Weidenrindenextraktes</b>	<b>131</b>
7.1 Hintergrund	131
7.1.1 Hintergrund der pharmakokinetischen Studie	131
7.1.2 Rechtliche Grundlagen der pharmakokinetischen Studie als klinische Prüfung und gesetzliche Vorgaben für ihre Durchführung	132
7.1.3 Festlegung der Prüfmedikation durch Catechol-, Salicortin- und Tremulacingehaltsbestimmung in Assalix®, Optovit Actiflex® und Proaktiv®	133
7.2 Ergebnisse und Diskussion	134
7.2.1 Catechol-, Salicortin- und Tremulacingehalt in Assalix®, Optovit Actiflex® und Proaktiv®	134
7.2.2 Serumprobenanalytik	136
7.2.2.1 Validierung	136
7.2.2.2 Catechol- und Salicylsäurekonzentration im Serum gesunder Probanden nach Einnahme eines Weidenrindenextraktes und enzymatischer Aufarbeitung der Serumproben	137
7.2.2.3 Catechol- und Salicylsäurekonzentration in nicht enzymatisch aufgearbeiteten Seren gesunder Probanden nach Einnahme eines Weidenrindenextraktes	139
7.2.2.4 Catecholkonzentration in Seren gesunder Probanden nach Einnahme eines Weidenrindenextraktes und nur partieller enzymatischer Aufarbeitung der Serumproben	140
7.2.3 Zusammenfassung und Schlussfolgerung	141
7.2.4 Ausblick	142
7.3 Experimenteller Teil	143

7.3.1 Catechol-, Salicortin- und Tremulacingehaltsbestimmung in Assalix <sup>®</sup> , Optovit Actiflex <sup>®</sup> und Proaktiv <sup>®</sup>	143
7.3.1.1 Herstellung der Untersuchungslösungen	143
7.3.1.2 Kalibrierung	144
7.3.1.3 HPLC-Analytik	144
7.3.1.4 Berechnung des Catechol-, Salicortin- und Tremulacingehalts in Assalix <sup>®</sup> , Optovit Actiflex <sup>®</sup> und Proaktiv <sup>®</sup>	145
7.3.1.5 Verwendete Geräte, Chemikalien und Verbrauchsmaterialien in Kapitel 7.3.1	145
7.3.2 Ablauf der klinischen Prüfung	146
7.3.2.1 Probandenrekrutierung	146
7.3.2.2 Kinetiktag	147
7.3.2.3 Diätplan	148
7.3.2.4 Blutentnahme und Serumgewinnung	148
7.3.3 Analytik der Serumproben	149
7.3.3.1 Aufarbeitung und Extraktion	149
7.3.3.1.1 Enzymatische Aufarbeitung und Extraktion der Serumproben	149
7.3.3.1.2 Nicht-enzymatische Aufarbeitung und Extraktion der Serumproben	149
7.3.3.1.3 Partiiell enzymatische Aufarbeitung und Extraktion der Serumproben	150
7.3.3.2 HPLC-Analytik der aufgearbeiteten Serumproben	150
7.3.3.3 Gehaltsbestimmungsmethode	151
7.3.3.3.1 Matrixherstellung für die Kalibrierung	151
7.3.3.3.2 Herstellung der Kalibrierlösungen	152
7.3.3.4 Validierung der Gehaltsbestimmungsmethode	152
7.3.3.4.1 Kalibrierung	152
7.3.3.4.2 Wiederfindungsversuche	152
7.3.3.4.3 Detektions- und Quantifizierungsgrenze	153
7.3.3.4.4 Präzision	153
7.3.3.4.5 Selektivität	153
7.3.3.5 Pharmakokinetische Parameter	154
7.3.3.6 Verwendete Geräte, Chemikalien und Verbrauchsmaterialien in Kapitel 7.3.3	154
<b>8. Zusammenfassung und Ausblick</b>	<b>155</b>
<b>9. Abkürzungsverzeichnis</b>	<b>159</b>
<b>10. Literaturverzeichnis</b>	<b>163</b>

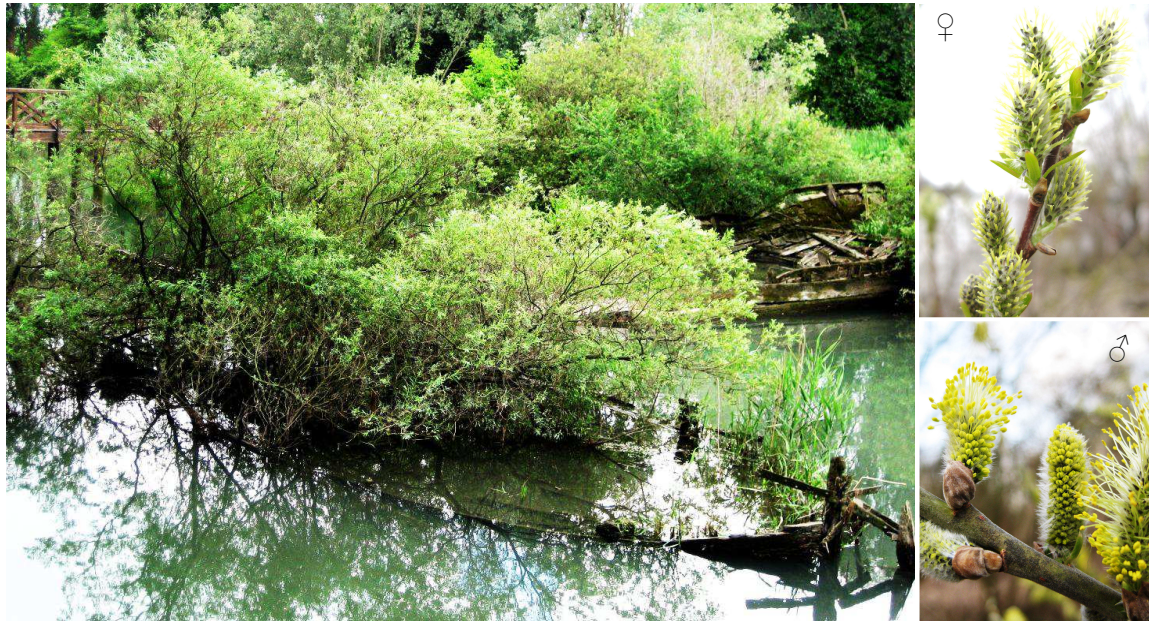


# 1. Einleitung

## 1.1 *Salix*: die Weide

Die Familie der Salicaceae (Weidengewächse) fasst mehrere Gattungen zusammen, wobei die zwei wichtigsten Gattungen *Salix* und *Populus* sind [1]. Die Gattung *Salix* (Weide) beinhaltet schätzungsweise 330 – 500 Arten, welche in diversen Wuchsformen von baum-, strauchartig bis kriechend vorkommen. In Europa sind circa 70 [2] und in Deutschland um die 40 Weidenarten bekannt [3]. Es kommen nicht nur die reinen Arten, sondern auch Artbastarde durch die Hybridisierungsneigung der Weiden und die Fertilität ihrer Hybride vor, wobei die Hybridisierungsneigung aufgrund der großen phänotypischen Unterschiede der Arten wohl überschätzt wird [2]. Bei der Weide handelt es sich um zweihäusige, also eingeschlechtlich blühende Pflanzen, welche häufig vor, aber auch während des Blattaustriebs blühen. Die männlichen Blüten sind mit ihren langen Staubblättern gelb, die weiblichen Blüten mit ihren Fruchtblättern grün gefärbt [4]. Der charakteristische Blütenstand wird als Kätzchen bezeichnet, bei denen es sich um Ähren handelt (s. Abb. 1.1). Die Weidenfrüchte sind Kapseln [5].

Viele *Salix*-Arten sind in dauer- bis wechselfeuchten Gebieten wie See- oder Flussufern zu finden (s. Abb. 1.1). Ihre Wuchsform variiert zwischen großen Bäumen (bis 25 m) wie bei *Salix alba* (Silberweide) oder bei *Salix fragilis* (Bruchweide), kleinen Bäumen wie bei *Salix daphnoides* (Reifweide), Großsträucher wie bei *Salix purpurea* (Purpurweide) und Zwergsträucher wie bei *Salix retusa* (stumpfblättrige Weide). Neben der Wuchsform unterscheiden sie sich noch in der Blattbehaarung und Blattform, wobei diese lanzettlich, linealisch oder auch elliptisch (z.B. *S. retusa*), sein kann, dafür aber meist gezähnt [5,6]. Die zur Drogenengewinnung verwendeten *Salix*-Arten weisen aber meist längliche bis lanzettliche Blätter auf [4].



**Abb. 1.1:** Weiden im dauerfeuchten Gebiet zwischen Schiffswracks am Sile (Fluss nahe Treviso, Italien) und männliche (♂) sowie weibliche (♀) Blütenstände zweier Weiden am Rhein (Höhe Düsseldorf-Benrath).

## 1.2 Salicis cortex: die Weidenrinde

### 1.2.1 Salicis cortex: von der historischen Verwendung der Weidenrinde zur Entwicklung von Aspirin®

Die Weidenrinde (*Salicis cortex*) als Arzneidroge (getrocknetes, pflanzliches Arzneimittel) ist schon seit über 2000 Jahren bekannt. Zum einen verwendeten schon Ärzte und Persönlichkeiten der Antike wie Hippokrates (460-370 v. Chr.), Plinius der Ältere (um 50 n. Chr.) und Dioscorides (um 100 n. Chr.) die Weidenrinde als schmerzlinderndes, fiebersenkendes und entzündungshemmendes Arzneimittel [7]. Zum anderen wurde im Rahmen der Signaturenlehre im Mittelalter die Verwendung der Weidenrinde gegen Sumpffieber (Malaria) und steife Gelenke angepriesen, da die Weide häufig in sumpfigen Gebieten wächst und ihre Zweige recht flexibel sind [8].

Der englische Pfarrer Edward Stone schrieb in einem Bericht 1763 über seine sechsjährige Erfahrung der erfolgreichen Behandlung verschiedener Fieberarten mit Weidenrinde [9]. Er erwähnte hier, dass er aufgrund des bitteren Geschmacks, welcher ihn an die zur Behandlung der Malaria verwendete Chinarinde erinnerte, und ihres Vorkommens in Sümpfen auf die Weidenrinde zur Behandlung unterschiedlicher Fieberarten aufmerksam wurde. Damit schlug er die erste Brücke von der mittelalterlichen Signaturenlehre zur modernen klinischen Forschung.



In dem folgenden Jahrhundert wurde Salicin als wirksamer Inhaltsstoff aus Weidenrinde zunächst in unreiner Form von den Italienern Brugnatelli und Fontana Anfang der zwanziger Jahre des neunzehnten Jahrhunderts, in reiner Form 1828 von dem deutschen Apotheker Buchner und 1829 von dem französischen Apotheker Leroux in kristalliner Form isoliert [7], [9]. In einem Selbstversuch stellte Buchner nachfolgend die antipyretische Wirkung des Salicins vor mit deutlicher Überlegenheit der Verträglichkeit gegenüber dem teuer importierten Chinin [10]. 1838 erfolgte durch Hydrolyse und Oxidation die Darstellung von Salicylsäure aus Salicin durch den italienischen Chemiker Piria. Salicylsäure war bereits als Spirsäure (synonym) schon drei Jahre zuvor aus *Spiraeae ulmariae flos* (Mädesüßblüten) über die Isolierung von Salicylaldehyd durch den Schweizer Apotheker Pagenstecher und nachfolgende Oxidation durch den deutschen Chemiker Lowig dargestellt worden [7, 8].

1876 veröffentlichte Stricker die erfolgreiche Behandlung der Polyarthritidis rheumatica mit Salicylsäure [9] und MacLagan die erfolgreiche Behandlung des akuten Rheumatismus mit Salicin im Vergleich zu der vor allem seitens des Gastrointestinaltrakts schlechter verträglichen Therapie mit Salicylsäure [11]. 1860 gelang Kolbe die Synthese der Salicylsäure in größeren Maßstäben [12]. Aufgrund der reizenden Wirkung der Salicylsäure im Magen-Darm-Trakt wurde von der Firma Bayer eine Acetylierung der Salicylsäure angestrebt, die 1879 durch den deutschen Chemiker Felix Hoffmann gelang. 1899 wurde Acetylsalicylsäure als Aspirin® („A“ als Abkürzung für acetyliert, „-spirin“ als Abwandlung für Spirsäure) erstmals in den Handel mit durchschlagendem Erfolg eingeführt und löste Salicylsäure und vorerst auch die Weidenrinde als schmerzstillendes, antirheumatisches und fiebersenkendes Mittel ab [9, 13].

### 1.2.2 Salicis cortex: aktuelle Indikationen und Monographien der Weidenrinde

Ende der achtziger Jahre bis Anfang der neunziger Jahre des vergangenen Jahrhunderts stieg wieder das Interesse an Weidenrindenextrakt-Präparaten zur Behandlung von Schmerzen und rheumatischen Erkrankungen [14]. Dies begründete sich vor allem in der Verwendung von nicht steroidal Antirheumatika (NSAR oder NSAID für „non steroidal anti-inflammatory drug“) bei der Dauertherapie chronisch entzündlicher (z.B. rheumatischer) Erkrankungen und chronischer Schmerzen. Diese dauerhafte Anwendung von NSAR kann erhebliche Nebenwirkungen wie Magen- und Darmulcera bedeuten, woraus die Suche nach besser verträglichen Therapien resultierte [15].

Indiziert ist die Weidenrinde für die Behandlung von Kreuzschmerzen, der milden Osteoarthritis und rheumatischer Beschwerden laut aktueller ESCOP-Monographie (ESCOP = European Scientific Cooperative on Phytotherapy) [16] sowie bei fieberhaften Erkrankungen,

rheumatischen Beschwerden und Kopfschmerzen laut der Monographie der Kommission E von 1984 [4]. In der Weidenrindenmonographie des HMPC (Committee on Herbal Medicinal Products) der europäischen Arzneimittelagentur EMA (European Medicinal Agency) wird die Anwendung eines mit Ethanol 70% ausgezogenen Weidenrindenextraktes mit einem DEV (Droge-Extrakt-Verhältnis) von 8-14:1 und einer täglichen Gesamtsalicingabe von 240 mg bei Kreuzschmerzen als gut etabliert beschrieben. Anders ausgezogene Extrakte und andere Indikationsgebiete wie Gelenksschmerzen, Fieber und Kopfschmerzen werden unter traditioneller Verwendung aufgeführt [17]. Die Monographie der WHO (World Health Organisation) gibt ebenfalls die Anwendung bei Fieber, Schmerz, rheumatischen Beschwerden und auch bei Erkältungskrankheiten an [18]. Das Indikationsgebiet erstreckt sich demnach allgemein auf entzündliche Erkrankungen, Schmerzen und Fieber. Die ältere Monographie der Kommission E empfiehlt hierbei eine Tagesdosierung des Weidenrindenextraktes, welche einer Tagesdosis von 60 mg bis 120 mg Salicin entspricht. Hingegen gibt die ESCOP-Monographie eine Tagesdosierung von 120-240 mg Gesamtsalicin an. Die aktuelle HMPC-Monographie schließt sich der höheren Dosierung an.

Die Qualität der Droge Weidenrinde wird von der Monographie „Weidenrinde“ im Europäischen Arzneibuch 6.1 vorgegeben [19]. Sie wird als „die ganze oder zerkleinerte, getrocknete Rinde junger Zweige oder die ganzen, getrockneten Stücke junger Zweige“ beschrieben. Zur Drogengewinnung werden in der Monographie die möglichen Stammpflanzen *Salix purpurea*, *Salix daphnoides* und *Salix fragilis* (s. 1.1) genannt. Jede andere Art der Gattung *Salix* darf ebenso zur Drogengewinnung verwendet werden, insofern die erhaltene Droge einen Mindestgehalt an Gesamtsalicin von 1,5% aufweist. Des Weiteren ist im Europäischen Arzneibuch eine Monographie zum Weidenrindentrockenextrakt enthalten, welcher die Mindestanforderung von 5% Gesamtsalicin enthält und Wasser oder Ethanol-Wasser-Mischungen mit einem maximalen Ethanolanteil von 80% (V/V) als Extraktionsmittel vorschreibt.

### 1.2.3 Salicis cortex: Inhaltsstoffe der Weidenrinde

Grundsätzlich werden die Inhaltsstoffe der Weidenrinde in die drei Stoffgruppen der Phenolglykoside, der Flavonoide und der Gerbstoffe unterschieden. Dabei variieren die Inhaltsstoffspektren unter den verschiedenen Arten erheblich [5, 20].

### 1.2.3.1 Phenolglykoside

Die Klasse der Phenolglykoside ist die bisher wichtigste und die am besten untersuchte Stoffgruppe der Gattung *Salix*. Wie schon in 1.2.1 erläutert, ist das Phenolglycosid Salicin der wohl populärste Inhaltsstoff der Weidenrinde. Allerdings ist Salicin in der Weidenrinde nur in relativ geringen Mengen vorhanden, seine Esterverbindungen, vor allem das Salicortin, kommen weitaus häufiger vor [21]. Thieme berichtete 1964 zuerst von der Isolierung des Salicortins aus der Purpurweide [22] und vermutete zunächst, dass es sich um ein Derivat des Salicoylsalicins handelte [23]. Die Strukturen von Salicortin und Tremulacin wurden 1971 von Pearl und Darling aufgeklärt [24], wobei bis heute die Konfiguration des chiralen Zentrums in der 1-Hydroxy-6-oxo-2-cyclohexencarbonsäureester-Partialstruktur (s. Tab. 1.2.3.1) nicht geklärt ist.

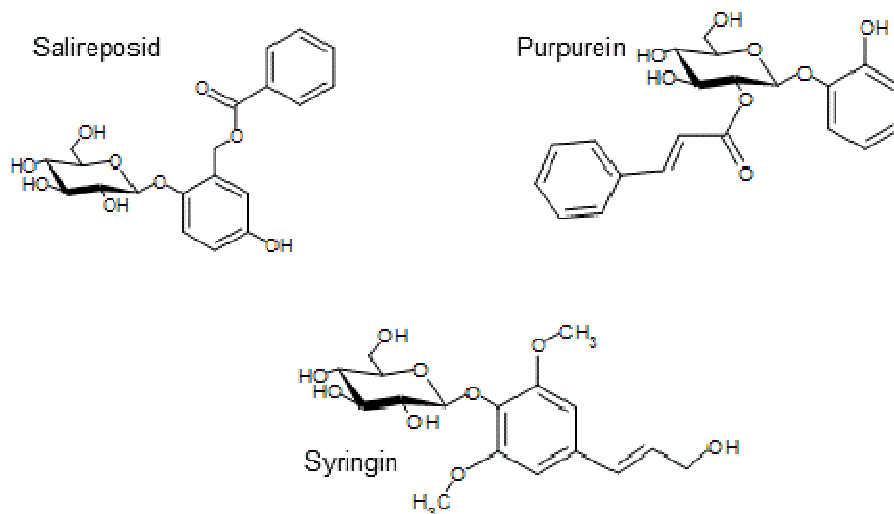
Salicortin ist in *Salicis purpureae* cortex bis zu 9%, in *Salicis daphnoides* cortex zwischen 3 - 11% und in *Salicis fragilis* cortex bis zu 1,5% enthalten. Bei der Purpurweidenrinden und der Reifweidenrinde stellt Salicortin damit das Hauptphenolglykosid dar, bei der Bruchweidenrinde ist dies jedoch 2'-O-Acetylsalicortin (bis 8%). Tremulacin ist bei den Rinden der drei vorher genannten Weidenarten maximal zu 1,5%, Salicin unter 1% enthalten. Die für die Drogengewinnung aufgrund des geringen Gesamtsalicingehalts nicht geeignete Silberweide enthält des Weiteren bemerkenswert viel 2'-O-Acetylsalicin. [5, 25].

Freischmidt et al. [26] isolierten außerdem mit Cumarsäure veresterte Salicinderivate aus einem Purpurweidenrindenextrakt, das Trichocarposid (an 6'-Position der Glucose verestert) sowie das Populosid B (an der 7-Position des Salicylalkohols verestert).

**Tab. 1.2.3.1:** Die Strukturen der häufigsten Salicinderivate (=Salicylalkoholderivate) in arzneilich genutzten Weidenrinden.

Salicinderivate		
Grundgerüst		
	R <sub>1</sub>	R <sub>2</sub>
Salicin	H	H
Salicortin		H
Acetylsalicortin		
Tremulacin		

Andere Phenolglycoside wie Syringin und Purpurein, die keine Derivate des Salicins sind, wurden in der Purpurweidenrinde, Syringin außerdem noch in der Bruchweidenrinde und Salireposid in der Reifweidenrinde gefunden. Alle Phenolglykoside sind  $\beta$ -D-verknüpft. [5, 21, 25].



**Abb 1.2.3.1:** Strukturformeln von den nicht zu den Salicylalkoholderivaten gehörenden Phenolglykosiden in arzneilich genutzten Weidenrinden.

Biosynthetisch ist für die Salicylalkoholderivate (Derivate des Salicins) gezeigt worden, dass sowohl der Salicylalkohol-Teil, als auch der 1-Hydroxy-6-oxo-2-cyclohexencarbonsäure-Teil von Salicortin, Tremulacin oder Acetylsalicortin aus dem Shikimisäureweg stammt und es sich somit um verkürzte Phenylpropane handelt [27].

Julkunen-Tiitto und Meier [28] sowie Ruuhola et al. [29] führten intensive Studien zur Stabilität der Salicylalkoholderivate, insbesondere bezüglich der 1-Hydroxy-6-oxo-2-cyclohexencarbonsäureester-Partialstruktur durch. Salicin wird demnach durch  $\beta$ -Glucosidasen in Salicylalkohol (= Saligenin) und Glucose gespalten. Die 1-Hydroxy-6-oxo-2-cyclohexencarbonsäureester-Partialstruktur wird durch tierische Leberesterasen, durch Blattenzyme, aber auch bei leicht alkalischem pH-Wert in der Abwesenheit von Enzymen zunächst zum 1-Hydroxy-6-oxo-2-cyclohexencarboxylat-Anion hydrolysiert. Durch eine Decarboxylierung zu 2-Hydroxy-3-cyclohexenon und eine nachfolgende Oxidation und Tautomerisierung wird dieser Teil letztendlich zu Catechol abgebaut. Da die Stabilität der Salicylalkoholderivate im Folgenden auch Thema dieser Arbeit sein wird, ist ein Schema dieses Abbaus in Kapitel 3 unter 3.1 zu finden.

In der Pflanzenphysiologie spielt der Abbau der Salicylalkoholderivate zu Saligenin und Catechol eine wichtige Rolle, da sie als Fraßschutzmittel gegenüber Insekten dienen. Es wurde beobachtet, dass die Larven von Fraßfeinden bei besonders Salicylalkohol-reichen Weiden langsamer wachsen als bei Salicylalkohol-armen. Dies wird unter anderem den Effekten der Abbauprodukte zugeschrieben. [30, 31]

#### 1.2.3.2 Flavonoide

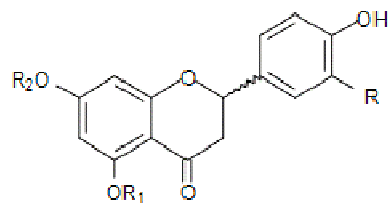
Verschiedenste Flavonoide wurden aus unterschiedlichen Pflanzenorganen der Gattung *Salix* isoliert, wobei in den Weidenrinden vor allem die Flavanone vom Typ der Naringeninglucoside und das Chalkonderivat Isosalipurposid zu finden sind.

Isosalipurposid ist in der Reifweidenrinde von 0,2% bis 1,5% und in der Purpurweidenrinde von 0,2% bis 2,2% enthalten. Die Reifweidenrinde enthält zwischen 0,3% und 1,0%, die Purpurweidenrinde um 0,6% das Diastereomerenmisch (+)/(-)-Naringenin-5-O- $\beta$ -glucosid (Salipurposid). Naringenin-7-O- $\beta$ -glucosid (Prunin) ist in der Reifweidenrinde zwischen 0,3% und 1,5%, in der Purpurweidenrinde zwischen 0,4% und 1,5% zu finden. Eriodictyol-7-O- $\beta$ -glucosid wurde in *Salicis purpureae* cortex in relativ kleinen Mengen zwischen 0,2% bis 0,4% gefunden [5, 21, 25].

**Tab. 1.2.3.2:** Die Strukturformeln der Flavonoide in arzneilich genutzten Weidenrinden.

**Flavanone**

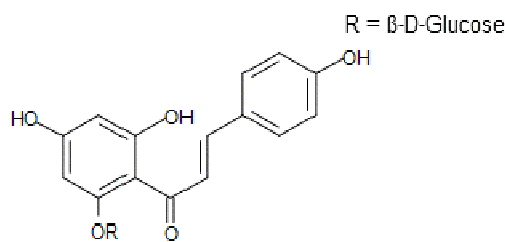
Grundgerüst



	R	R <sub>1</sub>	R <sub>2</sub>
Naringenin-5-glucosid	H	β-D-Glucose	H
Naringenin-7-glucosid	H	H	β-D-Glucose
Eriodictyol-7-glucosid	OH	H	β-D-Glucose

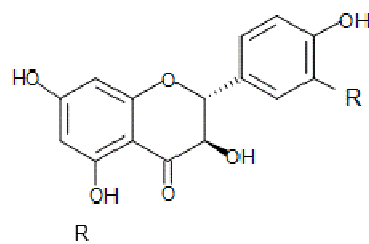
**Chalkon**

Isosalipurposid



**Flavanonole**

Grundgerüst



Dihydrokämpferol

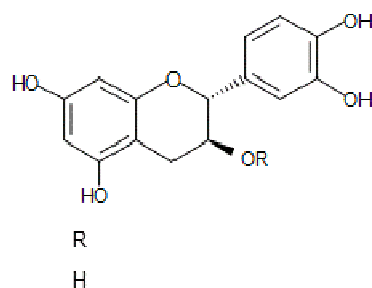
H

Taxifolin

OH

**Flavanole**

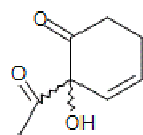
Grundgerüst



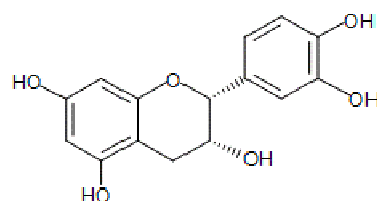
Catechin

H

Catechin-3-O-(1-Hydroxy-6-oxo-2-cyclohexencarbonsäure)-ester



Epicatechin



Freischmidt [32] isolierte zudem zahlreiche weitere Verbindungen aus einem Purpurweidenrindenextrakt. Hier wurden mit Cumarsäure an 6''-Position der Glucosepartialstruktur veresterte Verbindungen des Naringenin-5-O- $\beta$ -glucosids und des Isosalipurposids als Inhaltsstoffe von *Salicis purpureae* cortex gezeigt. Außerdem wurden das Flavanonolderivat Dihydrokämpferol-7-O- $\beta$ -glucosid sowie die Aglyka Dihydrokämpferol und Taxifolin aus dem Extrakt isoliert.

Auch Flavanolverbindungen wie das Catechin und seine Derivate sind aus Weidenrinden isoliert worden. In *Salicis daphnoides* cortex wurde ein Catechingehalt von 0,5%, in *Salicis purpureae* cortex von 1% nachgewiesen [5]. Catechin, Epicatechin, Gallocatechin sowie Catechin-3-O-(1-hydroxy-6-oxo-2-cyclohexencarbonsäure)-ester mit seiner strukturellen Verwandtschaft zu Salicortin sind als Inhaltsstoffe eines Purpurweidenrindenextraktes identifiziert worden [33].

#### 1.2.3.3 Gerbstoffe und weitere Inhaltsstoffe

Zu der Stoffklasse der Polyphenole gehörend, sind in den Rinden der verschiedenen Weidenarten neben den Flavonoiden auch die Catechingerbstoffe enthalten. Hierbei handelt es sich um oligomere und polymere Proanthocyanidine, welche sich aus Catechin-, bzw. Epicatechin-Monomeren und deren Enantiomeren zusammensetzen. Sie sind in Konzentrationen von 3% bis 20% in den Rinden enthalten [5].

Aus dieser Stoffgruppe sind beispielsweise die Proanthocyanidine B1 (Epicatechin-(4 $\beta$ →8)-catechin) und B3 (Catechin-(4 $\alpha$ →8)-catechin) sowie trimere Proanthocyanidine wie Epicatechin-(4 $\beta$ →8)-catechin-(4 $\alpha$ →8)-catechin und Epicatechin-(4 $\beta$ →8)-epicatechin-(4 $\beta$ →8)-catechin aus Purpurweidenrinde isoliert worden [33].

Des Weiteren wurde von Isolierungen einfacher phenolischer Moleküle aus Weidenrinde, unter anderem aus der Purpurweidenrinde berichtet [26, 34]. Es wurde dabei von verschiedenen Zimtsäurederivaten wie trans-p-Cumarsäure, aber auch von p-Hydroxybenzoesäure und Catechol (Synonyme: Pyrocatechol, Brenzcatechin) als Inhaltsstoffe der Weidenrinde berichtet. Sicherlich handelt es sich hierbei nicht um genuin in der Weidenrinde vorkommende Verbindungen, sondern vielmehr um Hydrolyse- und folgende Abbauprodukte verschiedener Salicylalkohol- und Flavonoidderivate (s. 1.2.3.1 und 1.2.3.2). Die teilweise recht drastisch gewählten Extrakterstellungen (60°C in Methanol bei [34]), welche den Isolierungen vorangehen, ermöglichen vermutlich diesen Abbau. In Kapitel 2 unter 2.2.5.3 und in Kapitel 3 wird insbesondere auf die Labilität von Verbindungen mit einer 1-Hydroxy-6-oxo-2-cyclohexencarbonsäureester-Partialstruktur und ihrem Abbauprodukt Catechol eingegangen.

Demnach sind je nach Extrakterstellung in der Weidenrinde unterschiedliche Strukturen zu finden. Eine besonders milde Extraktion gibt am ehesten die genuinen Inhaltsstoffe in der Rinde wieder.

### **1.3 Studien zu Wirkungen der Weidenrinde**

#### 1.3.1 *In vivo* Studien (Tiermodelle)

1978 wurde eine der ersten dokumentierten pharmakologischen Untersuchungen eines Weidenrindenextraktes an Wistar-Ratten durchgeführt. Der Extrakt zeigte entzündungshemmende Wirkungen im Adjuvans-induzierten Arthritis-Modell, bei der hitzeinduzierten Entzündung, beim Dextran- und Carrageen-induzierten Rattenpfotenödem, wobei im letzteren die stärkste Wirkung beobachtet wurde. Es wurde außerdem ein antipyretischer Effekt, nicht aber ein Einfluss auf die Schmerzempfindung gegenüber Elektrostreizen beobachtet (in [14]).

Glinko stellte eine analgetische Wirkung im „Hot-Plate-Test“ mit Mäusen, bei Wistar-Ratten einen antipyretischen Effekt bei hefeinduziertem Fieber und im Carrageen-induzierten Rattenpfotenödemtest eine entzündungshemmende Wirkung eines standardisierten Weidenrindenextraktes vor [35]. Es wurde hierbei eine vergleichbare oder sogar überlegene Wirkung des Weidenrindenextraktes im Vergleich zu hohen Dosen Acetylsalicylsäure festgestellt.

Khayyal et al. [36] untersuchten mögliche Mechanismen der entzündungshemmenden Eigenschaften eines wässrigen Weidenrindenextraktes in der Carrageen-induzierten Entzündung im „Six-day old air pouch model“ (Modell der akuten Entzündung, vgl. Kapitel 6) sowie im „adjuvant induced arthritis model“ (Modell der chronischen Entzündung). Auch hier zeigte der Extrakt eine mindestens genauso starke Hemmung aller Entzündungsparameter wie die gleiche Dosis Acetylsalicylsäure (in mg/kg KG), bei den Markern des oxidativen Stresses durchweg Überlegenheit. Quantifiziert wurde das Exsudatvolumen, die Leukozyteninfiltration, Zytokinexpressionen (IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$ , IL-6, vgl. Kapitel 6) im Serum, Prostaglandin E<sub>2</sub> (PGE<sub>2</sub>) sowie Leukotrien B<sub>4</sub> (LTB<sub>4</sub>) im Exsudat und die Marker des oxidativen Stresses wie GSH und MDA (vgl. Kapitel 6) im Blut der Tiere. Des Weiteren wurde die Aktivität der Cyclooxygenase-1 und -2 (COX-1 und COX-2) durch den Weidenrindenextrakt im gleichen, im Fall von COX-2 sogar im größeren Ausmaß als durch Acetylsalicylsäure gehemmt.

In dem Entzündungsmodell des Carrageen-induzierten Rattenpfotenödems zeigte dieser wässrige Weidenrindenextrakt ebenfalls eine gleiche ödemreduzierende Wirkung wie ASS in



gleicher mg/kg Dosierung, wobei die Polyphenolfraktion sowie die Salicinfraction des Extraktes hieran beteiligt zu sein schien (in [37]).

Der gleiche wässrige Extrakt wurde in einer aktuellen Studie ebenfalls in Ratten auf seine antidepressive Wirksamkeit getestet. Interessanterweise zeigte der Extrakt und seine Salicinderivat-angereicherte Fraktion nach zweiwöchiger täglicher Einnahme eine stärkere antidepressive Wirkung als die antidepressive Vergleichsmedikation Imipramin im „Forced Swimming Test“. Dies wird auf den Zusammenhang von entzündlichen Geschehen mit depressiven Erkrankungen zurückgeführt. [38].

In verschiedenen Tiermodellen wurden vor allem die antiinflammatorischen Wirkungen des Weidenrindenextraktes untersucht und bestätigt. Weniger intensiv wurde die schmerzlindernde Wirkung und der fiebersenkende Effekt untersucht.

### 1.3.2 Klinische Studien

Es wurden klinische Studien zur Wirksamkeit verschiedener Weidenrindenextrakte bei der Schmerzlinderung von Kreuzschmerzen sowie in der Schmerzbehandlung bei rheumatischen Erkrankungen wie der Osteoarthrose und der rheumatoiden Arthritis durchgeführt.

Der Kreuzschmerz wird definiert als Schmerz zwischen der untersten Rippe und dem Gesäß [39]. Chrubasik et al. führten im Jahr 2000 eine placebokontrollierte Studie mit zwei verschiedenen Dosierungen (120 mg und 240 mg Gesamtsalicin) eines 70% ethanolischen Weidenrindenextraktes bei Patienten (70 Patienten je Gruppe) mit chronischen Kreuzschmerzen durch. Es wurde ein dosisabhängiger analgetischer Effekt des Weidenrindenextraktes mit Überlegenheit der höheren Dosierung nach vierwöchiger Therapie beobachtet. Des Weiteren wurde in der Placebogruppe signifikant häufiger die Notfallmedikation (Tramadol) benötigt [40]. Im Folgejahr wurde ebenfalls von Chrubasik et al. eine offene, randomisierte und verumkontrollierte Studie bei Kreuzschmerz-Patienten mit dem gleichen Weidenrindenextrakt veröffentlicht. Es zeigte sich mit 114 Patienten je Gruppe, dass die Anwendung eines Weidenrindenextraktes mit 240 mg Gesamtsalicin am Tag genauso effektiv war wie die täglich empfohlene Dosis von 12,5 mg des COX-2-Inhibitors Rofecoxib. Dieses Ergebnis ist recht beeindruckend, allerdings ist durch die Offenheit der Studie und dem daraus resultierenden Bewusstsein von Arzt und Patient über die Art der Medikation, die Objektivität zu der Beurteilung der Beeinflussung der Schmerzstärke in Frage zu stellen. Chrubasik et al. [41] führten mit dem gleichen Weidenrindenextrakt noch eine weitere offene, nicht randomisierte Studie bei Patienten mit chronischen Rückenschmerzen durch. Das Ergebnis dieser Studie war, dass die vierwöchige Therapie mit einem Weidenrindenextrakt entsprechend 240

mg Gesamtsalicin am Tag zu mehr schmerzfreien Patienten führte als die gleich lange Gabe eines Weidenrindenextraktes mit 120 mg Gesamtsalicin/Tag oder auch die konventionelle Behandlung. Das Studiendesign war allerdings für eine objektive Beurteilung nicht ausreichend.

In einer weiteren Studie untersuchten Krivoy et al [42] die Beeinflussung der Thrombozytenaggregation bei Patienten mit Kreuzschmerzen durch Weidenrindenextrakt-Gabe. Die Patienten bekamen entweder einen 70% ethanolischen Weidenrindenextrakt entsprechend 240 mg Gesamtsalicin am Tag oder Placebo. Eine weitere Patientengruppe mit ischämischer Herzerkrankung bekam 100 mg ASS am Tag. Die Thrombozytenaggregation wurde durch ASS deutlich beeinflusst, durch Weidenrindenextrakt-Einnahme lediglich geringfügig. Die Patienten der Placebogruppe griffen signifikant häufiger zu der Notfallmedikation (Tramadol), was auf eine Wirkung des Weidenrindenextraktes im Vergleich zu Placebo rückschließen lässt.

Zur analgetischen Wirksamkeit bei Osteoarthrosen im Knie (Gon) und in der Hüfte (Cox) gibt es unterschiedliche Ergebnisse. Schmidt et al. [43, 44] belegten die analgetische Wirksamkeit eines Weidenrindenextraktes mit der täglichen Dosierung von 240 mg Gesamtsalicin bei Patienten in dieser Indikation. Diese doppelblinde, randomisierte, placebokontrollierte Studie mit je 39 Patienten pro Gruppe wurde über zwei Wochen durchgeführt. Keine klinische Wirksamkeit der Weidenrinde (70% ethanolischer Extrakt, 240 mg Gesamtsalicin/Tag) in der Behandlung der zum rheumatischen Formenkreis gehörenden Cox- und Gonarthrosen konnten Biegert et al. [45, 46] mit 43 Patienten je Gruppe in einer randomisierten, verum- und placebokontrollierten Studie nach 6 Wochen Therapie feststellen. Demgegenüber stellten Beer und Wegener [47] in einer klinischen Studie mit Cox- und Gonarthrosepatienten sehr wohl eine klinische Wirksamkeit eines Weidenrindenextraktes fest. 83 Patienten wurden mit einem 70% ethanolischen Weidenrindenextrakt (entsprechend 240 mg Gesamtsalicin) und 41 Patienten mit einer Standardtherapie mit nichtsteroidalen Antirheumatika behandelt. Diese offene, multizentrische Studie kommt zu dem Ergebnis, dass nach einer sechswöchigen Anwendung die Therapie mit dem Weidenrindenextrakt mindestens genauso effektiv ist wie die Standardtherapie. Die Autoren kommen zu dem Schluss, dass in ihrer Studie der WRE deswegen im Gegensatz zu Biegert et al. Wirksamkeit zeigt, da hier Patienten mit milderer Formen der Cox- und Gonarthrosen eingeschlossen wurden. Eine weitere Studie zur Therapie der Cox- und Gonarthrosen verwendete im Gegensatz zu den vorher wässrig-alkoholisch ausgezogenen Extrakten einen rein wässrigen Weidenrindenextrakt. In dieser randomisierten, doppelblinden und verumkontrollierten Studie wurde eine vergleichbare analgetische Aktivität des Weidenrindenextraktes (sowohl bei 90 mg, als auch bei 180 mg Gesamtsali-

cin/Tag) gegenüber Diclofenac (150 mg/Tag) festgestellt. Die Patientenkollektive von 17 bis 22 Personen waren verhältnismäßig klein [15].

Wagner [46, 48] konnte in einer Studie mit rheumatoider Arthritis-Patienten keine klinisch relevante Schmerzverminderung durch einen 70% ethanolischen Weidenrindenextrakt (240 mg Gesamtsalicin/Tag) gegenüber Placebo (13 Patienten je Gruppe) nach sechswöchiger Therapie feststellen.

Zusammenfassend ist festzuhalten, dass die Weidenrinde als ethanolischer Extrakt bei der Schmerzbehandlung von Kreuzschmerzen gute Wirksamkeit in der täglichen Dosierung von 240 mg Gesamtsalicin, auch im Vergleich zur konventionellen Schmerztherapie mit nichtsteroidalen Analgetika, bzw. Antirheumatika zeigt. In der Schmerzbehandlung der teilweise entzündlichen Erkrankungen der Gon- und Cox-Arthrosen wurden widersprüchliche Ergebnisse erhalten. Die Behandlung der chronisch entzündlichen Erkrankung der rheumatoiden Arthritis mit einem ethanolischen Weidenrindenextrakt zeigte keine schmerzlindernde Wirkung der Weidenrinde, allerdings war hier die Probandenzahl auch sehr klein und der Behandlungszeitraum kurz gewählt. Es gibt Anzeichen einer klinischen Wirksamkeit von Weidenrindenextrakt-Präparaten im Einsatz bei rheumatischen Erkrankungen. In diesem Indikationsgebiet wird ihr Einsatz laut aktueller Monographien (s. 1.2.2) empfohlen. Studien mit mehr Studienteilnehmer und einem größeren Zeitraum müssten vor allem im Bereich der rheumatoiden Arthritis noch durchgeführt werden (Übersichtsarbeiten s. [49, 50]).

#### **1.4 Verträglichkeit der Weidenrinde und toxikologische Untersuchungen**

Bei allen der in 1.3.2 genannten klinischen Studien wurden bei Einnahme eines Weidenrindenextraktes bis täglich 240 mg Gesamtsalicin keine schwerwiegenden unerwünschten Reaktionen beobachtet. Das Arzneimittel zeichnet sich durch eine allgemein gute Verträglichkeit aus. Beobachtet wurden am häufigsten Magenbeschwerden und allergische Hautreaktionen von geringer Intensität. Die Häufigkeit der unerwünschten Wirkungen war in der Verumgruppe meist so hoch wie in den Placebogruppen (z.B.: [44]).

Laut aktueller Monographien sind Weidenrindenextraktpräparate bei Kindern unter 12 Jahren kontraindiziert, da durch strukturelle Verwandtschaft von Salicin zur Acetylsalicylsäure (ASS) ein Zusammenhang zu dem mit ASS in Verbindung gebrachten Reye-Syndrom bestehen könnte. Kontraindikation besteht außerdem bei Überempfindlichkeit gegenüber Salicylaten sowie anderer NSAIDs, im letzten Schwangerschaftstrimester aufgrund einer möglichen Wehenhemmung und bei aktiven Magengeschwüren [16-18].

Glinko [35] untersuchte die Auswirkungen verschiedener Dosierungen eines Weidenrindenextraktes im Vergleich zu Acetylsalicylsäure auf die Magenschleimhaut bei der oralen Gabe in Mäusen. Der Weidenrindenextrakt zeigte keine bis in Einzelfällen bei besonders hoher Dosierung lediglich leicht reizende Effekte auf die Magenschleimhaut. Im Vergleich bewirkte die antiinflammatorisch äquipotente Dosierung von ASS Magenschleimhautulcerationen in den Mäusen. Bei gleicher entzündungshemmender Wirkung hat die Weidenrinde also deutlich weniger Nebenwirkungen. Es wurde in derselben Studie auch versucht, im Rahmen der akuten Toxizität die LD50 (Dosis, bei der 50% der Tiere sterben) des Weidenrindenextraktes zu bestimmen. Dies gelang nicht, da auch bei zweihundertfach höherer Dosierung als in den pharmakologischen Modellen sich keine letale Wirkung einstellte.

Das in der Weidenrinde vorkommende Salicin verursacht bei isolierter Gabe keine Läsionen der Magenschleimhaut in Ratten, auch nicht in höheren Dosierungen; Natriumsalicylat und Saligenin in Dosisabhängigkeit hingegen schon [51].

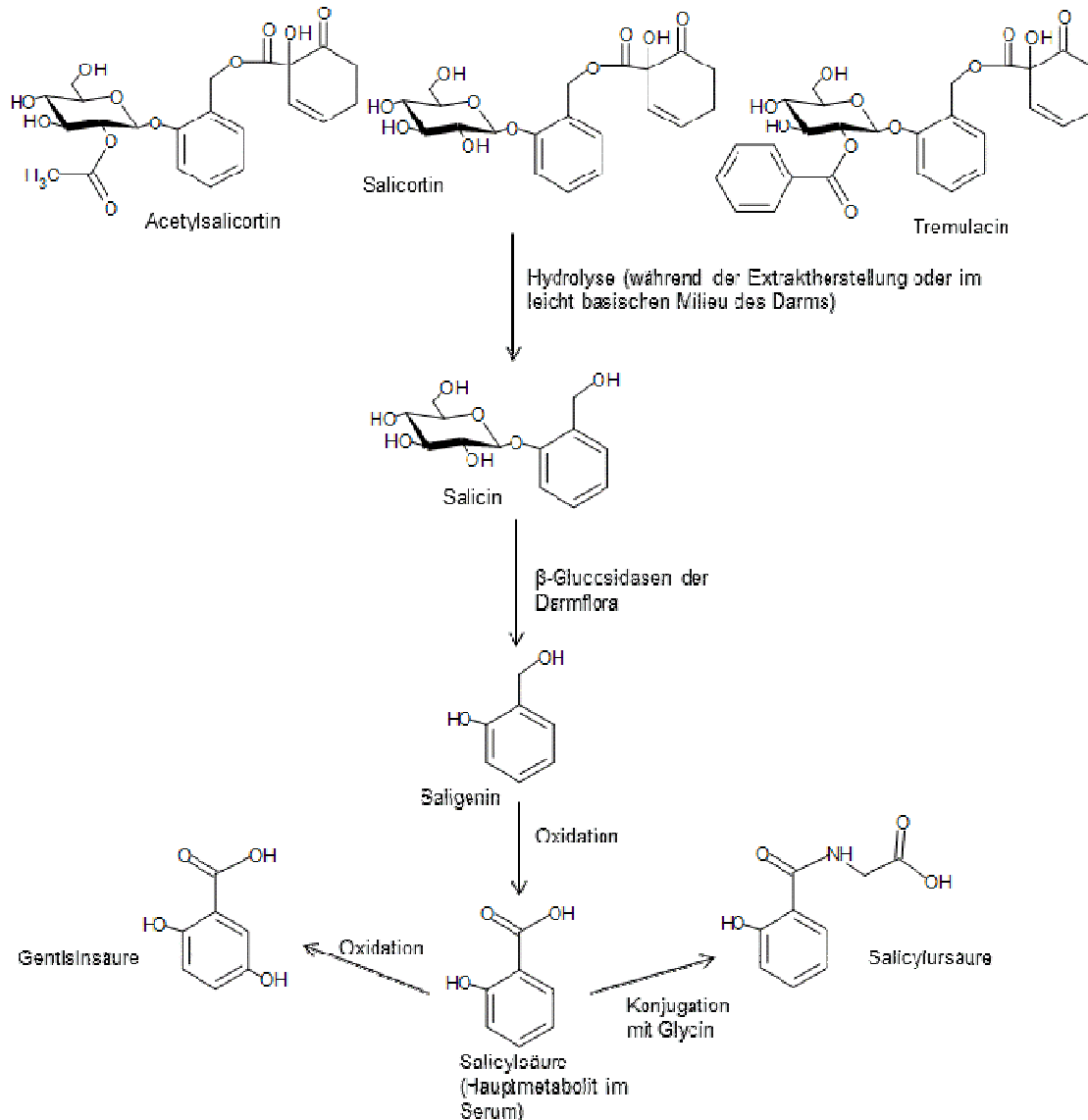
Langfristige Verträglichkeitsstudien und toxikologische Untersuchungen über einen Zeitraum von mehr als wenigen Wochen, vor allem in Bezug auf eine mögliche Kanzerogenität, fehlen bisher allerdings.

## **1.5 Pharmakokinetische Studien der Weidenrinde und ihrer Inhaltsstoffe**

Pentz et al. untersuchten 1989 die Bioverfügbarkeit von Salicylsäure aus einem Weidenrinden-Colasamen-Kombinationspräparat in einer Probandenstudie [52]. Die Maximalkonzentration von Salicylsäure im Plasma stellte sich nach zwei bis drei Stunden ein, eine Halbwertszeit von 2,5 Stunden wurde bestimmt. Die Bioverfügbarkeit der Salicylsäure aus dem Weidenrindenextrakt entsprach nur etwa 5% der Bioverfügbarkeit von Salicylsäure aus Acetylsalicylsäure [52].

Eine wesentlich umfassendere pharmakokinetische Probandenstudie zum Salicin und seinen Derivaten nach Einnahme eines standardisierten Weidenrindenextraktes entsprechend 240 mg Gesamtsalicin führten Schmid et al. [53] durch. Salicylsäure wurde als Hauptmetabolit im Serum identifiziert (86% der Gesamtsalicylatmetabolite). Salicylursäure und Gentisinsäure kamen nur in sehr kleinen Mengen vor. Die Halbwertszeit wurde für Salicylsäure mit 2,45 Stunden bestimmt. Im Urin wurde Salicylursäure als Hauptmetabolit (71%) neben Salicylsäure (15%) und Gentisinsäure (14%) identifiziert (Übersicht s. Abb. 1.5). Freies Salicin oder Saligenin kamen weder im Serum noch im Urin vor. Aus der im Serum gefundenen Menge an Salicylaten wurde bestimmt, dass diese jener Menge entsprach, welche nach Einnahme von 87 mg Acetylsalicylsäure (ASS) im Serum zu erwarten wäre. 50-100 mg eingenommene

ASS haben allerdings keine analgetische Wirkung, der eingesetzte Weidenrindenextrakt in der Dosierung jedoch schon. Dies ist der Grund für neuere Bemühungen, andere Wirkprinzipien der Droge aufzufinden, da die Menge der aus Salicylalkoholderivaten entstehenden Salicylsäure das Ausmaß der Wirksamkeit der Weidenrinde (s. 1.3.2) nicht erklären kann.



**Abb. 1.5:** Metabolismus des Salicins und seinen Esterverbindungen nach Schmidt et al. [53].

Eine der ersten pharmakokinetischen Studien mit reinem Salicin führten Steinegger und Hövel 1971 durch [54]. Im Selbstversuch stellten die Autoren nach Einnahme von Salicin qualitativ die Metabolite Salicylsäure, Salicylursäure, Gentisinsäure und Saligenin in sauer ausgeschütteltem Harn fest. Im Blut wurde Salicylsäure als einziger Metabolit detektiert. Sie untersuchten den Metabolismus und stellten fest, dass Salicin weder durch Speichel noch durch künstlichen Magensaft oder durch Leber- und Blutenzyme in Saligenin (Salicinaglykon) und Glucose gespalten wird. Nach oraler Salicingabe wurden ähnliche Metabolite wie nach Salicingabe festgestellt. Die Autoren schlussfolgerten, dass Salicin im Darm gespalten und das freigesetzte Saligenin nachfolgend weiter metabolisiert wird.

Im Tier wurde die Metabolisierung und Pharmakokinetik von Salicin, Saligenin und Natriumsalicylat 2002 genauer untersucht. Bei der peroralen Applikation in Wistar-Ratten der drei Substanzen war jeweils Salicylsäure als alleiniger Metabolit im Plasma der Tiere gefunden worden, wobei bei Saligenin- und Natriumsalicylat-Gabe Salicylsäure deutlich schneller im Blut anflutete. Freies Salicin oder Saligenin wurde auch hier nicht im Plasma entdeckt. In Ratten ohne Darmflora wurde unhydrolysiertes Salicin wieder im Caecum ausgeschieden. Dies bestätigte die vorher getroffenen Vermutungen, dass die  $\beta$ -Glucosidasen der Darmbakterien maßgeblich an der hydrolytischen Spaltung des Salicins in Saligenin und Glucose beteiligt sind. Abb. 1.5 gibt den Metabolismus von Salicin und seinen Esterverbindungen wieder.

### 1.6 Studien zum Wirkmechanismus der Weidenrinde *in vitro*

Im Gegensatz zur irreversiblen Hemmung der Cyclooxygenasen (COX) durch Acetylsalicylsäure (ASS) ist Salicylsäure als mutmaßlich aktiver Metabolit des Salicins und seiner Derivate nur ein schwacher, kompetitiv-reversibler Inhibitor der COX. Salicylsäure hat daher eine nur sehr geringe Auswirkung auf die Thrombozytenaggregation. Trotz seiner schwachen Hemmung der COX ist Salicylsäure antientzündlich und analgetisch wirksam. Deswegen wurden andere Wirkmechanismen der Salicylsäure *in vitro* untersucht. Es wurden hierbei die Hemmung von Mitogen aktivierten Proteinkinasen (MAPK), von Kernfaktoren wie AP-1 (Aktivatorprotein 1) und NF- $\kappa$ B (über die Hemmung der Degradation von I $\kappa$ B) sowie die Förderung der Adenosin-Freisetzung beobachtet [55]. Des Weiteren wurde in Endothelzellen die Reduktion der IL-4 vermittelten P-Selektin-Sekretion durch Induktion der Haemoxygenase-1 durch Natriumsalicylat beobachtet [56]. Es gibt für Salicylsäure folglich verschiedene Ansätze zur Erklärung ihrer Wirksamkeit, wobei hierüber noch kein Konsens besteht.

Wie in 1.5 beschrieben ist die im Blut detektierte Salicylsäuremenge nach Einnahme wirksamer Dosen eines Weidenrindenextraktes zu gering, um Salicylsäure als einzig wirksames Prinzip der Weidenrinde festzulegen. Daher wurden in den letzten Jahren verschiedene *in vitro* Untersuchungen durchgeführt, um den Einfluss der anderen Inhaltsstoffgruppen zu untersuchen:

Die Effekte eines Weidenrindenextraktes (Ethanol 70% als Auszugsmittel) auf die LPS- (Lipopolysaccharid) induzierte Freisetzung proinflammatorischer Zytokine (siehe genauer in Kapitel 6 unter 6.1.3) wie TNF- $\alpha$ , IL-6 und IL-1 $\beta$  sowie von PGE<sub>2</sub> (pyrogenes, schmerzförderndes und proinflammatorisches Prostaglandin E<sub>2</sub>) wurden in primären, humanen Monozyten getestet [57]. Der Extrakt reduzierte dosisabhängig die LPS-induzierte Freisetzung von TNF- $\alpha$ , IL-6 und IL-1 $\beta$ . Ebenso wurde die COX-2-vermittelte Freisetzung von PGE<sub>2</sub> durch den Extrakt gehemmt, jedoch ohne die Aktivität von COX-1 oder COX-2 zu beeinflussen.

Salicin und Salicylate beeinflussten alle getesteten Parameter nicht. Die Aktivität des Weidenrindenextraktes auf die Reduktion entzündungsfördernde Parameter in dieser Studie war demnach nicht auf Salicin und seinen aktiven Metaboliten Salicylsäure, sondern auf andere Inhaltsstoffgruppen zurückzuführen. Zu ähnlichen Ergebnissen kamen Bonaterra et al. [58]. Hier wurde gezeigt, dass ein wässrig ausgezogener Weidenrindenextrakt und seine wasserlösliche Fraktion (Proanthocyanidin-angereicherte Fraktion) gegenüber anderen Fraktionen stärker hemmend auf die NO-Freisetzung, die intrazelluläre Proteinexpression von TNF- $\alpha$  sowie auf die mRNA-Expression von TNF- $\alpha$  und COX-2 in LPS-aktivierten Monozyten wirkten. Des Weiteren wurde festgestellt, dass der Extrakt in LPS-aktivierten Makrophagen die Translokation der p65 Untereinheit von NF- $\kappa$ B in den Nukleus blockiert (genauere Ausführungen zu NF- $\kappa$ B s. Kapitel 3 unter 3.1.1). Der Einfluss von Polyphenolen auf das RNA-Expressionsprofil in menschlichen Chondrozyten bestimmter Entzündungsmediatoren wie Zytokine oder Matrix-Metalloproteinasen wurde in einer weiteren Studie gezeigt. Hier war das RNA-Expressionsprofil nach Weidenrindenextrakt-Zugabe ähnlich wie nach Quercetin-Zugabe [59]. Das Zellwachstum von Tumorzelllinien wurde durch einen ethanolischen (70%) Weidenrindenextrakt sowie durch seine Fraktionen gehemmt. Hierbei wurde das Wachstum von einer Proanthocyanidin- und einer Flavonoid-angereicherten Fraktion stärker gehemmt als durch eine Salicylalkohol-angereicherte Fraktion. Außerdem wurde die Beeinflussung der Apoptose durch den Extrakt und seine Fraktionen beobachtet [60].

Ferner wurden hemmende Effekte eines wässrigen Weidenrindenextraktes und seiner Fraktionen auf COX-1, COX-2 und 5-LOX in menschlichen Granulozyten beschrieben. Die am stärksten beobachtete Hemmung war bei den Polyphenolfractionen zu beobachten, allerdings waren diese nicht nach der Ausbeute dosiert. Die Salicinderivate-angereicherte Fraktion zeigte keinen Effekt, wobei diese auch nicht zu Salicylsäure metabolisch aktiviert werden konnte (in [37]). Diese Problematik gilt sicherlich bei allen *in vitro* Versuchen, wenn nicht gegen Salicylsäure als Kontrolle getestet wird.

In einer sehr aktuellen Studie wurde in humanen HUVEC-Zellen gezeigt, dass ein Weidenrindenextrakt und seine salicinarme Fraktion antioxidative Enzyme aktiviert und außerdem durch die Aktivierung von Nrf2 (s. genauere Ausführung in Kapitel 6 unter 6.2.3) vor oxidativem Stress schützt [61].

Wagner stellte außerdem die Schwierigkeit der Übertragbarkeit von *in vitro* auf *in vivo* Modelle dar. *In vitro* hemmte ein Weidenrindenextrakt dosisabhängig im Vollblutassay COX-1 und COX-2 sowie deutlich schwächer die Freisetzung von IL-1 $\beta$  und TNF- $\alpha$ . Dies ließ sich *in vivo* nach Einnahme des Weidenrindenextraktes im Probandenblut nicht mehr feststellen. Die Bioverfügbarkeit der im Weidenrindenextrakt wirksamen Inhaltsstoffe war nach oraler Aufnahme offensichtlich nicht groß genug [48].

Freischmidt et al. [26] isolierten zahlreiche Polyphenole aus einem wässrigen Weidenrindenextrakt und testeten diese auf ihre entzündungshemmenden Eigenschaften im ICAM-1 Assay (genauere Ausführungen zum Assay s. Kapitel 3 unter 3.1.2). Eine deutliche Reduktion der TNF- $\alpha$  induzierten ICAM-1 Expression wurde nur bei Catechol und Eriodictyol unter den isolierten Substanzen beobachtet. Da Catechol mit über 2% einen recht großen Anteil in dem bearbeiteten Extrakt einnahm und Eriodictyol nur in sehr geringen Anteilen vorkam, wurde hier die Beteiligung des Catechols neben dem Salicin und den Flavonoiden an der antiinflammatorischen Wirkung der Weidenrinde diskutiert.

Yang et al. isolierten zahlreiche Verbindungen aus *Salix pseudo-lasiogyne* und stellten nur bei jenen Strukturen eine antiinflammatorische Wirkung (Hemmung der LPS-induzierten NO-Produktion in BV2-Microgliazellen) fest, welche eine 1-Hydroxy-6-oxo-2-cyclohexencarbonsäureester-Partialstruktur enthielten [62]. Diese Partialstruktur kann zu Catechol abgebaut werden (s. 1.4.1). Auch diese Ergebnisse verdeutlichen den Einfluss von Catechol auf die entzündungshemmende Wirkung der Weidenrinde.

Zusammenfassend lässt sich festhalten, dass Weidenrindenextrakte, ihre verschiedenen Fraktionen und isolierten Inhaltsstoffe in verschiedenen *in vitro* Testsystemen auf ihre entzündungshemmenden, antipyretischen und analgetischen Wirkmechanismen untersucht worden sind. Eine Hemmung der COX, von NF- $\kappa$ B, der NO-Freisetzung, der ICAM-1-Expression, der Zytokin- und der PGE<sub>2</sub>-Freisetzung sowie eine Aktivierung von Nrf2 sind dabei diskutiert worden. Die Polyphenole im Extrakt, insbesondere die Proanthocyanidine, die Flavonoide und das Catechol scheinen dabei an der Wirkung beteiligt zu sein.

## 1.7 Pharmakotherapie bei Arthrose, Kreuzschmerz und rheumatoider Arthritis

Kreuzschmerzen und Arthrose sind eine der häufigsten Gründe für Arztbesuche in Deutschland und führen zu hohen Kosten durch Diagnostik und Therapie sowie durch Arbeitsunfähigkeit und Frühberentung [63, 64]. Das Risiko an einer Kniegelenksarthrose zu erkranken liegt bei 44,7% und höher bei Risikofaktoren wie beispielsweise Übergewicht [65]. Als medikamentöse Schmerztherapie steht die Therapie mit klassischen NSAR, Paracetamol oder COX-2-Hemmern zur Verfügung. Paracetamol (bis zu 4 g/Tag) wirkt analgetisch, nicht antiphlogistisch und ist aufgrund seiner besseren gastrointestinalen Verträglichkeit bei Arthroseschmerz Mittel der ersten Wahl, bei Kreuzschmerz hingegen nicht. Am häufigsten werden die NSAR wie Diclofenac (bis zu 100 mg/Tag), Naproxen (bis zu 750 mg/Tag) oder Ibuprofen (bis zu 1,2 g/Tag) bei Kreuz- und Arthroseschmerz eingesetzt. Neben den analgetischen zeigen sie auch gute antiinflammatorische Eigenschaften. Problematisch sind ihre Nebenwirkungen auf das gastrointestinale System und die Nieren. Auch das kardiovaskuläre Risiko



wird erhöht. Aus diesen Gründen der schlechten Verträglichkeit sollten NSAR immer nur so niedrig dosiert und so kurz wie möglich verwendet werden. COX-2-Hemmstoffe (z.B. Etoricoxib) stellen eine gastrointestinal bessere verträgliche Alternative zu den klassischen NSAR dar, welche allerdings schwere kardiovaskuläre unerwünschte Wirkungen mit sich bringen. Deswegen ist diese Stoffgruppe nur bei Patienten ohne kardiovaskuläres Risiko indiziert [63, 64].

Die Arthrose ist eine nicht entzündliche, degenerative Gelenkserkrankung mit teilweise entzündlichen Episoden. Sie ist durch Knorpelabbau gekennzeichnet und betrifft überwiegend ältere Patienten.

Die rheumatoide Arthritis (RA) ist im Gegensatz zur Arthrose eine chronisch entzündliche Autoimmunerkrankung [66]. Sie kommt weit weniger häufig, dennoch bei 0,5% - 1% der erwachsenen Bevölkerung vor [65]. Die RA ist gekennzeichnet durch multiplen Gelenkschmerz, Gelenkschwellung (persistierend über 6 Wochen) und Gelenksteifigkeit, vor allen in den Fingern, den Zehen und der Hand. Grippe-ähnliche Begleitsymptome sind häufig. Die Beschwerden treten im Gegensatz zur Arthrose (belastungs- und bewegungsabhängig) auch in Ruhe auf. Nach RA-Diagnose wird umgehend mit der Therapie mit DMARD („disease modifying antirheumatic drugs“) begonnen. Methotrexat (MTX) in höherer Dosierung gilt als Mittel der ersten Wahl (ideal 20 mg/Woche). Wenn MTX nicht geeignet sein sollte, können Leflunomid oder Sulfasalazin eingesetzt werden. Glucocorticoide können ebenso möglichst niedrig dosiert als Ergänzung zu den klassischen DMARD eingesetzt werden. Wenn DMARD nicht ansprechen, wird eine Biologica-Therapie empfohlen, z.B. eine Anti-TNF-Therapie (s. Kapitel 6 unter 6.1.3.1.2) [67].

Die Therapie mit den immunsuppressiv wirkenden DMARD ist unausweichlich für eine Remission der RA, allerdings ergeben Immunsuppressiva häufig schwerwiegende Nebenwirkungen. Die Schmerztherapie mit NSAR bei unterschiedlichen chronischen Erkrankungen stellt eine gute symptomatische Behandlung dar, ist allerdings wie oben erwähnt aufgrund der schlechten Verträglichkeit nicht für die dauerhafte Therapie geeignet. In der Schmerztherapie der Volkserkrankungen wie Kreuzschmerz und Arthrose sind folglich besser verträgliche Arzneimittel gesucht. Aus diesem Grund ist Weidenrinde wieder als schmerzlinderndes und entzündungshemmendes, aber gut verträgliches pflanzliches Arzneimittel von Interesse. Sie wird und wurde daher aktuell auf ihre Wirksamkeit und ihre Wirkmechanismen untersucht (s. 1.3-1.6).

## 1.8 Zielsetzung der vorliegenden Arbeit

Wässrige und ethanolische Weidenrindenextrakte mit einer täglichen Einnahme einer Gesamtsalicinmenge von 240 mg zeigten klinische Wirksamkeit bei Patienten mit Kreuzschmerzen und rheumatischen Erkrankungen (s. 1.5.2). Auch in verschiedenen Tiermodellen wurde die entzündungshemmende Wirkung von Weidenrindenextrakten gezeigt (s. 1.5.1). Dass für die Wirkung nicht die aus dem Salicin und seinen Derivaten entstehende Salicylsäure allein verantwortlich gemacht werden kann, demonstrierten pharmakokinetische Studien (s. 1.7). Auf der Suche nach neuen Wirkprinzipien der Weidenrinde sollten in dieser Arbeit die Wirkungen der Salicylalkoholderivate der Weide in Abgrenzung zur Salicylsäure genauer untersucht werden. Ein 70% ethanolischer Weidenrindenextrakt diene als Ausgangsmaterial für eine bioaktivitätsgeleitete Fraktionierung, welche das Ziel hatte, pharmakologisch aktive Salicylalkoholderivate zu isolieren. Bei erfolgreicher Isolierung sollten diese Strukturen auf ihre entzündungshemmende Aktivität zunächst *in vitro*, bei Aktivität nachfolgend auch im Tiermodell *in vivo* getestet werden. Des Weiteren sollte untersucht werden, ob ihre eventuelle Wirkung lediglich auf Salicylsäure oder aber auf weitere Abbau-, bzw. Metabolisierungsprodukte zurückzuführen ist. Die Untersuchung der Stabilität der Isolate in den *in vitro* Assays sowie ihrer Metabolite in den *in vivo* Studien sollte Gegenstand der vorliegenden Arbeit sein.

Ferner sollte ein Fokus auf den Metabolismus der isolierten Salicylalkoholderivate im Menschen gelegt werden. Bisher wurde lediglich der Metabolisierungsweg der Salicylalkoholderivate bezüglich Salicylsäure untersucht. Gute Untersuchungen liegen für Salicin vor (s. 1.7). Allerdings ist Salicin nicht das quantitativ dominierende Salicylalkoholderivat in der Weidenrinde. Salicortin beispielsweise kommt in den meisten Arten in höherer Konzentration vor (s. 1.4.1). Andere Metabolite der Salicylalkoholderivate neben Salicylsäure nach Einnahme eines Weidenrindenextraktes sollten in einer pharmakokinetischen Studie an gesunden Probanden untersucht werden, um eventuell zusätzliche Wirkprinzipien neben der Salicylsäure aufzudecken.

Häufig zeigen *in vitro* positiv getestete Substanzen *in vivo* keine relevante Bioverfügbarkeit im Blut. Die Substanzen werden durch Metabolisierungen entweder durch Reduktion oder durch Oxidation und/oder durch Konjugation modifiziert. Solche möglichen Phase I-, bzw. Phase II-Metabolite sollten in den Metabolisierungsstudien zunächst ausfindig gemacht und später gegebenenfalls synthetisiert werden mit dem Ziel, diese als bioverfügbarkeitsrelevanter Substanzen *in vitro* auf ihre Wirkungen zu testen.

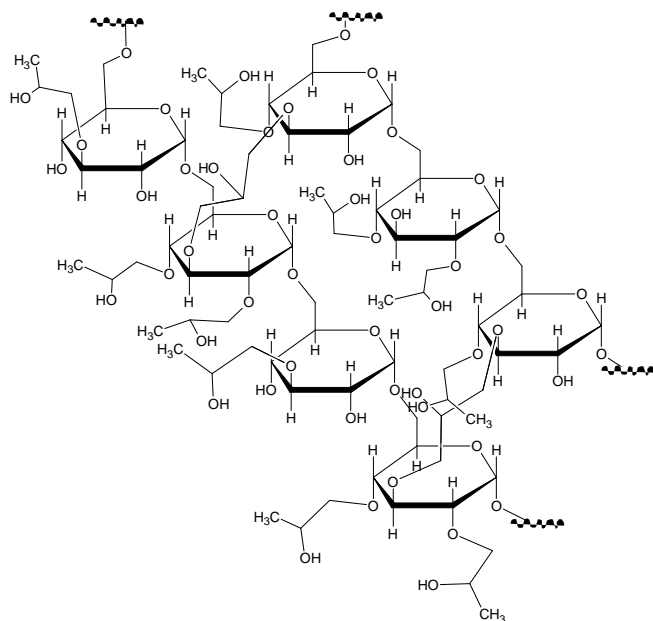
## **2. Bioaktivitätsgeleitete Fraktionierung eines Weidenrindenextraktes**

### **2.1 Hintergrund**

#### 2.1.1 Hintergrund der bioaktivitätsgeleiteten Fraktionierung

Mit einer bioaktivitätsgeleiteten Fraktionierung ist eine Vorhergehensweise gemeint, bei der ein Extrakt sukzessive in Fraktionen und Unterfraktionen aufgetrennt wird, wobei diese parallel dazu Testsysteme durchlaufen, um ihre pharmakologische Aktivität zu testen. Nur die aktivsten Fraktionen werden weiter in ihre Unterfraktionen aufgetrennt mit dem Ziel, idealerweise am Ende eine biologisch aktive Substanz oder Substanzklasse aus den immer kleiner werdenden Unterfraktionen zu isolieren [68]. Natürlich sollte ein Testsystem gewählt werden, welches zu der untersuchten Fragestellung passt. In der vorliegenden Arbeit sollten anti-phlogistische Eigenschaften von Salicylalkoholderivaten aus einem Weidenrindenextrakt untersucht werden. Daher wurde mit dem ICAM-1 Assay ein zellbasiertes *in vitro* Testsystem gewählt, mit welchem die Fähigkeit von Fraktionen und Substanzen ermittelt werden kann, die proinflammatorische Aktivität von TNF- $\alpha$  auf Endothelzellen zu reduzieren (s. Erläuterungen dazu in Kapitel 3 unter 3.1.1 und 3.1.2).

Der bearbeitete Weidenrindenextrakt wurde zunächst durch Chromatographie an einer offenen Säule mit Sephadex<sup>®</sup> LH-20 als stationäre Phase aufgetrennt. Für das Säulenmaterial Sephadex<sup>®</sup> LH-20 sind verschiedene Eigenschaften beschrieben worden. Bei diesem Material handelt es sich um ein quervernetztes Dextran. Dextrane sind Polysaccharide bestehend aus D-Glucose-Einheiten, welche  $\alpha$ -glycosidisch, meist über 1,6-Verknüpfung, miteinander verbunden sind. Mittels Epichlorhydrin werden diese Polysaccharidketten miteinander über entstehende Isopropanolbrücken quervernetzt. Einige Hydroxylgruppen der D-Glucoseeinheiten tragen durch das Versetzen mit Epichlorhydrin Isopropanolreste (s. Abb. 2.1.1).



**Abb. 2.1.1:** Ausschnitt aus der Strukturformel von Sephadex® LH-20.

Sephadex® LH-20 Material quillt sowohl in polaren als auch in apolaren Lösungsmitteln durch lipophile (Isopropanolreste) und hydrophile (freie Hydroxylgruppen) Eigenschaften. Durch Quellung im Lösungsmittel bildet sich ein dreidimensionales Gelgerüst, welches Poren freilässt [69]. In diese Poren können vor allem kleine Moleküle eindringen und werden so von dem Säulenmaterial länger zurückgehalten, wodurch sie erst später eluieren. Dies ist das Prinzip der Größenausschlusschromatographie [70]. Es spielen allerdings nicht nur die Größenausschlusseigenschaften eine Rolle, sondern auch Adsorptionseffekte. Sowohl Wasserstoffbrückenbindungen, als auch Wechselwirkungen mit  $\pi$ -Elektronensystemen sind für Sephadex® LH-20 Material beschrieben worden [71]. Diese Wechselwirkungen sorgen dafür, dass Moleküle, welche Wasserstoffbrückenbindungen bilden können und/oder ein großes  $\pi$ -Elektronensystem aufweisen, relativ spät eluieren. Es ist vom Lösungsmittel und der Molekülgröße abhängig, ob eher die Adsorptionseffekte oder die Größenausschlusseffekte überwiegen. So konnte gezeigt werden, dass kondensierte aromatische Ringsysteme umso später eluieren je mehr Ringe sie enthalten. Dieses Phänomen wurde aber nur in Isopropanol, nicht in Chloroform beobachtet [72]. In der vorliegenden Arbeit wurde der bearbeitete Weidenrindenextrakt an Sephadex® LH-20 hauptsächlich aufgrund der Adsorptionseffekte der Inhaltsstoffe an das Säulenmaterial in drei Fraktionen aufgetrennt, da protische Lösungsmittelgemische (Ethanol-Wasser und Aceton-Wasser) verwendet wurden. Es wurde wie schon von Hostanska et al. [60] gezeigt erwartet, dass die Salicylalkoholderivate aufgrund kleinerer Ringsysteme und weniger Hydroxylgruppen als die Flavonoidglucoside vor diesen eluieren. Des Weiteren sollten die Catechingerbstoffe nach den Flavonoiden eluieren, da sie große, sehr polare Moleküle mit aromatischen Ringsystemen darstellen. Durch Frakti-

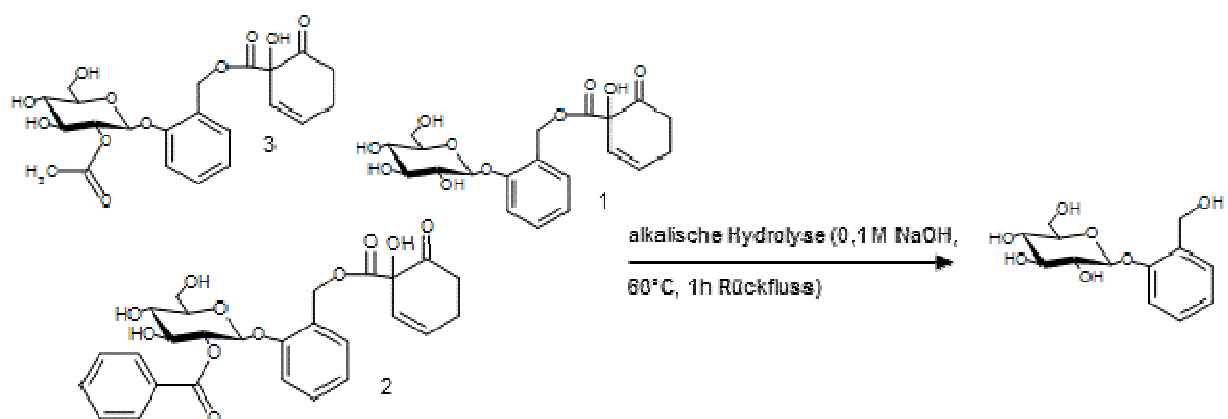
onierung an Sephadex® LH-20 Material sollte eine Salicylalkohol, eine Flavonoid sowie eine Gerbstoff angereicherte Fraktion aus dem Weidenrindenextrakt gewonnen werden.

Im Folgenden wurde so verfahren, dass die im ICAM-1 Assay aktivste Fraktion aufgetrennt wurde und die hieraus resultierenden, wiederum aktivsten Fraktionen ebenso. Als System wurde auch ein präparatives Säulenchromatographieverfahren, die Flash-Chromatographie gewählt. Die Flash-Chromatographie zeichnet sich durch relativ niedrige Drücke (0-2 bar) bei relativ hohen Fließgeschwindigkeiten aus (10-50 ml/min), wodurch eine schnelle Fraktionierung ermöglicht wird [73]. Es wurde zunächst an RP18-Material aufgetrennt, wobei hydrophobe Wechselwirkungen im Vordergrund standen. Daraufhin wurde auf hydrophiles Säulenmaterial (Kieselgel, Normalphase) mit gegenteiligen Eigenschaften gewechselt, um die Trennung zu optimieren.

## 2.1.2 Hintergrund der phytochemischen Charakterisierungen

### 2.1.2.1 Gesamtsalicinbestimmung

Das Prinzip der Gesamtsalicinbestimmung nach europäischem Arzneibuch (Ph. Eur. 6.1) beruht auf der quantitativen alkalischen Hydrolyse aller Salicinester zu Salicin (s. Abb. 2.1.2.1) und der nachfolgenden Gehaltsbestimmung mit analytischer HPLC des entstandenen Salicins. Durch diese Methode werden alle Salicylalkoholverbindungen als Salicin (= Gesamtsalicin) erfasst.



**Abb. 2.1.2.1:** Schematische Darstellung der alkalischen Hydrolyse zu Salicin von Salicortin (1), Tremulacin (2) und Acetylsalicortin (3) als beispielhafte und prominente Salicinester aus Salicis cortex.

### 2.1.2.2 Flavonoidgehaltsbestimmung

Das Ph. Eur. verwendet zur Gehaltsbestimmung von Flavonoiden hauptsächlich zwei, prinzipiell sehr ähnliche Methoden. Es wird hierbei entweder ein farbiger Chelatkomplex mit Aluminium im sauren Milieu oder durch Zugabe von Borsäure/Oxalsäure ein farbiger Borinsäurekomplex mit den Flavonoiden gebildet. Diese Methoden sind einfach, relativ schnell durchzuführen und bedürfen keines hohen apparativen Aufwandes, da nur eine photometrische Auswertung erfolgt. Problematisch an diesen Methoden ist jedoch, dass sie im gemessenen Wellenlängenbereich von 410 bzw. 425 nm nur Komplexe mit Flavonen und Flavonolen erfassen. Die in Weidenrinde hauptsächlich vorkommenden Flavonoide vom Flavanontyp (Naringenin, Naringenin-5-O- $\beta$ -glucoside, Naringenin-7-O- $\beta$ -glucosid) sowie das Chalkonglucosid Isosalipurposid werden durch diese Methode nicht oder in viel zu geringem Maße erfasst. Dies liegt daran, dass sich zum einen durch die fehlende Doppelbindung im C-Ring der Flavonoide das UV-Maximum des Komplexes zu niedrigeren Wellenlängen verschiebt, zum anderen, dass die 5-O- $\beta$ -Glucoside vermutlich kaum eine Komplexbildung eingehen können [32]. Daher musste eine andere Methode zur Erfassung der Flavonoide im Weidenrindenextrakt sowie in seinen Fraktionen gefunden werden. Es erschien am einfachsten, den Extrakt zunächst mittels einer geeigneten HPLC-Methode aufzutrennen. Alle Flavonoide sollten nun durch ihr UV-Spektrum erfasst und als Gesamtnaringenin-7-glucosid bei 282 nm quantifiziert werden. Diese Methode stellte sich als schnell und einfach dar. Sicherlich ist sie nicht absolut, da nicht alle Flavonoide die gleiche spezifische Absorption wie Naringenin-7-O- $\beta$ -glucosid aufweisen. Eine genauere Methode wurde bereits von Freischmidt [32] entwickelt. Hier werden zunächst die Naringenin-7-O- $\beta$ -glucoside unter sauren Bedingungen zu Naringenin gespalten, Isosalipurposid unter denselben Konditionen ebenfalls zu Naringenin überführt und die Naringenin-5-O- $\beta$ -glucoside nachfolgend durch  $\beta$ -Glucosidasen zu Naringenin hydrolysiert. Die hauptsächlich in Weidenrinde vorkommenden Flavonoide werden so zu Naringenin umgesetzt und letztendlich als Gesamtnaringenin bestimmt. Die in der hier vorliegenden Arbeit verwendete Methode zur Gehaltsbestimmung von Flavonoiden ist nicht so genau wie jene von Freischmidt, dafür aber wesentlich schneller und einfacher. Außerdem liegen die Ergebnisse beider Methoden in ähnlichen Bereichen. Sie war für die phytochemische Charakterisierung des Extraktes und der Fraktionen ausreichend genau, da sie nur einen relativen Überblick über das Flavonoidspektrum liefern sollte (Methodenvergleich in [32]).

### 2.1.2.3 Gerbstoffgehaltsbestimmung

Zur Quantifizierung der Gerbstoffe im Extrakt und seinen Fraktionen wurde die Hautpulvermethode nach Ph. Eur. verwendet, welche von Glasl [74] modifiziert wurde. Das Prinzip ist hierbei, zunächst alle Polyphenole, wozu auch die Gerbstoffe gehören, mit Folin-Ciocalteus Phenolreagenz umzusetzen. Polyphenole wirken reduzierend und geben durch Oxidation Elektronen an das Folin-Ciocalteus Reagenz (Wolframatophosphorsäure) ab, wodurch sich ein blaues Mischoxid bildet (s. Abb. 2.1.2.3) [74]. Die Blaufärbung der Lösung wird photometrisch vermessen.



**Abb. 2.1.2.3:** Reaktionsschema für die Blaufärbung des Folin-Ciocalteus Phenolreagenz durch Reduktion. Für die Reduktion benötigte Elektronen stammen aus Oxidationsvorgängen der Polyphenole.

Die gelösten Gerbstoffe in der Untersuchungslösung werden in einem weiteren Ansatz durch Zugabe von Hautpulver aufgrund der hier enthaltenen Proteine gefällt. Die überstehende Lösung wird daraufhin ebenso mit Folin-Ciocalteus Reagenz umgesetzt und wiederum photometrisch vermessen wird. Die Färbung der Lösung fällt nun schwächer aus als vorher, da die Gerbstoffe nicht mehr, sondern nur noch die nicht mit Hautpulver fällbaren Polyphenole vorhanden sind. Aus der Differenz der Färbung (der gemessenen Absorption) vor und nach der Gerbstofffällung wird die Menge an enthaltenen Gerbstoffen ermittelt.

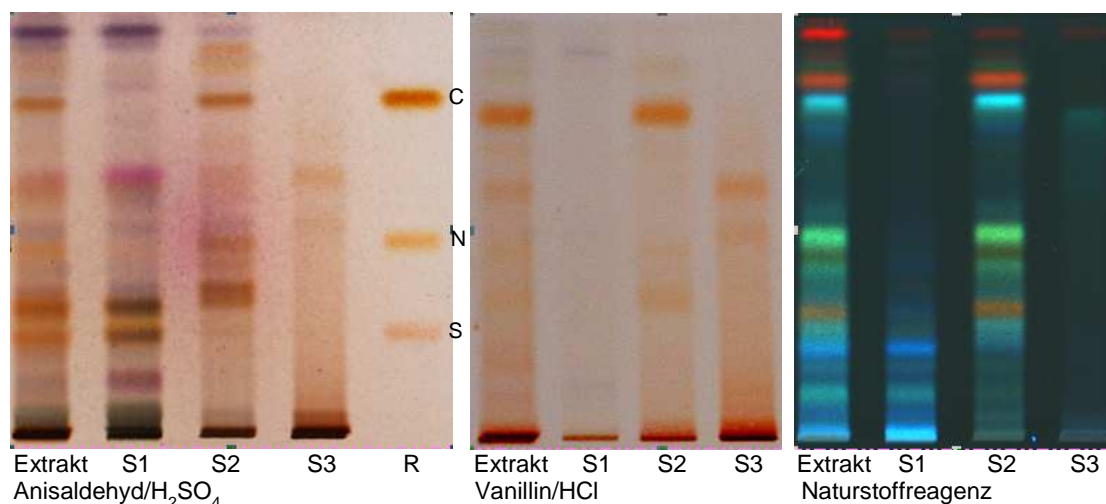
## **2.2 Ergebnisse und Diskussion**

### 2.2.1 Fraktionierung des Weidenrindenextraktes und nachfolgende phytochemische Charakterisierung

#### 2.2.1.1 Fraktionierung des Weidenrindenextraktes an Sephadex® LH-20

Die Fraktionierung des bearbeiteten 70% ethanolisch ausgezogenen Weidenrindenextraktes an Sephadex® LH-20 Material ergab die drei Fraktionen S1, S2 und S3. Schon im Dünnschichtchromatogramm (DC) der Fraktionen ließ sich erkennen, dass es sich um eine Salicylalkoholderivat (S1), eine Flavonoid (S2) und um eine Gerbstoff (S3) angereicherte Fraktion handelte (s. Abb. 2.2.1.1). S1 beinhaltete Salicin und ähnlich eluierende Verbindungen,

welche sich mit Anisaldehyd/ $\text{H}_2\text{SO}_4$  anfärben ließen. S2 enthielt die Flavonoide Naringenin-7-O- $\beta$ -glucosid, Catechin und andere Flavonoide, welche durch die Derivatisierung mit Naturstoffreagenz bei 366 nm fluoreszierten. Die in S3 angereicherten Catechingerbstoffe hatten einen niedrigeren Rf-Wert als Catechin und wurden durch Vanillin/HCl rötlich-braun angefärbt.



**Abb. 2.2.1.1:** Dünnschichtchromatogramme des Weidenrindenextraktes und seiner Sephadex®-Fraktionen. Fließmittelzusammensetzung: EtOAc/  $\text{HCOOH}/\text{H}_2\text{O}$  (90+5+5). Anisaldehyd/ $\text{H}_2\text{SO}_4$  bei Tageslicht, Vanillin/HCl bei Tageslicht und Naturstoffreagenz bei 366 nm dienten als Derivatisierungsreagenzien. R steht für das Referenzgemisch bestehend aus Catechin (C), Salicin (S) und Naringenin-7-O- $\beta$ -glucosid (N).

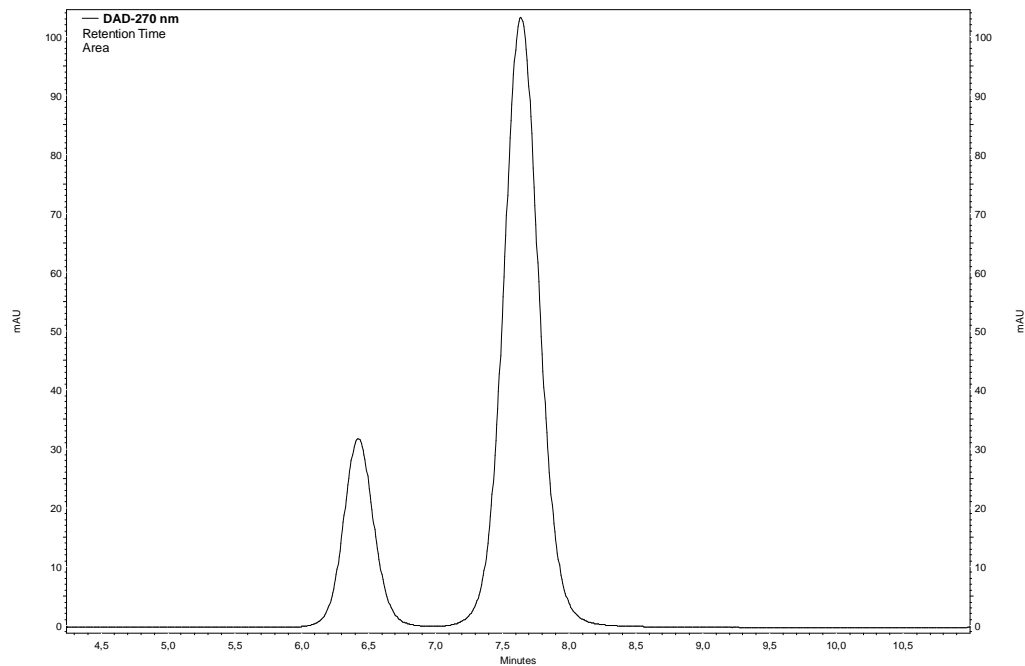
Die Gesamtausbeute der Fraktionierung betrug 93,3%, davon machten 71,9% S1, 13,6% S2 und 14,5% S3 aus. S1 war somit die Fraktion mit dem höchsten Gewichtsanteil. Da Zucker durch Sephadex® LH-20 bei den gewählten Konditionen kaum zurückgehalten wurden, waren diese Verbindungen hauptsächlich in S1 zu finden (s. Abb. 2.2.1.1, große Bande am Start in S1) und machten sicherlich den größten Anteil des Gesamtgewichts der Fraktion aus. Die Fraktion S1 war aus diesem Grund recht hygroskopisch. Auf eine gut verschlossene, luftdichte Lagerung und bei weiterer Charakterisierung auf eine erneute Homogenisierung durch Verreibung musste unbedingt geachtet werden. S2 und S3 hingegen waren nach Gefriertrocknung homogene, wenig hygroskopische Pulver.

### 2.2.1.2 Phytochemische Charakterisierung des Extraktes und der Fraktionen S1-S3

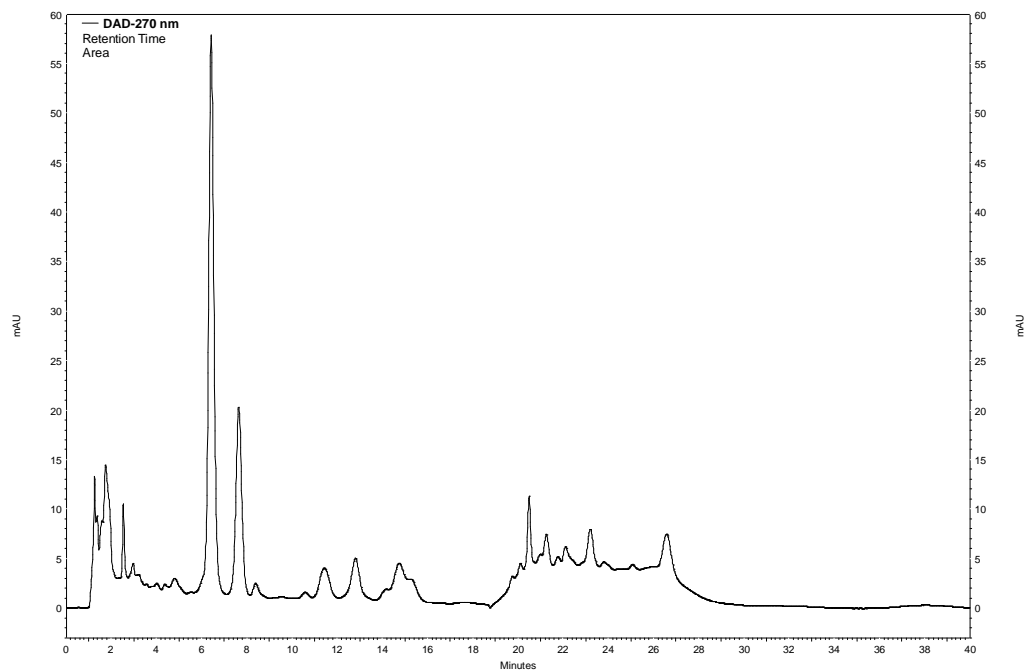
Zur genauen Charakterisierung wurden in den Fraktionen S1, S2 und S3 sowie im Gesamtextrakt Salicylalkoholderivate, Flavonoide, Gesamtpolyphenole und Gerbstoffe quantifiziert. Bei der Salicylalkohol-Gehaltsbestimmung wurde auf die Methode des Arzneibuchs (Ph. Eur. 6.1) zurückgegriffen. Die Flavonoide wurden gemeinsam als Naringenin-7-O- $\beta$ -glucosid und die Gesamtpolyphenole sowie die Gerbstoffe mit der Hautpulvermethode quan-



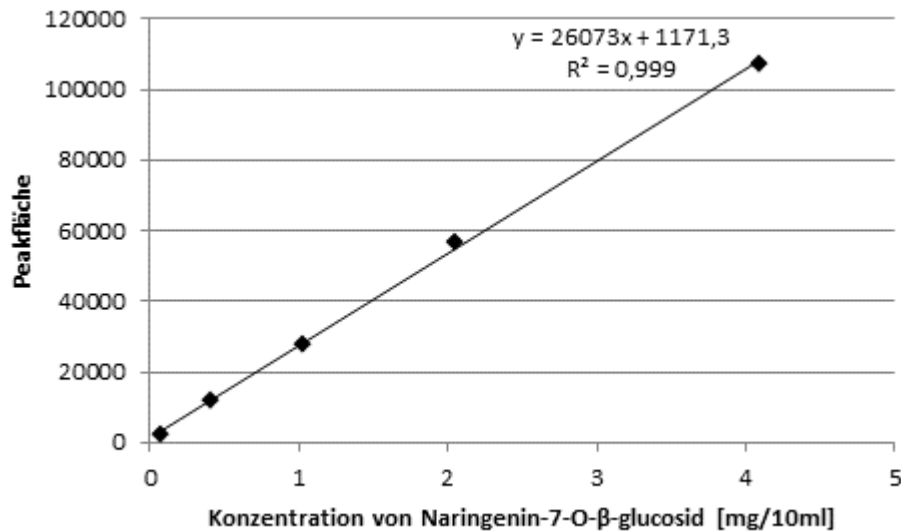
tifiziert (s. 2.3.3). Beispielhafte HPLC-Chromatogramme der Quantifizierungen (Abb. 2.2.1.2-1 – 2.2.1.2-4):



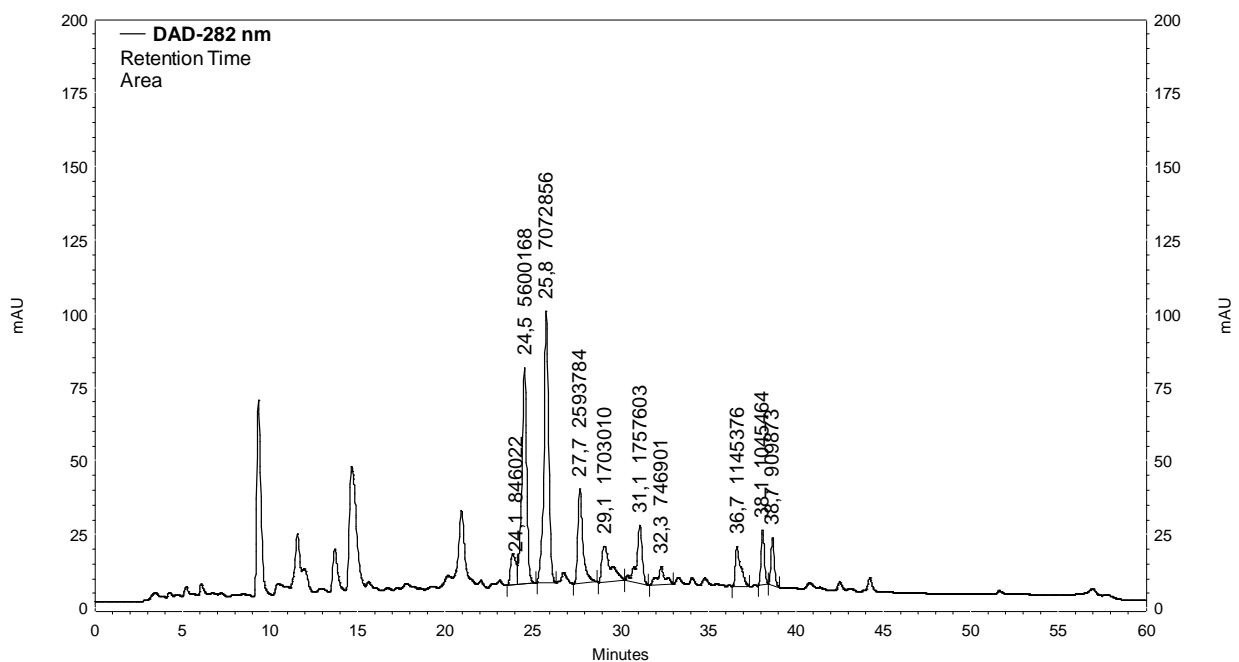
**Abb. 2.2.1.2-1:** Bestimmung der Auflösung zwischen Salicin (Rt = 6,4 Min) und Picein (Rt = 7,6 Min) und damit der Eignung der stationären Phase nach Ph. Eur. 6.1 für die Gesamtsalicingehaltsbestimmung. Die Auflösung musste mindestens bei 1,5 liegen und lag hier bei 2,5. Damit war die Trennsäule geeignet.



**Abb. 2.2.1.2-2:** Beispielchromatogramm der Gesamtsalicingehaltsbestimmung nach Ph. Eur. 6.1 des Extraktes. Die Fläche des Gesamtsalicinpeaks (6,4 Min) wurde für die Gehaltsbestimmung verwendet.



**Abb. 2.2.1.2-3:** Darstellung der Kalibriergerade von Naringenin-7-O-β-glucosid mit Geradengleichung und Korrelationskoeffizient. Die Kalibriergerade diente der Berechnung des Flavonoidgehalts von Extrakt und Fraktionen als Gesamtnaringenin-7-O-β-glucosid. Die Peakflächen wurden bei 282 nm bestimmt (n = 3).



**Abb. 2.2.1.2-4:** Beispielchromatogramm der Flavonoidgehaltsbestimmung im Extrakt. Die integrierten Peaks wurden als Flavonoide durch ihr UV-Spektrum identifiziert und als Naringenin-7-O-β-glucosid quantifiziert.

Die Ergebnisse der phytochemischen Charakterisierung (Tab. 2.2.1.2) zeigten eindeutig, dass die Fraktionierung zu einer mit Salicylalkoholderivaten, einer mit Flavonoiden und einer mit Gerbstoffen angereicherten Fraktion erfolgreich war. Zwar waren Überschneidungen der einzelnen Stoffgruppen über die Fraktionen hinaus zu beobachten, da aber nur eine Anreicherung und keine konsequente Abtrennung angestrebt wurde, waren die Ergebnisse sehr zufriedenstellend. Salicylalkoholderivate waren hauptsächlich in der S1, zu einem geringen Teil noch in der S2 und gar nicht mehr in der Fraktion S3 zu finden. Sehr gut verlief die

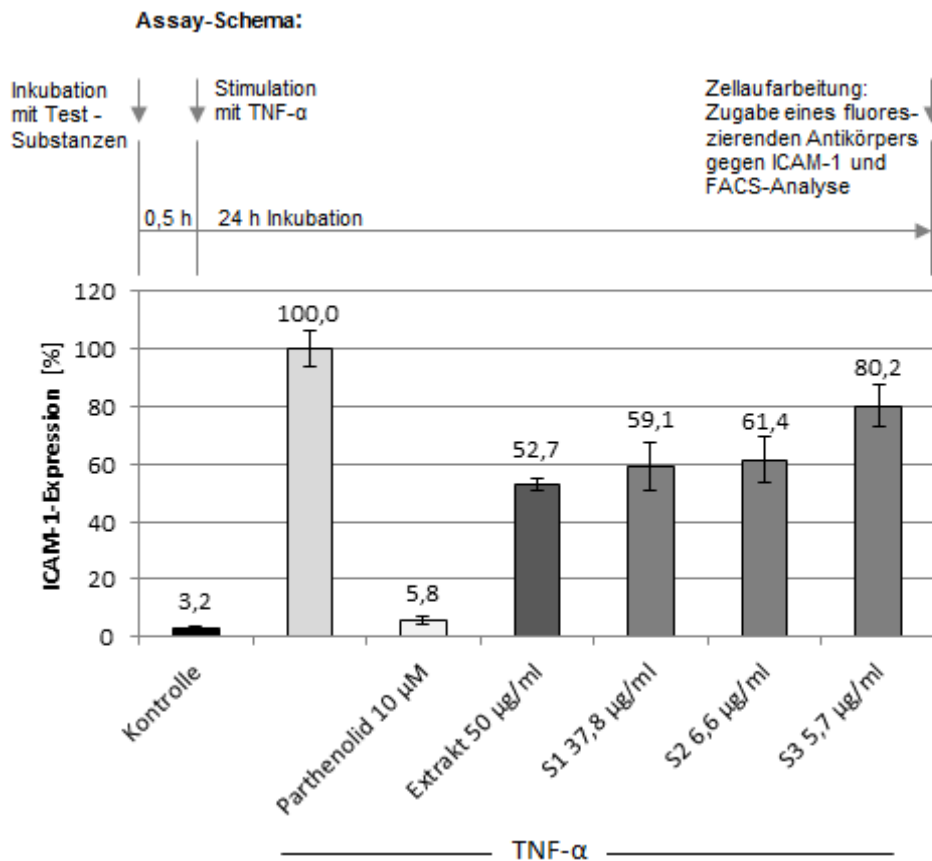
Flavonoidabtrennung, da diese nur in der Fraktion S2 gefunden wurden. Die Polyphenolbestimmung mit Folin-Ciocalteus Reagenz ist recht unspezifisch. Daher war in allen Fraktionen ein gewisser Anteil dieser Stoffgruppe zu finden. Wie erwartet traten die Polyphenole vor allem in den späteren Fraktionen auf, da es sich bei Gerbstoffen und Flavonoiden um Polyphenole handelt. Die Gerbstoffe ließen sich nicht so gut abtrennen wie die Flavonoide oder die Salicylalkoholderivate, aber auch hier lag der größte Anteil in S3.

**Tab 2.2.1.2:** Ergebnisse der phytochemischen Charakterisierung des Extraktes und seiner Sephadex®-Fraktionen. Angegeben sind die Mittelwerte und in Klammern die dazugehörige Standardabweichungen in %, n = 3.

	Extrakt	S1	S2	S3
<b>Gesamtsalicin [%]</b>	17,0 (1,4)	18,0 (0,5)	3,7 (0,4)	0
<b>Salicin ohne alkalische Hydrolyse [%]</b>	5,0 (0,1)	7,5 (0,1)	1,0 (0)	0
<b>Gesamtflavonoide berechnet als Naringenin-7-O-<math>\beta</math>-glucosid [%]</b>	2,4 (0,1)	0	16,9 (0,5)	0
<b>Gesamtpolyphenole [%]</b>	18,2 (0,3)	6,8 (0,2)	49,8 (0,7)	58,6 (3,0)
<b>An Hautpulver adsorbierte Gerbstoffe [%]</b>	10,1 (0,4)	1,7 (0,3)	24,4 (2,3)	53,3 (3,1)

### 2.2.2 In vitro Testung des Extraktes und der Fraktionen S1-S3 im ICAM-1 Assay

Im Rahmen der bioaktivitätsgeleiteten Fraktionierung wurden der Extrakt und seine Fraktionen S1-S3 auf ihre potentiell antiinflammatorischen Eigenschaften im ICAM-1 Assay (Erläuterungen zum Assay s. Kapitel 3 unter 3.1.1 und 3.1.2) getestet. Sowohl der Weidenrindenextrakt als auch seine Fraktionen waren in den getesteten Konzentrationen in der Lage, die TNF- $\alpha$  induzierte ICAM-1 Expression zu vermindern, was auf potentiell entzündungshemmende Eigenschaften hinweist (s. Abb. 2.2.2). Die prozentualen ICAM-1-Expressionen nach Extrakt- und Fraktionsaufgabe waren alle signifikant unterschiedlich zu der ICAM-1-Expression, welche bei reiner TNF- $\alpha$ -Stimulation gemessen wurde ( $p \leq 0,001$ ). Die stärkste Aktivität zeigte der Extrakt. S1 und S2 waren aktiver als S3, unterschieden sich aber nicht untereinander ( $p > 0,6$ ) und waren damit gleich aktiv.



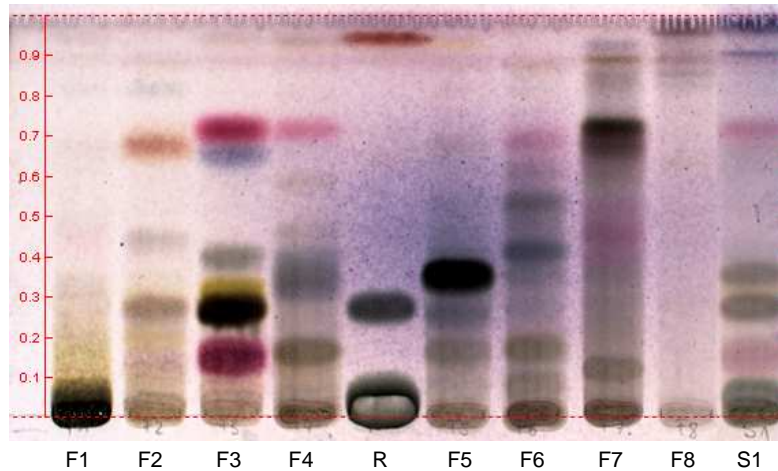
**Abb. 2.2.2:** ICAM-1-Expression nach TNF- $\alpha$  Stimulation und 24 h Inkubation mit dem untersuchten Weidenrindenextrakt in 50  $\mu\text{g/ml}$  und je nach Ausbeute in der Fraktionierung angepassten Konzentrationen der Fraktionen S1-S3; Parthenolid diente als Positivkontrolle; nur mit TNF- $\alpha$  behandelte Zellen dienten der Ermittlung von 100% ICAM-1-Expression;  $n = 3$  in Duplikaten; Mittelwert  $\pm$  StabW.

Das Prinzip einer bioaktivitätsgeleiteten Fraktionierung beruht darauf, die im getesteten Assay aktivsten Fraktionen prioritär weiter zu bearbeiten, um am Ende die Einzelsubstanzen mit der höchsten Aktivität zu isolieren. In diesem Fall kamen dafür sowohl die Fraktion S1 als auch S2 in Frage. Da die Flavonoide aus einem Weidenrindenextrakt bereits in einem Dis-sertationsprojekt am Lehrstuhl für Pharmazeutische Biologie bearbeitet wurden [32], sollten weitere Fraktionierungs- und Isolierungsschritte aus der Fraktion S1 mit den Salicylalkohol-derivaten erfolgen.

### 2.2.3 Fraktionierung der S1-Fraktion mittels Flash-Chromatographie

S1 wurde durch weitere Fraktionierung an RP18-Material mit einem methanolisch-wässrigen Fließmittelsystem an der Flash-Chromatographie in die acht Fraktionen F1-F8 aufgetrennt. Abbildung 2.2.3 zeigt die Übersichts-DC dieser Fraktionen derivatisiert mit Anisaldehyd/Schwefelsäure-Reagenz. Die erfolgreiche Anreicherung vieler Substanzen (Banden) in den einzelnen Fraktionen ist deutlich erkennbar. Salicin wurde in Fraktion F3 angereichert

und wie sich später herausstellte, Salicortin in F5 sowie Tremulacin in F7 (jeweils die am stärksten dunkel gefärbte Bande in den Fraktionen im DC, s. Abb. 2.2.3)

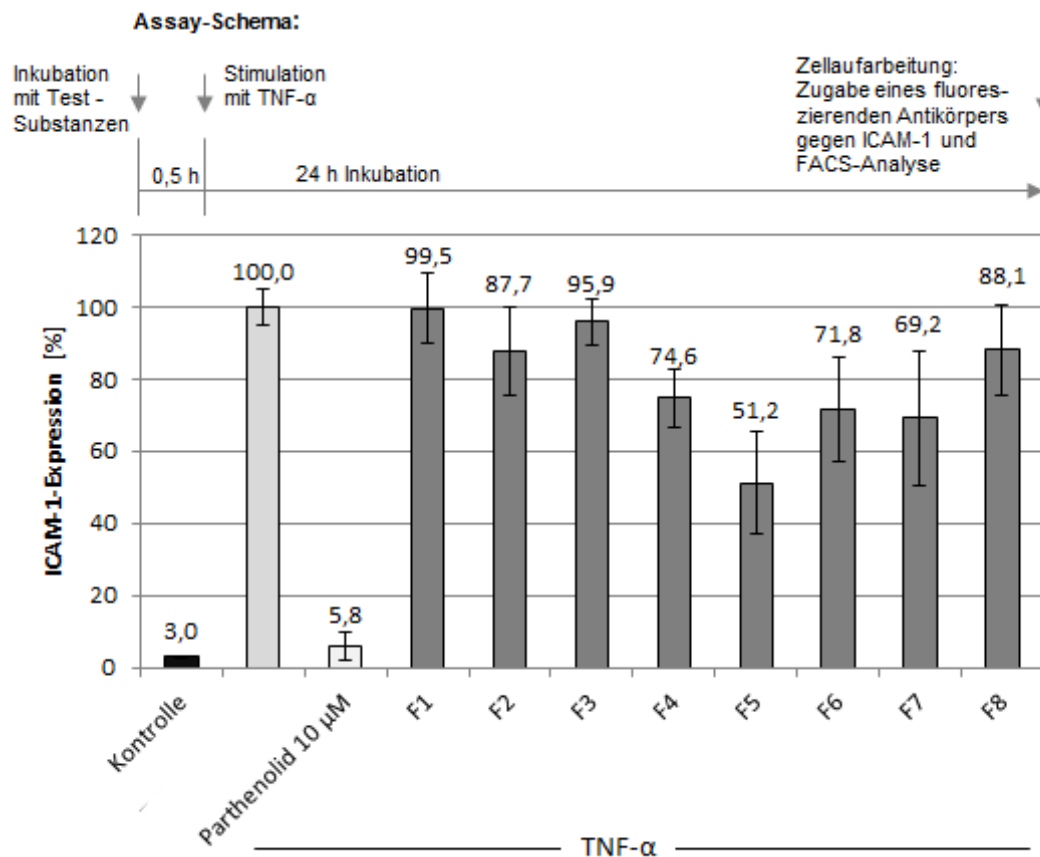


**Abb. 2.2.3:** Dünnschichtchromatogramm von S1 und ihren Flash-Fractionen F1-F8. Fließmittelzusammensetzung: EtOAc/HCOOH/H<sub>2</sub>O (90+5+5). Anisaldehyd/H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> bei Tageslicht als Derivatisierungsreagenz. R steht für das Referenzgemisch bestehend aus Catechol (obere Bande), Salicin (mittlere Bande) und D-Glucose (untere Bande).

Wie im DC erkennbar, konnten mit der Fraktion F1 die Zuckerderivate weitestgehend abgetrennt werden. Die Gesamtausbeute der Fraktionierung betrug 78,1%, davon machten 49,6% F1, 2,0% F2, 15,6% F3, 4,2% F4, 18,3% F5, 4,5% F6, 4,4% F7 und 1,4% F8 aus.

#### 2.2.4 In vitro Testung der Fraktionen F1-F8 im ICAM-1 Assay

Um die bioaktivitätsgeleitete Fraktionierung fortzuführen, wurden auch die S1-Fractionen F1-F8 auf ihre potentiell antiinflammatorische Aktivität im ICAM-1 Assay getestet. Alle Fraktionen wurden in der Konzentration von 20 µg/ml getestet. Abb. 2.2.4 zeigt, dass sich hierbei F5 als die aktivste Fraktion herausstellte und am stärksten die TNF-α induzierte ICAM-1-Expression vermindern konnte. Auch F4, F6 und F7 waren aktive Fraktionen mit einer im Vergleich minimal höheren Aktivität von F7. Die restlichen Fraktionen F1, F2, F3 und F8 waren im ICAM-1-Assay nur wenig bis gar nicht aktiv. Daraus folgte, dass zunächst F5 und später F7 als aktive Fraktionen im Rahmen der bioaktivitätsgeleiteten Fraktionierung weiter bearbeitet wurden mit dem Ziel, hieraus aktive Substanzen zu isolieren.



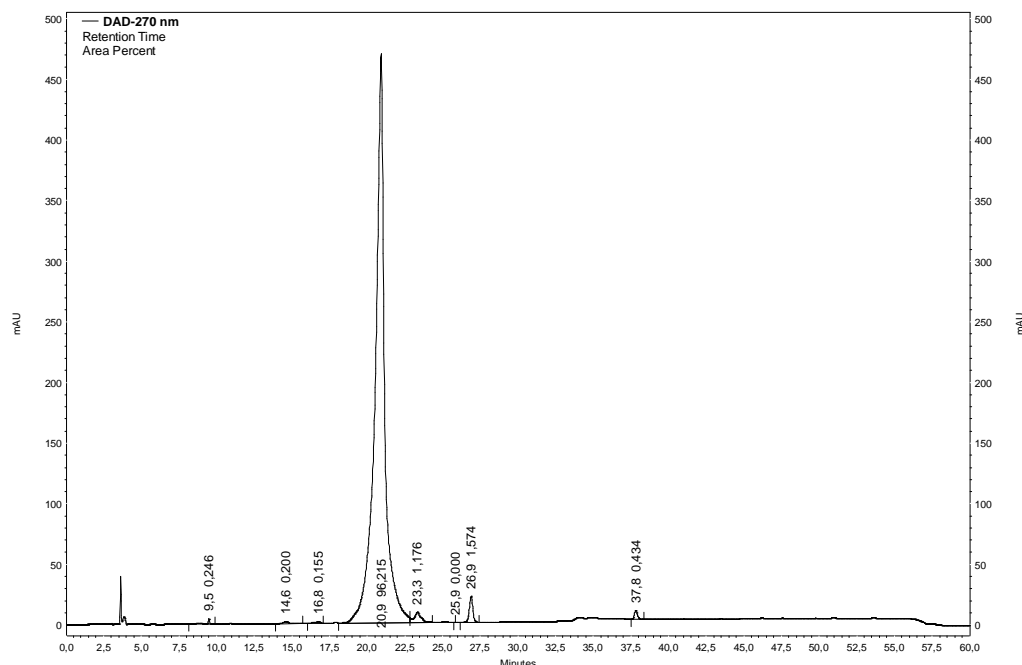
**Abb. 2.2.4:** ICAM-1-Expression nach TNF- $\alpha$  Stimulation und 24 h Inkubation mit den Fraktionen F1-F8 von S1 in je 20  $\mu\text{g/ml}$ ; Parthenolid diente als Positivkontrolle; nur mit TNF- $\alpha$  behandelte Zellen dienten der Ermittlung von 100% ICAM-1-Expression; n = 2 in Duplikaten; Mittelwert  $\pm$  StabW.

## 2.2.5 Isolierung und Strukturaufklärung von Salicortin und Tremulacin

### 2.2.5.1 Isolierung und Reinheitsbestimmung von Salicortin

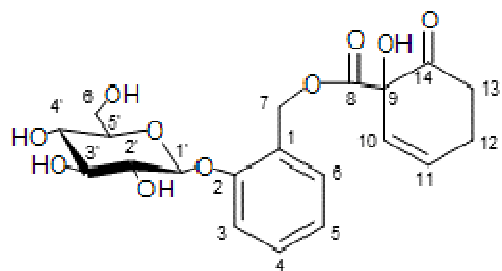
Durch Flash-Chromatographie von F5 an Normalphase mit einem Fließmittelsystem aus Ethylacetat und Methanol (Methode s. 2.3.2.1) konnte Salicortin in hoher Ausbeute und Reinheit isoliert werden. F5 wurde in vier Unterfraktionen fraktioniert mit einer Gesamtausbeute von 86,5%, hiervon entfielen auf F5.1 62,4%, F5.2 11,2%, F5.3 10,5% und F5.4 15,9%. F5.1 enthielt Salicortin in einer Reinheit von 96,2%. Damit machte Salicortin den Hauptanteil der Fraktion F5 aus und konnte in relativ großen Mengen isoliert werden. Nach Gefriertrocknung lag Salicortin als weißes, leicht hygroskopisches Pulver vor. Mit dem Derivatisierungsreagenz Anisaldehyd/Schwefelsäure und nachfolgendem Erhitzen der DC-Platte färbte sich die Substanz bei der DC-Entwicklung braun-schwarz (siehe Abb. 2.2.3, DC bei F5, intensivste Bande mit einem Rf-Wert von 0,35). Die Reinheit wurde mit Hilfe der Norma-

lisierung mittels HPLC im UV-Maximum bei 270 nm bestimmt, welches wiederum im HPLC-Chromatogramm des DAD-Detektors ermittelt wurde (siehe Abb. 2.2.5.1). Weitere Purifikationsversuche mittels semipräparativer HPLC scheiterten, da sich die Substanz unter diesen Bedingungen teilweise zu Catechol und Salicin abbaut. Die Reinheit von 96,2% war so zufriedenstellen, dass das Isolat für alle weiteren Versuche verwendet wurde.



**Abb. 2.2.5.1:** HPLC-Chromatogramm der Reinheitsbestimmung von Salicortin, isoliert aus F5. Die zur Berechnung der Reinheit integrierten Peaks sind mit ihrem prozentualen Anteil an der Gesamtpeakfläche im Chromatogramm dargestellt.

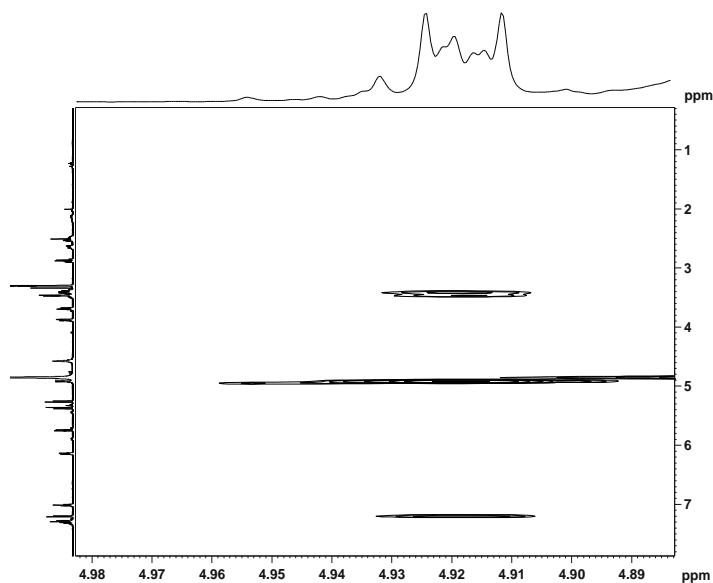
### 2.2.5.2 Strukturaufklärung von Salicortin



**Abb. 2.2.5.2-1:** Strukturformel von Salicortin.

Die genaue Struktur von Salicortin (Abb. 2.2.5.2-1) als Isolat aus F5 konnte durch zweidimensionale NMR-Experimente und Massenspektrometrie aufgeklärt werden. Typischerweise zeigt das Signal anomerer Protonen von Zuckern mit einer  $\beta$ -D-Konfiguration im  $^1\text{H}$ -Spektrum eine chemische Verschiebung zwischen  $\delta = 4$  und 5 ppm mit einer Kopplungskonstanten zwischen  $J = 7$  und 9 Hz [75] und eine Signalaufspaltung in ein Duplett. Da es sich bei Salicortin um ein Derivat des Salicins handelte, wurde davon ausgegangen, dass

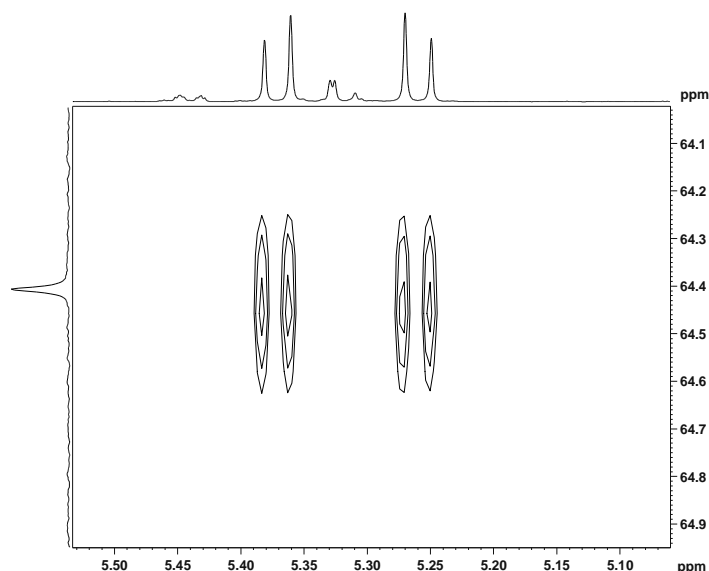
auch bei dieser Verbindung der Zuckerbestandteil  $\beta$ -D-Glucose war [24]. So konnte das anomere Proton (H-1') des Zuckers in der  $\beta$ -D-Konfiguration von Salicortin bei  $\delta = 4,92$  ppm mit einer Kopplungskonstanten von  $J = 7,7$  Hz identifiziert werden. Das dazugehörige Kohlenstoffatom C-1' wurde im HSQC-Spektrum bei  $\delta = 102,5$  ppm identifiziert. Weiterhin wurde die Glucosepartialstruktur durch HMBC- und HSQC-Experimente vollständig aufgeklärt. Im NOESY-Spektrum konnten zwei räumlich nahe Protonen zu H-1' identifiziert werden, wobei es sich um H-2' bei  $\delta = 3,47$  ppm und um H-3 bei  $\delta = 7,20$  ppm handelte, einer chemischen Verschiebung, welche für aromatische Protonen typisch ist (s. Abb. 2.2.5.2-2).



**Abb. 2.2.5.2-2:** Ausschnitt aus dem NOESY-Spektrum ( $^1\text{H}$ ,  $^1\text{H}$ ) von Salicortin. Identifizierung von H-3 ( $\delta = 7,20$  ppm) durch Wechselwirkung mit H-1' ( $\delta = 4,92$  ppm). 600 MHz, 298 K, Methanol- $\text{D}_4$ .

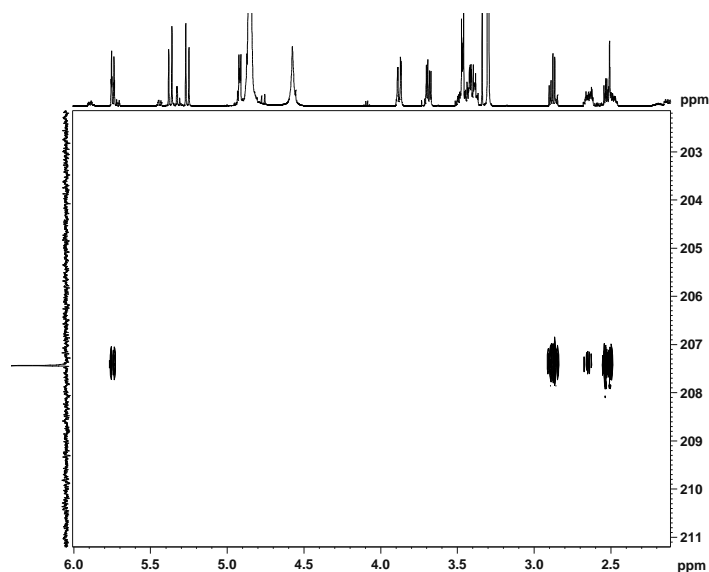
Mit der Kenntnis des Signals von H-3 konnte durch das HSQC-Spektrum das zugehörige Kohlenstoffsignal mit einer chemischen Verschiebung von  $\delta = 116,7$  ppm und damit durch weitere Analyse des HMBC-Spektrums sowie des COSY-Spektrums alle aromatischen Protonen und Kohlenstoffatome der Salicylalkohol-Partialstruktur identifiziert werden. Im HMBC-Spektrum ließen sich bei H-3 vier Kopplungen ( $^3J$  und  $^4J$ ) mit Kohlenstoffkernen erkennen. Hiervon wies nur ein Signal eine chemische Verschiebung zu niedrigeren ppm Werten ( $\delta = 64,4$  ppm) und ließ sich damit eindeutig C-7 als nicht aromatisches Kohlenstoffatom zuordnen. Durch das HSQC-Spektrum wurden H-7a, b identifiziert und zugeordnet (s. Abb. 2.2.5.2-3).





**Abb. 2.2.5.2-3:** Ausschnitt aus dem HSQC-Spektrum ( $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$ ) von Salicortin. Identifizierung von H-7a und H-7b ( $\delta = 5,26$  ppm und  $5,37$  ppm) durch Wechselwirkung mit C-7 ( $\delta = 64,4$  ppm). 600, bzw. 150 MHz, 298 K, Methanol- $\text{D}_4$ .

Durch  $^3J$ -Kopplung mit H-7a im HMBC-Spektrum und der starken Tieffeldverschiebung von  $171,6$  ppm im  $^{13}\text{C}$ -Spektrum ließ sich C-8 als Teil der Ester-Partialstruktur gut zuordnen. So konnte das Signal bei  $\delta = 207,4$  ppm dem C-14 als Keton zugeordnet werden. Von hier aus ließen sich durch Analyse des HMBC-Spektrums H-13a, b und H-12a, b sowie H-10 identifizieren (s. Abb. 2.2.5.2-4).



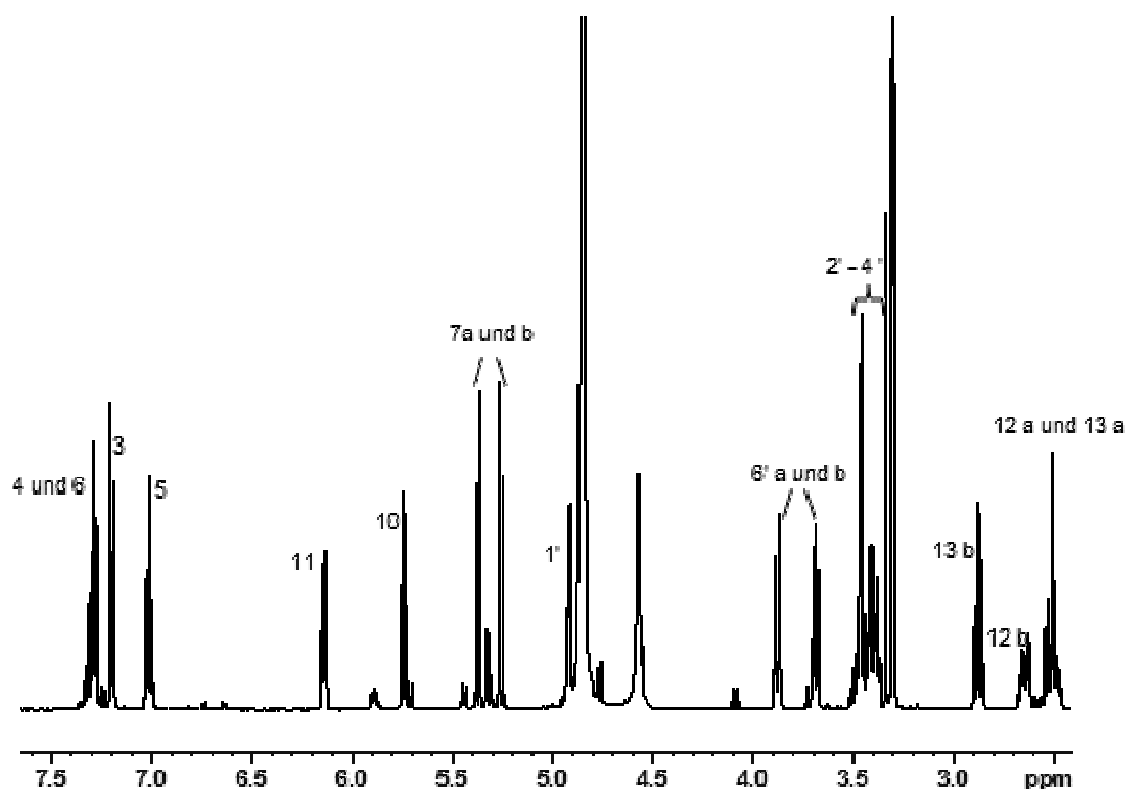
**Abb. 2.2.5.2-4:** Ausschnitt aus dem HMBC-Spektrum ( $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$ ) von Salicortin. Identifizierung von H-12a,b ( $\delta = 2,49$  ppm und  $2,65$  ppm), H-13a,b ( $\delta = 2,53$  ppm und  $2,88$  ppm) und H-10 ( $\delta = 5,75$  ppm) durch  $^2J$ - und  $^3J$ -Kopplungen mit C-14 ( $\delta = 207,4$  ppm). 600, bzw. 150 MHz, 298 K, Methanol- $\text{D}_4$ .

Mit Hilfe des COSY-Spektrums konnte H-11 durch Kopplung mit H-10 identifiziert werden. Das Signal bei  $\delta = 79,2$  ppm zeigte im HMBC-Spektrum  $^3J$ -Kopplungen mit H-11 und H-13. Da es im HSQC-Spektrum mit keinem Proton korreliert werden konnte, wurde es C-9 zugeordnet. Die zugehörigen Kohlenstoffatome zu den identifizierten Protonen wurden im HSQC-Spektrum bestimmt. Tab. 2.2.5.2 fasst alle NMR-Daten von Salicortin zusammen. Abbildung 2.2.5.2-5 zeigt das gesamte Protonenspektrum von Salicortin. Neben der NMR-

Spektroskopie wurde ebenfalls durch die Massenspektrometrie (ESI-MS-Experimente) die Molekülmasse von Salicortin mit  $m/z$  442  $[M+NH_4]^+$  bestätigt.

**Tab. 2.2.5.2:** NMR-Daten von Salicortin (600 MHz  $^1H$ , 150 MHz  $^{13}C$ ), 298 K, gelöst in Methanol- $D_4$ .

$^1H$	$\delta$ [ppm], Signalaufspaltung, $J$ [Hz]	$^{13}C$	$\delta$ [ppm]
1'	4,92 d (7,7)	1'	102,5
2'	3,47 m	2'	75,0
3'	3,47 m	3'	78,0
4'	3,47 m	4'	78,2
5'	3,39 m	5'	71,4
6'a	3,69 dd (5,5; 12,1)	6'	62,5
6'b	3,88 dd (2,2; 12,1)		
		1	126,1
		2	157,0
3	7,20 d (8,0)	3	116,7
4	7,31 m	4	131,1
5	7,01 m	5	123,5
6	7,28 m	6	130,7
7a	5,26 d (12,3)	7	64,4
7b	5,37 d (12,3)		
		8	171,6
		9	79,2
10	5,75 m	10	129,3
11	6,14 m	11	133,4
12a	2,49 m	12	27,2
12b	2,65 m		
13a	2,53 m	13	36,9
13b	2,88 m		
		14	207,4

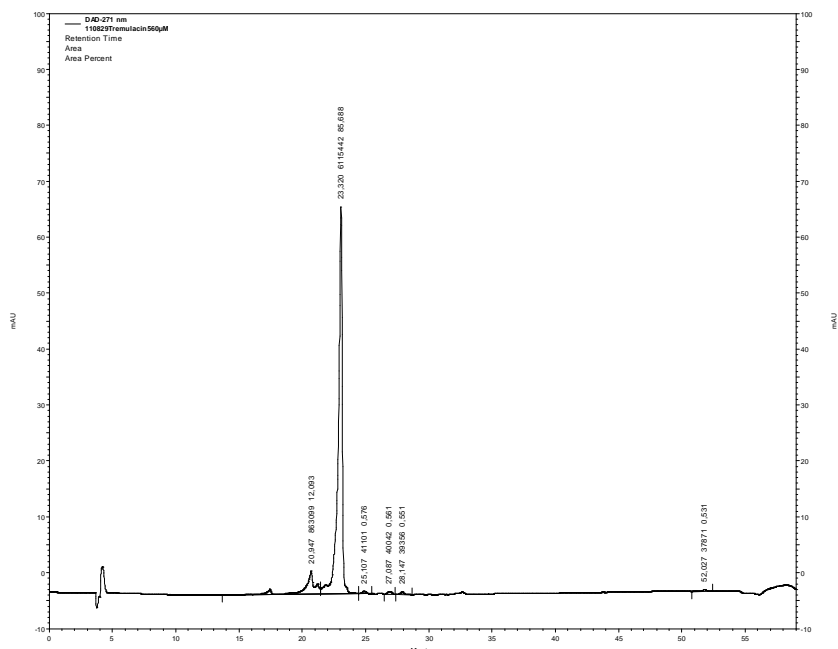


**Abb. 2.2.5.2-5:**  $^1\text{H}$ -Spektrum von Salicortin in Methanol- $\text{D}_4$ , 600 MHz, 298 K. Die Signale sind mit den zugehörigen Protonen beschriftet.

### 2.2.5.3 Isolierung und Reinheitsbestimmung von Tremulacin

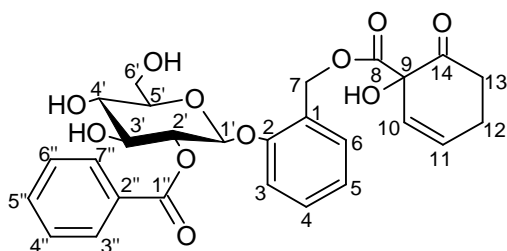
Die Isolierung von Tremulacin gestaltete sich schwieriger als die Salicortin-Isolierung. Dies lag zum einen am deutlich geringeren Vorkommen von Tremulacin im Extrakt, zum anderen an der höheren Labilität der Substanz. Durch Flash-Chromatographie von F7 an Normalphase mit einem Fließmittelsystem aus Ethylacetat und Methanol (Methode s. 2.3.2.1) konnte Tremulacin in mäßiger Ausbeute und Reinheit isoliert werden. F7 wurde in fünf Unterfraktionen aufgetrennt mit einer Gesamtausbeute von 93,1%. Hiervon machten F7.1 3,0%, F7.2 37,0%, F7.3 15,4%, F7.4 6,5% und F7.5 38,1% aus. F7.2 enthielt Tremulacin in einer Reinheit von 85,7% und war nach Entfernen des Lösungsmittels (unter Stickstoff) eine weiße, amorphe Substanz. Nach DC-Entwicklung färbte sich die Substanz mit dem Derivatisierungsreagenz Anisaldehyd/Schwefelsäure nach Erhitzen der DC-Platte braun-schwarz (siehe Abb. 2.2.3, DC bei F7, intensivste Bande mit einem  $R_f$ -Wert von 0,72). Die Reinheit wurde mittels HPLC im UV-Maximum bei 271 nm, welches wiederum im HPLC-Chromatogramm des DAD-Detektors ermittelt wurde, mit Hilfe der Normalisierung bestimmt (siehe Abb. 2.2.5.3). Verschiedene weitere Aufreinigungsversuche mittels semipräparativer HPLC an RP18- und an RP8-Material mit Wasser-Methanol und Wasser-Acetonitril-

Fließmittelsystemen sowie Purifikationsversuche mittels präparativer DC scheiterten, da sich die Substanz unter diesen Bedingungen zu Catechol und Tremuloidin abbaut (Reaktionschema s. Kapitel 3, Abb. 3.1-2). Protische Lösungsmittel scheinen den Abbau von Tremulacin zu begünstigen. Wenn möglich, wurde darauf geachtet, möglichst Acetonitril und kein Methanol oder Wasser bei der weiteren Analytik von Tremulacin zu verwenden.



**Abb. 2.2.5.3:** HPLC-Chromatogramm der Reinheitsbestimmung von Tremulacin, isoliert aus F7. Die zur Berechnung der Reinheit integrierten Peaks sind mit ihrem prozentualen Anteil an der Gesamtpeakfläche im Chromatogramm dargestellt.

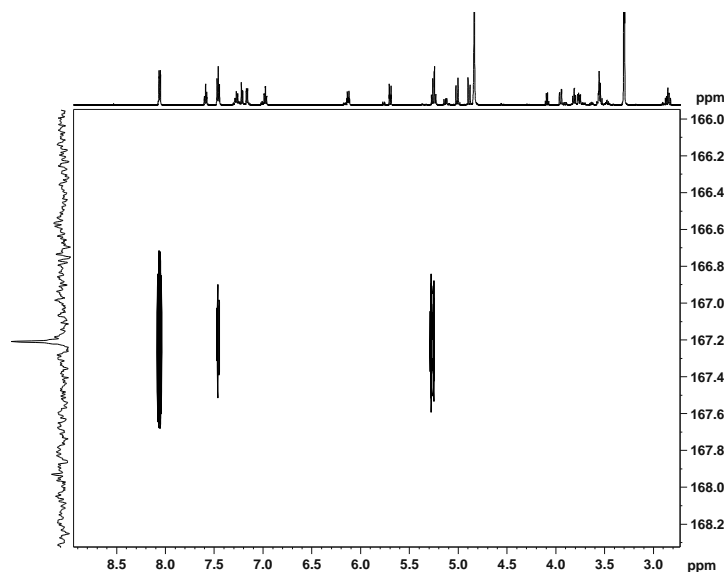
#### 2.2.5.4 Strukturaufklärung von Tremulacin



**Abb. 2.2.5.4-1:** Strukturformel von Tremulacin

Da es sich bei Tremulacin um Salicortin handelt, welches an 2'-Position mit Benzoessäure verestert ist, verlief die Strukturaufklärung ähnlich wie in 2.2.5.2 beschrieben. Durch die Veresterung mit Benzoessäure an 2'-Position wurde allerdings das Signal des anomeren Zuckerprotons im Protonenspektrum etwas in das Tieffeld zu  $\delta = 5,24$  ppm verschoben. Zudem verschob sich auch das Signal von H-2' weiter in das Tieffeld und fiel bei  $\delta = 5,26$  ppm zusammen mit dem Signal von H-1'. Es war somit für H-1' kein Duplett mehr zu erkennen. H-1'

und H-2' bildeten zusammen ein nicht genauer bestimmbares Multiplett im  $^1\text{H}$ -Spektrum. Ferner waren im Tieffeld des  $^1\text{H}$ -Spektrums zusätzlich die Signale der fünf Protonen der Benzoessäure erkennbar, wobei durch die Symmetrieebene in dieser Partialstruktur die Protonen H-7'' und H-3'' bei  $\delta = 8,06$  ppm sowie H-4'' und H-6'' bei  $\delta = 7,46$  ppm die gleiche chemische Verschiebung zeigten (vgl. [76]). Im HMBC-Spektrum ließ sich die Zuordnung der Protonen verifizieren. Hier zeigte das ebenfalls im Vergleich zum Salicortin zusätzlich vorkommende Signal der Carboxylgruppe im  $^{13}\text{C}$ -Spektrum von C-1'' bei  $\delta = 167,2$  ppm zwei  $^3J$ -Kopplungen mit H-3''/H-7'' und H-2' sowie eine  $^4J$ -Kopplung mit H-4''/H-6'' (s. Abb. 2.2.5.4-2).

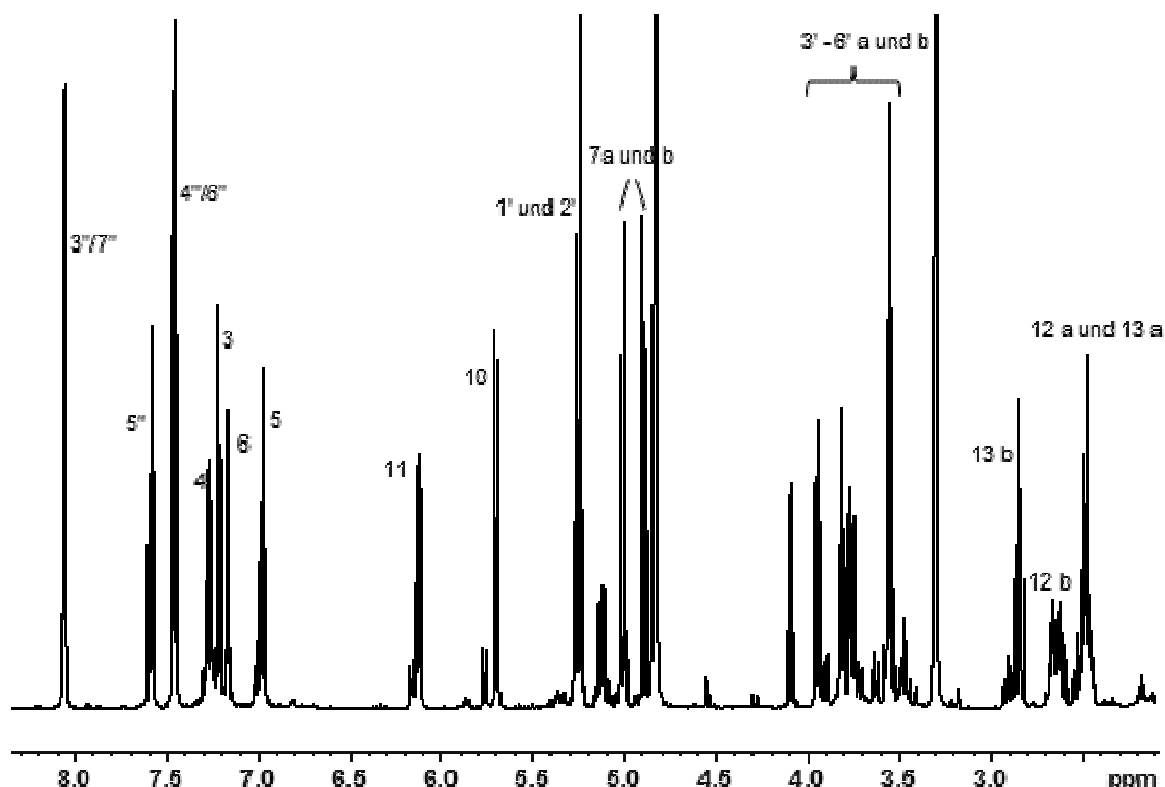


**Abb. 2.2.5.4-2:** Ausschnitt aus dem HMBC-Spektrum ( $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$ ) von Tremulacin. Verifizierung von H-3''/H-7'' ( $\delta = 8,06$  ppm), H-4''/H-6'' ( $\delta = 7,46$  ppm) sowie H-2' ( $\delta = 5,36$  ppm) durch  $^3J$ - und  $^4J$ -Kopplungen mit C-1'' bei  $\delta = 167,2$  ppm. 600, bzw. 150 MHz, 298 K, Methanol- $\text{D}_4$ .

Tab. 2.2.5.4 fasst alle NMR-Daten von Tremulacin zusammen. Abbildung 2.2.5.4-3 zeigt das gesamte Protonenspektrum von Tremulacin. Neben der NMR-Spektroskopie wurde ebenfalls durch die Massenspektrometrie die Molekülmasse von Tremulacin per ESI-MS-Experimente mit  $m/z$  546  $[\text{M}+\text{NH}_4]^+$  bestätigt.

**Tab. 2.2.5.4:** NMR-Daten von Tremulacin (600 MHz  $^1\text{H}$ , 150 MHz  $^{13}\text{C}$ ), 298 K, gelöst in Methanol- $\text{D}_4$ .

$^1\text{H}$	$\delta$ [ppm], Signalaufspaltung, $J$ [Hz]	$^{13}\text{C}$	$\delta$ [ppm]
1'	5,24 m	1'	100,9
2'	5,26 m	2'	75,6
3'	3,81 t (8,3)	3'	75,9
4'	3,56	4'	71,6
5'	3,56 m	5'	78,5
6'a	3,77 dd (4,0; 12,1)	6'	62,5
6'b	3,95 dd (5,3; 12,1)		
		1	126,0
		2	156,6
3	7,22 dd (0,9; 8,4)	3	116,7
4	7,27 m	4	130,9
5	6,97 dd (1,1; 8,4)	5	123,7
6	7,16 dd (1,5; 7,7)	6	130,2
7a	4,88 d (12,5)	7	63,9
7b	5,37 d (12,5)		
		8	171,2
		9	79,1
10	5,70 dd (1,8; 9,9)	10	129,3
11	6,13 dd (3,9; 9,9)	11	133,3
12a	2,48 m	12	27,3
12b	2,64 m		
13a	2,48 m	13	36,8
13b	2,85 m		
		14	207,3
		1"	167,2
		2"	131,2
3"	8,06 d (8,6)	3"	130,8
4"	7,46 t (7,8)	4"	129,6
5"	7,58 m	5"	134,4
6"	7,46 t (7,8)	6"	129,6
7"	8,06 d (8,6)	7"	130,8



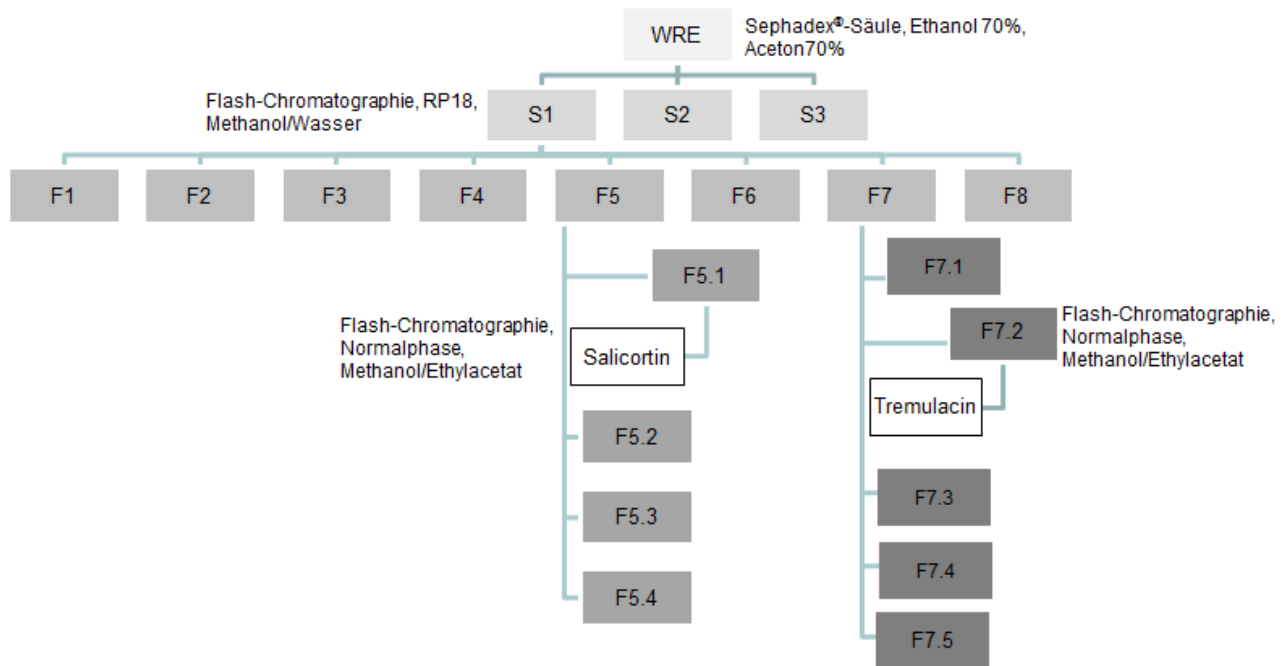
**Abb. 2.2.5.4-3:**  $^1\text{H}$ -Spektrum von Tremulacin in Methanol- $\text{D}_4$ , 600 MHz, 298 K. Die Signale sind mit den zugehörigen Protonen beschriftet.

## 2.2.6 Zusammenfassung und Ausblick

In Kapitel 2 wurde eine bioaktivitätsgeleitete Fraktionierung eines Weidenrindenextraktes beschrieben, welche in der Isolierung der zwei Substanzen Salicortin und Tremulacin resultierte (s. Abb. 2.2.6).

Diese zwei Substanzen sind aus den zwei Unterfraktionen isoliert worden, welche im getesteten *in vitro* Testsystem (ICAM-1 Assay) am aktivsten waren. Im Folgenden sollten die isolierten Substanzen *in vitro* auf ihre entzündungshemmende Aktivität weiter getestet werden (s. Kapitel 3).

Erste Analysen mittels eines DC-MS-Systems hatten außerdem ergeben, dass sich höchstwahrscheinlich in der ebenfalls recht aktiven Fraktion F6 das Salicortinderivat Acetylsalicortin befindet. Aus zeitlichen Gründen konnte diese Substanz im Rahmen dieser Dissertation nicht mehr isoliert werden. Sicherlich wäre aber interessant, ob sich Acetylsalicortin ähnlich wie Tremulacin und Salicortin *in vitro* verhalten würde (s. Kapitel 3). Zukünftige Arbeiten könnten dies untersuchen. Des Weiteren steht mit der Fraktion F4 eine weitere, im ICAM-1 Assay aktive Fraktion zur Verfügung, welche vermutlich die Möglichkeit der Isolierung anderer pharmakologisch aktiver Substanzen in sich birgt.



**Abb. 2.2.6:** Schema zu den Fraktionierungen und Isolierungen des bearbeiteten Weidenrindenextraktes.

## 2.3 Experimenteller Teil

### 2.3.1 Fraktionierung

#### 2.3.1.1 Offene Säulenchromatographie mit Sephadex® LH-20

Zunächst wurde ein standardisierter Weidenrindenextrakt mittels Säulenchromatographie an Sephadex® LH-20-Material in drei Fraktionen aufgetrennt. Das Sephadex® LH-20-Material lag in einer offenen Glas-Chromatographie-Säule in Ethanol 70% aufgeschlemmt mit einem Durchmesser von 3,5 cm und einer Länge des Säulenmaterials von 56 cm vor. Je 5-10 g des Weidenrindenextraktes wurden in 15-30 ml Ethanol 70% gelöst und behutsam in das Säulenmaterial einsickern lassen. Daraufhin begann die Elution mit Ethanol 70% unter Verwendung einer Peristaltikpumpe und eines Fraktionssammlers. Die Einstellungen waren so gewählt, dass ca. 16 ml pro Reagenzglas gesammelt wurden mit einer Geschwindigkeit von ca. 0,6 ml/min. Die Chromatographie wurde durch dünnschichtchromatographische Zwischenanalyse (DC) der Eluate in den Reagenzgläser aus dem Fraktionssammler kontrolliert mit einer Fließmittelzusammensetzung von 90 Teilen Ethylacetat, 5 Teilen Wasser (Millipore®) und 5 Teilen Ameisensäure. Hierbei fanden die Derivatisierungsreagenzien Anisaldehyde® und 5 Teilen Ameisensäure. Hierbei fanden die Derivatisierungsreagenzien Anisaldehyde® und 5 Teilen Ameisensäure.



hyd/Schwefelsäure zur Detektion der Salicylalkoholderivate, Naturstoffreagenz in Kombination mit Macrogol zur Detektion der Flavonoide und Vanillin in Kombination mit konzentrierter Salzsäure zur Detektion der Gerbstoffe Verwendung. Nach DC-Kontrolle wurden die drei Fraktionen erstellt. Die erste Fraktion S1 war die Salicylalkoholderivat angereicherte und wurde mit Hilfe von Salicin als Referenzsubstanz identifiziert. Ähnlich eluierende Substanzen wie Salicin, die sich mit Anisaldehyd/Schwefelsäure rot-bräunlich anfärben ließen, wurden in diese Fraktion mit eingeschlossen (Elutionsvolumen: 0-650 ml). Daraufhin folgte die zweite, Flavonoid angereicherte Fraktion S2. Als Referenzen dienten hier Naringenin-7-O- $\beta$ -glucosid und Catechin. Die hauptsächlich als Glucoside vorliegenden Flavonoide eluierten ähnlich wie das Flavonoidglucosid Naringenin-7-O- $\beta$ -glucosid und ließen sich meist mit Naturstoffreagenz so anfärben, dass sie bei 366 nm gelb fluoreszierten. Die Fraktion wurde so gewählt, dass Catechin als letztes eluierendes Flavonoid noch einbezogen wurde und ab Beginn der dimeren Flavan-3-ole die neue Fraktion S3 begann (Elutionsvolumen S2: 650-1476 ml). Bei S3 handelte es sich folglich um die mit Gerbstoffen angereicherte Fraktion. Gerbstoffe können mit dem Vanillin-Sprühreagenz und konzentrierter Salzsäure bräunlich rötlich angefärbt werden, ihr R<sub>f</sub>-Wert liegt deutlich unter dem von Catechin. Um die Elution der Gerbstoffe und aller restlichen Bestandteile von der Säule zu beschleunigen, wurde das Elutionsmittel auf der Säule nach beendeter Abtrennung von S2 gegen Aceton 70% getauscht (Elutionsvolumen S3: 1476-3146 ml), vgl. [60].

Die Fraktionen wurden nach Entfernung des Lösungsmittels durch Rotationsverdampfung (maximal 40°C) und Lösen in Wasser (Millipore®) vollständig durch Gefriertrocknung getrocknet (nach vorherigem Einfrieren unter Rotation). Durch Wägen der Fraktionen wurde ihr prozentualer Anteil am Gesamtextrakt sowie die Gesamtausbeute der Fraktionierung bestimmt. Insgesamt wurden 63 g Weidenrindenextrakt aufgearbeitet. Bis zur weiteren Verwendung lagerten die Fraktionen dicht verschlossen in Braunglasflaschen bei 7 °C.

**Tab. 2.3.1.1-1:** Verwendete Geräte in Kapitel 2.3.1.1.

Funktion	Name	Hersteller
Peristaltikpumpe	Pharmacia LKB Pump P1	Pharmacia LKB, Uppsala, Schweden
Fraktionssammler	2211 Superrac	LKB Bromma, Bromma, Schweden
Vakuumrotationsverdampfer	Heidolph Laborota 4003 mit Pumpe: Rotavac vario control	Heidolph instruments, Schwabach, Deutschland
Gefriertrocknungsanlage	Ilmvac Pia 100 mit Pumpe Typ 302061 PK8D	Ilmvac GmbH, Ilmenau, Deutschland
Laborwaage	Sartorius Laboratory LC 6200 S	Sartorius AG, Göttingen, Deutschland
Analysenwaage	Sartorius Research R160P	Sartorius AG, Göttingen, Deutschland
Eintauchkühler (Isopropanolbad zum Einfrieren der Fraktionen)	Haake EK 30	PSL Systemtechnik GmbH, Clausthal-Zellerfeld, Deutschland
Rührwerk (Isopropanolbad)	IKA RW 15m	IKA-Werke GmbH und Co. KG, Staufen, Deutschland
Millipore®-Anlage	Astacus Membra Pure	Membra Pure GmbH, Hennigsdorf, Deutschland

**Tab. 2.3.1.1-2:** Verwendete Chemikalien/Verbrauchsmaterialien in Kapitel 2.3.1.1.

Name	Qualität/Beschreibung	Hersteller
<b>Weidenrindenextrakt (97% nativ)</b>	Extraktionsmittel 70% Ethanol, DEV: 8-14:1, Charge: 07001523	Hermes Arzneimittel, Großhesele, Deutschland
<b>Säulenmaterial</b>	Sephadex <sup>®</sup> LH 20	Pharmacia, Uppsala, Schweden
<b>Ethanol 70%</b>	Hergestellt aus frisch abrotiertem Ethanol HSL und Verdünnung mit Reinstwasser (Millipore <sup>®</sup> )	
<b>Aceton 70%</b>	Hergestellt aus frisch abrotiertem Aceton HSL und Verdünnung mit Reinstwasser (Millipore <sup>®</sup> )	
<b>Ethylacetat p.A.</b>	99,99%	Acros Organics, Geel, Belgien
<b>Ameisensäure p.A.</b>	98%-100%	Merck, Darmstadt, Deutschland
<b>DC-Platten</b>	DC Kieselgel 60 F <sub>254</sub> , Aluminium sheets 20x20 cm	Merck, Darmstadt, Deutschland
<b>D-Salicin</b>	≥98%	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland
<b>Naringenin-7-O-β-glucosid</b>	≥90%	Extrasynthèse S.A., Genay, Frankreich
<b>Catechin</b>	≥98%	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland

**Tab 2.3.1.1-3:** Verwendete Derivatisierungsreagenzien in Kapitel 2.3.1.1:

Name	Herstellung und Verwendung
<b>Anisaldehyd-Schwefelsäure-Reagenz</b>	0,5 T Anisaldehyd (p-Methoxybenzaldehyd, ≥98%, Fluka, Schweiz) + 10 T Eisessig (p.A., 100%, Merck, Deutschland) + 85 T Methanol (p.A., ≥99,9%, Merck, Deutschland) werden gemischt und 5 T Schwefelsäure (p.A., 95-97%, Merck) unter Eiskühlung und Rühren langsam hinzugegeben. Nach Besprühen der DC-Platte ca. 5 Min erhitzen bei 120 °C. Auswertung bei Tageslicht.
<b>Naturstoffreagenz A/ Macrogol</b>	1% Naturstoffreagenz A (Diphenylborsäure-2-aminoethylester p.A., ≥98%, Carl Roth GmbH, Deutschland) in Methanol (p.A., ≥99,9%, Merck, Deutschland). Nach dem Besprühen wird mit einer 5%-igen methanolischen Lösung von Macrogol (PEG 400, Merck, Deutschland) nachgesprüht und bei 366 nm ausgewertet.
<b>Vanillin-Reagenz/HCl</b>	1% Vanillin (≥99%, Carl Roth GmbH, Deutschland) in Methanol (p.A., ≥99,9%, Merck, Deutschland). Nach dem Besprühen wird mit konzentrierter Salzsäure (p.A. rauchend, 37%, Merck, Deutschland) nachgesprüht, bei Tageslicht ausgewertet.

### 2.3.1.2 Flash-Chromatographie von S1

Die mit Salicylalkoholderivaten angereicherte Fraktion S1 wurde mittels Flash-Chromatographie an RP18-Material in weitere acht Fraktionen (F1-F8) unterteilt. Aufgrund starker, nicht in den Griff zu bekommender Druckschwankungen am Gerät bei der Trockenaufgabe, wurde die Flüssigaufgabe gewählt. Es wurde jeweils versucht, ca. 2 g der S1-Fraktion in ungefähr 5 ml Methanol 10% zu lösen. Die gesamte S1-Fraktion löste sich hierbei nie vollständig. Deswegen wurde eine klare Lösung durch Zentrifugation hergestellt und auf die Vorsäule gegeben, wobei sich keine Druckprobleme einstellten. Beim in Methanol 10% schlecht löslichen, sehr klebrigen Teil der S1-Fraktion handelte es sich vermutlich um Zucker, die bei der Trockenaufgabe das System verklebt hatten. Tabelle 2.3.1.2 gibt die Bedingungen der Flash-Chromatographie wieder.

**Tab. 2.3.1.2** : Verwendete Flash-Chromatographie und ihre Bedingungen bei der Fraktionierung von S1.

Fließmittel	
Fließmittel A	H <sub>2</sub> O (Millipore <sup>®</sup> ), entgast
Fließmittel B	Methanol (p.A., ≥99,9%, Merck, Darmstadt, Deutschland), entgast
Gradient	
Min	Fließmittelzusammensetzung [%B in A]
0 – 60	10% → 70%
60 – 90	100%
Einstellungen	
Fließgeschwindigkeit	15 ml/min
Sammlung pro Glas (integrierter Fraktionssammler)	20 ml
Detektionswellenlänge am UV-Detektor	270 nm
Gerät und Software	
Armen Instrument Spot Flash Liquid Chromatography mit Armen Glider Flash-Software. Armen instrument, Saint Ave, Frankreich.	
Trennsäule	
RP18-Säule mit 90 g Trennmaterial: SVP D40 – RP18, 25 – 40 µm Korngröße. Merck Chimie SAS, Fontenay-sous-Bois, Frankreich. Zusätzlich selbst gepackte Vorsäule mit 8,5 g RP18-Material (Lichroprep 0,025-0,040 mm for column chromatography, Merck, Darmstadt, Deutschland).	

Der Verlauf der Flash-Chromatographie konnte grob mittels des im Gerät eingebauten UV-Detektors kontrolliert werden. Die eigentliche Entscheidung zum Vereinigen der einzelnen, vom integrierten Fraktionssammler der Flash-Chromatographie gesammelten Unterfraktionen zu den richtigen Fraktionen F1-F8 fand auch hier wieder nach DC-Analyse statt (s. 2.3.1.1). Bei der Durchführung der DC wurde das gleiche Fließmittelsystem wie in 2.3.1.1 beschrieben verwendet und nur das Anisaldehyd-Schwefelsäure-Derivatisierungsreagenz. Die Elutionsvolumina der Fraktionen betrugen: F1: 0-280 ml, F2: 280-360 ml, F3: 360-460 ml, F4: 460-580 ml, F5: 580-740 ml, F6: 740-800 ml, F7: 800-980 ml und F8: 980-1240 ml. Nach Vereinigen der Fraktionen wurde auch hier zunächst das Fließmittel abrotiert, die Fraktionen dann in wenig Wasser (Millipore<sup>®</sup>) gelöst, unter Rotation eingefroren, mit der Gefrier-trocknungsanlage getrocknet und ausgewogen (Geräte siehe Tab. 2.3.1.1-1). Insgesamt wurden 19,3 g S1 (20,4 g S1 abzüglich 1,1 g nicht gelöster Bodensatz) mit der Flash-Chromatographie aufgetrennt.

## 2.3.2 Isolierungen

### 2.3.2.1 Isolierung von Salicortin aus F5 und von Tremulacin aus F7

Durch Flash-Chromatographie (Gerät siehe Tab. 2.3.1.2) von F5 und F7 an Normalphase und einem Fließmittelsystem aus Ethylacetat und Methanol mit äußerst flachen Gradienten

konnten Salicortin und Tremulacin isoliert werden. Je ca. 300 mg F5 und 90 mg F7 wurden hierbei auf ungefähr 1,5 g, bzw. 400 mg Kieselgel aufgezogen und trocken auf die Kieselgelsäule gegeben. Es wurden vier Fraktionen von F5 und fünf Fraktionen von F7 nach DC-Kontrolle vereinigt. Das Fließmittelsystem der DC bestand aus 100 Teilen Ethylacetat, 11 Teilen Ameisensäure, 11 Teilen Essigsäure und 27 Teilen Wasser (Millipore®) bei Salicortin. Bei Tremulacin wurde das gleiche DC-Fließmittelsystem wie in 2.3.1.1 beschrieben verwendet, genauere Angaben zu den Lösungsmitteln s. Tab. 2.3.1.1-2. Als Derivatisierungsreagenz wurde Anisaldehyd-Schwefelsäure verwendet (s. Tab. 2.3.1.1-3). Die Elutionsvolumina der Fraktionen F5.1-F5.4 und F7.1-F7.5 teilten sich folgendermaßen auf: F5.1: 0-880 ml, F5.2: 880-1200 ml, F5.3: 1200-1800 ml und F5.4: 1800-2800 ml; Fraktionen F7.1-F7.5: F7.1: 0-120 ml, F7.2: 120-640 ml, F7.3: 640-780 ml, F7.4: 780-1400 ml und F7.5: 1400-2400 ml. In den Fraktionen F5.1-F5.4 wurde durch Vakuumrotation das Lösungsmittel entfernt, die Fraktionen dann in wenig Wasser (Millipore®) gelöst, unter Rotation eingefroren, mit der Gefrier-trocknungsanlage getrocknet und ausgewogen (Geräte siehe Tab. 2.3.1.1-1). Aus den Fraktionen F7.1-F7.5 wurde der überwiegende Teil des Lösungsmittels durch Vakuumrotation, der übrig gebliebene Teil des Lösungsmittels durch Abblasen mit Stickstoff bei Raumtemperatur entfernt und das Gewicht der Fraktionen durch Differenzwägung ermittelt. Sauber abgetrenntes Salicortin befand sich in der Fraktion F5.1, Tremulacin in der Fraktion F7.2. Insgesamt wurden 1,7 g F5 und 363,5 mg F7 mit der Flash-Chromatographie aufgearbeitet.

**Tab. 2.3.2.1** : Flash-Chromatographie-Bedingungen bei den Isolierungen von Salicortin aus F5 und von Tremulacin aus F7 (Gerät und Software s. Tab. 2.3.1.2).

<b>Fließmittel</b>	
Fließmittel A	Ethylacetat (p.A., ≥99,99%, Acros Organics, Geel, Belgien), entgast
Fließmittel B	Methanol (p.A., ≥99,9%, Merck, Darmstadt, Deutschland), entgast
<b>Gradient bei F5 (Salicortin)</b>	
Min	Fließmittelzusammensetzung [%B in A]
0 – 10	0%
10 – 20	0% → 3%
20 – 60	3%
60 – 80	3% → 4%
80 – 90	4%
90 – 100	4% → 10%
100 – 110	10% → 20%
110 – 120	20% → 50%
120 – 130	50% → 100%
130 – 140	100%
<b>Gradient bei F7 (Tremulacin)</b>	
Min	Fließmittelzusammensetzung [%B in A]
0 – 30	0%
30 – 40	0% → 3%
40 – 55	3%
55 – 60	3% → 5%
60 – 70	5%
70 – 80	5% → 10%
80 – 90	10%
90 – 100	10% → 20%
110 – 120	20%
120 – 140	100%
<b>Einstellungen</b>	
Fließgeschwindigkeit	15 ml/min
Sammlung pro Glas (integrierter Fraktionssammler)	20 ml
Detektionswellenlänge am UV-Detektor	275 nm
<b>Trennsäule</b>	
Normalphasensäule mit 30 g Kieselgel: SVP Si60 D26, 15 – 40 µm Korngröße. Merck Chimie SAS, Fontenay-sous-Bois, Frankreich. Kieselgel 60 mit 0,063-0,200 mm Korngröße (Merck, Darmstadt, Deutschland) wurde für die Trockenaufgabe verwendet.	

### 2.3.2.2 Strukturaufklärung der Isolate

#### 2.3.2.2.1 NMR-Spektroskopie

Die Strukturen der bereits bekannten, isolierten Substanzen Salicortin und Tremulacin wurden durch ein- und zweidimensionale NMR-Experimente aufgeklärt. Hierfür wurden die Isolate je in ca. 600 µl deuteriertem Methanol (Methanol-D<sub>4</sub>, 99,8%, Deutero GmbH, Kastellaun, Deutschland) gelöst und in NMR-Röhrchen (Typ 507-HP, Norell Inc, Landisville, USA) überführt. Das <sup>1</sup>H-Protonenspektrum lieferte die chemischen Verschiebungen (angegeben in

ppm) der Molekülprotonen exklusive der Protonen der Hydroxylgruppen. Die Hydroxylgruppen waren aufgrund des schnellen Austauschs von Deuterium-Ionen des deuterierten Lösungsmittels MeOD mit den Protonen der OH-Gruppen im  $^1\text{H}$ -Spektrum nicht sichtbar. Durch die charakteristischen chemischen Verschiebung der anomeren Zuckerprotonen zwischen 4,9 und 5,2 ppm und der zu erwartenden Signalaufspaltung in ein Duplett, konnten diese leicht identifiziert und damit dieses Integral als Referenzfläche für ein Proton definiert werden. Durch die Festlegung des Integrals für ein Proton konnte die Menge der anderen Protonen im Molekül weiter bestimmt werden. Die chemischen Verschiebungen der Signale aus den eindimensionalen  $^1\text{H}$ - und  $^{13}\text{C}$ -Spektren sowie die Signalaufspaltungen und Kopplungskonstanten aus den  $^1\text{H}$ -Spektren, lieferten Hinweise zu den Bindungsverhältnissen der Protonen und Kohlenstoffatome. Weitere Strukturaufklärung erfolge anhand der zweidimensionalen Spektren  $^1\text{H}, ^{13}\text{C}$ -HSQC,  $^1\text{H}, ^{13}\text{C}$ -HMBC,  $^1\text{H}, ^1\text{H}$ -NOESY und  $^1\text{H}, ^1\text{H}$ -COSY. Durch  $^1\text{H}, ^{13}\text{C}$ -HSQC-(heteronuclear single quantum coherence) Experimente konnten direkte Kohlenstoff-Wasserstoff-Bindungen, meist das zugehörige Kohlenstoffatom zu einem Proton ermittelt werden. Aufschluss über Protonen, welche räumliche Nähe aufwiesen, lieferten die  $^1\text{H}/^1\text{H}$ -NOESY (nuclear overhauser enhancement spectroscopy)-Experimente. Des Weiteren waren  $^1\text{H}, ^{13}\text{C}$ -HMBC (heteronuclear multiple bond correlation)-Spektren unverzichtbar für die Strukturaufklärung, da sie Kopplungen von Kohlenstoffatomen und Protonen über zwei ( $^2J$ ), drei ( $^3J$ ) oder vier ( $^4J$ ) Bindungen anzeigten.  $^1\text{H}, ^1\text{H}$ -COSY (correlated spectroscopy)-Spektren lieferten Signale von Protonen, die über zwei bis vier Bindungen miteinander koppelten, z.B. vicinale Protonen.

Gemessen wurden die NMR-Spektren von der Abteilung der Zentralen Analytik an der Universität Regensburg an einem Avance III 600 Kryo-NMR-Gerät (600,25 MHz für  $^1\text{H}$  und 150,08 MHz für  $^{13}\text{C}$ ) mit einem Kryo-Probenkopf der Firma Bruker (Bruker Corporation, Billerica, USA). Im  $^1\text{H}$  Spektrum wurde gegen das undeuterierte, im  $^{13}\text{C}$  gegen das deuterierte Lösungsmittelsignal referenziert (Messtemperatur 298 K). Für die Auswertung wurde die Software Topspin 2.1 genutzt (Bruker).

#### 2.3.2.2.2 Massenspektrometrie

Die massenspektrometrische Analyse lieferte die Molekülmasse der Isolate, welche die bereits bekannten Strukturen bestätigte. Auch diese Messungen wurden in der Abteilung der Zentralen Analytik der Universität Regensburg durchgeführt. Die ESI-MS Spektren wurden mit dem Gerät Thermo Quest Finnigan TSQ 7000 der Firma Thermoquest (Thermoquest, San Jose, USA) aufgenommen und mit der Software Xcalibur 1.2 ausgewertet.

### 2.3.2.3 Reinheitsbestimmungen der Isolate

Die Reinheit der isolierten Substanzen Salicortin und Tremulacin wurde mit analytischer HPLC bestimmt. Nach Lösen der Substanzen in Methanol (bei Salicortin) oder Acetonitril (bei Tremulacin) und adäquater Verdünnung, wurden die Inhaltsstoffe der Lösung mittels HPLC an RP18-Material und einem Fließmittelsystem aus Wasser/Methanol, bzw. Wasser/Acetonitril aufgetrennt und mit einem DAD (Dioden Array Detector) detektiert. Die Peakflächen des erhaltenen Chromatogramms wurden im UV-Maximum, welches mit Hilfe der HPLC-Software ermittelt wurde, des zu analysierenden Stoffes bestimmt. Das Verhältnis der Peakfläche des jeweiligen Stoffes (Salicortin oder Tremulacin) zur Gesamtpeakfläche im Chromatogramm gab die Reinheit des Stoffes in Prozent wieder (Normalisierung). Eventuelle Systempeaks wurden durch einen HPLC-Lauf mit derselben Methode und Injektion des reinen Lösungsmittels ermittelt und nicht mit in die Berechnung mit einbezogen. Tab. 2.3.2.3 zeigt die genauen Bedingungen der analytischen HPLC bei den Reinheitsbestimmungen.

**Tab. 2.3.2.3:** HPLC-Bedingungen und HPLC-System der Reinheitsermittlung von Salicortin und Tremulacin.

<b>Fließmittel</b>	
Fließmittel A	H <sub>2</sub> O (Millipore®) mit 1% THF (Lichrosolv®, Merck, Darmstadt, Deutschland), bei Salicortin H <sub>2</sub> O (Millipore®), bei Tremulacin
Fließmittel B	Methanol (Lichrosolv®, Merck, Darmstadt, Deutschland), bei Salicortin Acetonitril (Lichrosolv®, Merck, Darmstadt, Deutschland) 95%, Wasser (Millipore®) 5%, bei Tremulacin
<b>Gradient</b>	
Min	Fließmittelzusammensetzung [%B in A]
0 – 45	20% → 80%
45 – 50	80%
50 – 51	80% → 20%
51 – 60	20%
<b>Einstellungen</b>	
Temperatur Autosampler	4 °C
Temperatur Säulenofen	30 °C
Fließgeschwindigkeit	0,6 ml/min
Injektionsvolumen	20 µl
Detektionswellenlänge Salicortin	270 nm
Detektionswellenlänge Tremulacin	271 nm
<b>Geräte und Software</b>	
<b>LaChrom Elite® HPLC-System von VWR-Hitachi, Darmstadt, Deutschland mit folgenden Elementen:</b>	
Autosampler	L2200
Pumpe	L2130
Säulenofen	L2350
DAD	L2455
Software	EZChrom Elite
<b>Trennsäule</b>	
Lichrocart® 250-4 mm Kartusche mit Purospher Star® RP18-e (5 µm) und Vorsäule, Merck, Darmstadt, Deutschland	

### 2.3.3 Phytochemische Charakterisierung des verwendeten Weidenrindenextraktes und den Fraktionen S1-S3

#### 2.3.3.1 Gehaltsbestimmung des Gesamtsalicens nach Europäischem Arzneibuch (Ph. Eur. 6.1)

Nach der Monographie „Weidenrindentrockenextrakt“ im Ph. Eur. 6.1 [19] wurde der prozentuale Gehalt an Gesamtsalicylalkoholderivaten ausgedrückt als Gesamtsalicin im hier bearbeiteten Weidenrindenextrakt und in den Sephadex®-Fraktionen S1, S2 und S3 bestimmt.

*Herstellung der Untersuchungslösung:* Ca. 300 mg Extrakt oder ca. 80 mg der Fraktionen (nach vorheriger Homogenisation) wurden genau gewogen und dann mit 40 bzw. 10 ml Methanol (Fraktionen) und 40 bzw. 10 ml 0,1 M NaOH-Lösung versetzt. Es folgte das Erhitzen des Gemischs auf 60 °C für eine Stunde unter Rückflussskühlung. Nach Abkühlen und Zugabe von 4 bzw. 1 ml 1 M HCl zum Neutralisieren, wurde die Suspension in einen 100 ml- bzw. 25 ml-Messkolben durch Papierfilter filtriert und durch Nachwaschen des Filtrats mit 50% Methanol in Wasser auf 100,0 ml, bzw. 25,0 ml aufgefüllt. Vor der HPLC-Analyse wurde die Lösung noch durch einen Spritzenvorsatzfilter filtriert. Für jede Probe wurde die Bestimmung dreimal durchgeführt.

*Herstellung der Referenzlösung:* Je 5 mg Picein und 15 mg Salicin wurden in je 25,0 ml Methanol 80% gelöst. Zu der Salicinlösung wurden 5 ml der Piceinlösung gegeben und im Messkolben mit Wasser (Millipore®) auf 50,0 ml aufgefüllt.

Die HPLC-Analyse von Referenz- und Untersuchungslösungen schloss sich (Bedingungen s. Tab. 2.3.3.1) an, wobei zunächst die Auflösung und damit die Eignung der stationären Phase (Säule) bestimmt wurde. Die HPLC-Säule wurde als geeignet angesehen, wenn die Auflösung zwischen Picein und Salicin mindestens 1,5 betrug. Die Auflösung (Rs) errechnete sich nach folgender Formel:

$$Rs = 1,18 \cdot \frac{(Rt_p - Rt_s)}{(b0,5_p + b0,5_s)}$$

$Rt_p$  = Retentionszeit von Picein [Min]

$Rt_s$  = Retentionszeit von Salicin [Min]

$b0,5_p$  = Peakbreite auf halber Peakhöhe von Picein



$b_{0,5_s}$  = Peakbreite auf halber Peakhöhe von Salicin

Der Gehalt an Gesamtsalicylalkoholderivaten berechnete sich als Gesamtsalicin nach folgender Formel bei den Extraktproben:

$$\text{Gesamtsalicin [\%]} = \frac{A_1 \cdot m_2 \cdot p \cdot 2}{A_2 \cdot m_1}$$

Bei den Fraktionsproben nach der abgewandelten Formel:

$$\text{Gesamtsalicin [\%]} = \frac{A_1 \cdot m_2 \cdot p}{A_2 \cdot m_1 \cdot 2}$$

$A_1$  = Fläche des Salicinpeaks in der Untersuchungslösung

$A_2$  = Fläche des Salicinpeaks in der Referenzlösung

$m_1$  = Eingewogene Menge von Extrakt oder Fraktion in g

$m_2$  = Eingewogene Menge der Referenzsubstanz Salicin in der Referenzlösung in g

$p$  = Reinheit der Referenzsubstanz Salicin in % (hier 99%)

**Tab. 2.3.3.1-1:** HPLC-Bedingungen der Gesamtsalicingehaltsbestimmung nach Ph. Eur. 6.1, HPLC-System s. Tab. 2.3.2.3.

Fließmittel	
Fließmittel A	98,2 Volumenteile H <sub>2</sub> O (Millipore®) mit 0,5% H <sub>3</sub> PO <sub>4</sub> (p.A., 85%, Merck, Darmstadt, Deutschland) und 1,8 Volumenteile THF (s.u.)
Fließmittel B	Tetrahydrofuran (THF, Lichrosolv®, Merck, Darmstadt, Deutschland)
Gradient	
Min	Fließmittelzusammensetzung [%B in A]
0 – 15	0%
15 – 17	0% → 10%
17 – 23	10%
23 – 25	10% → 0%
25 – 40	0%
Einstellungen	
Temperatur Autosampler	Raumtemperatur
Temperatur Säulenofen	Raumtemperatur
Fließgeschwindigkeit	1,0 ml/min
Injektionsvolumen	10 µl
Detektionswellenlänge	270 nm
Trennsäule	
Lichrocart® 10-4,6 mm Kartusche mit Purospher Star® RP18-e (5 µm) und Vorsäule, Merck, Darmstadt, Deutschland.	

**Tab. 2.3.3.1-2:** Verwendete Chemikalien/Verbrauchsmaterialien in Kapitel 2.3.3.1.

Name	Qualität	Hersteller
Picein	≥ 90%	Extrasynthèse S.A., Genay, Frankreich
Salicin	> 99%	Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland
Methanol Lichrosolv®	HPLC-Qualität	Merck, Darmstadt, Deutschland
NaOH (0,1 mol/l)	p.A.	Merck, Darmstadt, Deutschland
HCl (1 mol/l)	p.A.	Merck, Darmstadt, Deutschland
Spritzenvorsatzfilter <i>Minisart 16534 0,2 µm Porengröße</i>		Sartorius AG, Göttingen, Deutschland
Einmalspritzen B. Braun <i>Injekt 1ml</i>		B. Braun Melsungen AG, Melsungen, Deutschland

Des Weiteren wurde Salicin im Extrakt, in S1 und in S2 ohne vorherige alkalische Hydrolyse quantifiziert. Hier wurde wie oben beschreiben vorgegangen. Allerdings wurde die zu bestimmende Probe direkt in 50% Methanol gelöst und nachfolgend per HPLC analysiert ohne Erhitzen in NaOH. Alle Werte wurden dreifach bestimmt.

### 2.3.3.2 Flavonoidgehaltsbestimmung

Der Gesamtgehalt an Flavonoiden im Extrakt sowie in den Fraktionen S1 – S3 wurde mittels analytischer HPLC als Naringenin-7-O- $\beta$ -glucosid bestimmt. Nach Lösen von ca. 30 mg Extrakt oder Fraktionen (genau gewogen) in 10,0 ml (Messkolben) Methanol 20% (HPLC-Qualität, bzw. Millipore®) und Filtrieren durch Spritzenvorsatzfilter (s. Tab. 2.3.3.1-2), wurden die Lösungen per analytischer HPLC durch Auftrennung an einer RP18-Säule und Detektion mittels DAD analysiert. Die Peakflächen der Peaks in den erhaltenen Chromatogrammen mit ähnlichen UV-Spektren wie das des Naringenin-7-O- $\beta$ -glucosids (UV-Maxima bei 216, 282 und 329 nm) wurden bei 282 nm bestimmt und addiert. Eine Gesamt-5-Punkt-Kalibriergerade von Naringenin-7-O- $\beta$ -glucosid (s. Tab. 2.3.1.1-2) wurde aus drei Kalibriergeraden, welche aus verschiedenen Einwaagen der Substanz gelöst in 20% Methanol hergestellt wurden, bei 282 nm bestimmt. Die Einwaagen lagen zwischen 0,08 und 4,1 mg in 10 ml (Messkolben). Die Konzentration der Gesamtflavonoide im Extrakt und in den Fraktionen errechnete sich aus den Gesamtpeakflächen der jeweiligen Chromatogramme mit Hilfe der Geradengleichung der Kalibriergerade und wurden in mg/10 ml ausgedrückt. Für die Bestimmung des prozentualen Gehalts wurde diese erhaltene Gesamtnaringenin-7-O- $\beta$ -glucosid-Konzentration in mg/10 ml Lösung in die Gesamtmenge [mg] umgerechnet, durch die Einwaage des Extraktes oder der Fraktion [mg] dividiert und mit 100% multipliziert. Die Gehaltsbestimmung wurde für jede Probe dreimal durchgeführt.

**Tab. 2.3.3.2:** HPLC-Bedingungen der Flavonoidgehaltsbestimmung, HPLC-System s. Tab. 2.3.2.3.

<b>Fließmittel</b>	
Fließmittel A	H <sub>2</sub> O (Millipore®) mit 0,1% THF (Lichrosolv, Merck, Darmstadt, Deutschland)
Fließmittel B	Methanol (HPLC-Qualität, Lichrosolv®, Merck, Darmstadt, Deutschland)
<b>Gradient bei Salicortin</b>	
Min	Fließmittelzusammensetzung [%B in A]
0 – 45	20% → 80%
45 – 50	80%
50 – 51	80% → 20%
51 – 60	20%
<b>Einstellungen</b>	
Temperatur Autosampler	10 °C
Temperatur Säulenofen	25 °C
Fließgeschwindigkeit	0,6 ml/min
Injektionsvolumen	20 µl
Detektionswellenlänge	282 nm
<b>Trennsäule</b>	
Hibai® 250-4 mm Kartusche mit Purospher Star® RP18-e (5 µm) und Vorsäule, Merck, Darmstadt, Deutschland.	

### 2.3.3.3 Bestimmung des Gerbstoffgehalts

Der Gerbstoffgehalt in den Fraktionen und im Extrakt wurde nach einer Arzneibuchmethode (Ph. Eur. 6.0, Methode 2.8.14 [77]), welche von Glasl [74] leicht modifiziert wurde, durchgeführt. Bei dieser Methode wurden zunächst die Gesamtpolyphenole mit Folin-Ciocalteus Phenolreagenz durch UV-metrische Messung bestimmt. Nach Adsorption der Gerbstoffe an Hautpulver erfolgte dieselbe Messung der übrig gebliebenen Polyphenole. Aus der Differenz errechnete sich der Gerbstoffgehalt.

150 mg (genau gewogen) des Extraktes und der Fraktion S1, bzw. 25 mg der Fraktionen S2 und S3 wurden in einem Erlenmeyerkolben mit ca. 60 ml, bzw. 30 ml Wasser (Millipore®) versetzt und 30 min lang bei 80-90 °C erhitzt. Nach Abkühlung unter fließendem Wasser und quantitativer Überführung in einen 100, bzw. 50 ml Messkolben, wurde durch Nachwaschen mit kaltem Wasser auf 100,0, bzw. 50,0 ml ergänzt. Es folgte die Filtration der Suspension, wobei die ersten 20 ml verworfen wurden. Der klare Überstand wurde zur Bestimmung des Gesamtpolyphenolgehalts mit Wasser (Millipore®) 1:5 verdünnt. Je 2,0 ml hiervon wurden mit 1,0 ml Folin-Ciocalteus Phenolreagenz und 10 ml Wasser (Millipore®) versetzt. Diese Mischung wurde mit Natriumcarbonatlösung 10,6% auf 25,0 ml (Messkolben) aufgefüllt. Nach 15 Minuten erfolgte die photometrische Messung bei 691 nm, Wasser (Millipore®) diente als Kompensationsflüssigkeit. Zur Bestimmung der Polyphenole nach Adsorption an Hautpulver wurden 10 ml des oben beschriebenen klaren Überstands mit 100 mg Hautpulver versetzt und 60 min mit einem Orbitalschüttler geschüttelt. Nach Filtration der Lösung und 1:5 Verdünnung mit Wasser (Millipore®) wurde analog der Gesamtpolyphenol-Gehaltsbestimmung weiter verfahren.

Die modifizierte Arzneibuchmethode nach Glasl erlaubte es, auf eine Referenzsubstanz zu verzichten und sich stattdessen mit einem spezifischen Absorptionskoeffizienten von  $E^{1\%} = 1100$  zu behelfen.

Die Berechnung der an Hautpulver adsorbierenden Gerbstoffe und der Gesamtpolyphenole erfolgte nach folgenden Formeln:

$$\text{Gesamtpolyphenole} = \frac{A_{\text{gesamt}} \cdot V_F}{1100 \cdot m}$$

$$\text{Gerbstoffe} = \frac{(A_{\text{gesamt}} - A_{\text{nach Hautpulver}}) \cdot V_F}{1100 \cdot m}$$

$A_{\text{gesamt}}$  = gemessene Absorption der Gesamtpolyphenollösung

$A_{\text{nach Hautpulver}}$  = gemessene Absorption der Lösung nach Adsorption an Hautpulver (übrig gebliebene Polyphenole)

$V_F$  = Verdünnungsfaktor. Beim ersten Auffüllen der Probe auf 100 ml lag dieser Faktor bei 6250, beim Auffüllen auf 50 ml bei 3125.

$m$  = Einwaage des Extraktes bzw. der Fraktion in g

**Tab. 2.3.3.3:** Verwendete Chemikalien und Geräte in Kapitel 2.3.3.3.

Name	Qualität	Hersteller
<b>Folin-Ciocalteus Phenolreagenz</b>		Merck, Darmstadt, Deutschland
<b>Hautpulver</b>	Freiberger Hautpulver	Filk, Freiberg, Deutschland
<b>Natriumcarbonat</b>	p.A.	Merck, Darmstadt, Deutschland
<b>Orbitalschüttler</b>	Lab-Shaker Modell Kühner, B. Braun, Melsungen, Deutschland	
<b>UV/VIS-Spektrometer</b>	Win UV, Varian, Darmstadt, Deutschland	

### 2.3.4 ICAM-1 Assay

Im Rahmen der bioaktivitätsgeleiteten Fraktionierung wurden der bearbeitete Weidenrindenextrakt und seine weiteren Fraktionen im ICAM-1 Assay getestet. Der Extrakt wurde in 50 µg/ml und 10 µg/ml, die Fraktion S1 in 37,5 µg/ml, S2 in 6,6 µg/ml und S3 in 5,7 µg/ml, je nach den Ausbeuten aus der Fraktionierung, getestet. Die Fraktionen F1-F8 sind in einer einheitlichen Konzentration von je 20 µg/ml untersucht worden. Als Lösungsmittel für Extrakt und Fraktionen diente während der gesamten Verdünnungsreihe Zellkulturmedium. Sub-

stanzaufgabe, Stimulation der Zellen und Messung der ICAM-1-Expression verhielten sich wie in Kapitel 3 unter 3.3.1.1.1-3.3.1.1.4 beschrieben. Auch hier diente Parthenolid als Positivkontrolle. Der Extrakt, S1, S2 und S3 wurden dreifach in Duplikaten, die Fraktionen F1-F8 zweifach in Duplikaten getestet.

### 2.3.5 Statistik

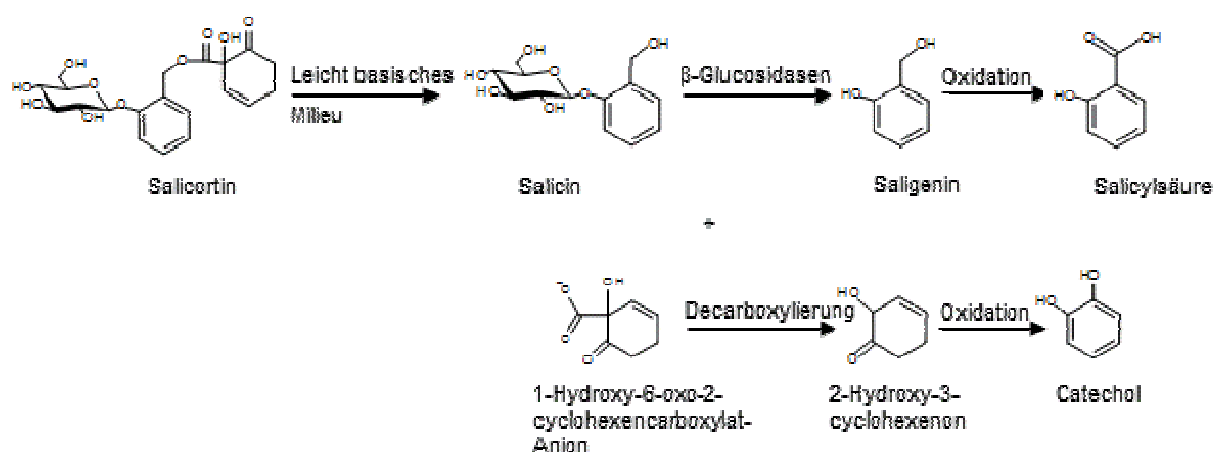
Für die statistische Auswertung wurde IBM SPSS Statistics 20 von IBM Deutschland GmbH (Ehningen, Deutschland) verwendet. Es wurde auf Mittelwertgleichheit im t-Test zweier unabhängiger Stichproben getestet.



### 3. Entzündungshemmende Eigenschaften von Salicortin und Tremulacin *in vitro* sowie ihre Stabilitätskontrolle unter Zellkulturbedingungen

#### 3.1 Hintergrund der *in vitro* Testungen

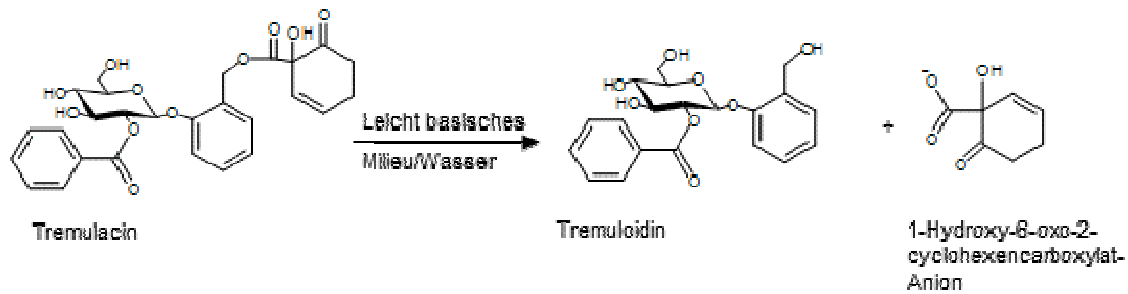
In Kapitel 3 sollte die *in vitro* Aktivität von den in Kapitel 2 isolierten Substanzen Salicortin und Tremulacin untersucht werden. Sie wurden in zwei Zellkulturassays untersucht, dem ICAM-1 Assay sowie dem MTT Assay. Erläuterungen zu diesen beiden Assays sind unter 3.1.1-3.1.3 zu finden. Außerdem wurde die Stabilität dieser beiden Substanzen unter Assay-Bedingungen untersucht. Der Grund für diese Stabilitätsuntersuchung war die von Ruuhola et al. [29] beschriebene Beobachtung, dass Salicortin und andere Substanzen aus der Weide mit einer 1-Hydroxy-6-oxo-2-cyclohexencarbonsäureester-Partialstruktur bei alkalischem pH-Wert über eine Hydrolyse der Esterbindung zunächst teilweise zum 1-Hydroxy-6-oxo-2-cyclohexencarboxylat-Anion abgebaut werden. Dieses Anion wird weiter decarboxyliert zum 2-Hydroxy-3-cyclohexenon, welches zur Oxidation und Aromatisierung zu Catechol neigt. Des Weiteren wurde schon für verschiedene Salicylalkoholderivate beschrieben, dass sie nach Abbau zu Salicin im menschlichen oder auch tierischen Körper weiter zu Saligenin mit Hilfe der  $\beta$ -Glucosidasen der Darmflora dekonjugiert und nachfolgend durch vermutlich in der Leber ablaufende Oxidation zur Salicylsäure metabolisiert werden [54]. Abbildung 3.1-1 zeigt diesen Abbau schematisch.



**Abb. 3.1-1:** Schematischer Abbau von Salicortin zu Catechol und Salicylsäure im basischen Milieu nach Ruuhola et al. [29] und Steinegger und Hövel [54].

Dieser speziell für Salicortin gezeigte Abbau ist natürlich auch für Tremulacin möglich. In Kapitel 2 wurde bereits gezeigt, dass Tremulacin schon im neutralen, wässrigen Milieu zur

Instabilität neigt. Auch Ruuhola et al. [29] beschrieben die Instabilität von Tremulacin. Tremulacin könnte mit dem Abbau zu Tremuloidin und 1-Hydroxy-6-oxo-2-cyclohexencarboxylat-Anion und der weiteren Degradation des Letzteren ebenfalls Catechol liefern (s. Abb. 3.1-2).



**Abb. 3.1-2:** Schematischer Abbau von Tremulacin zu Tremuloidin und dem 1-Hydroxy-6-oxo-2-cyclohexencarboxylat-Anion, welches wie in Abb. 3.1-1 zu Catechol weiter reagieren kann.

Ob dieser Abbau beider Substanzen zu Catechol auch unter Assay-Bedingungen des ICAM-1 Assays zu beobachten ist, wird unter anderem in Kapitel 3 beschrieben.

### 3.1.1 Involvierung von ICAM-1 in Entzündungsmechanismen

Im Körper ablaufende Entzündungsmechanismen sind äußerst komplex. Sehr oft spielt bei physiologischen Entzündungsprozessen der Kernfaktor NF- $\kappa$ B (nukleärer Faktor kappa B) eine Schlüsselrolle. Am häufigsten kommt NF- $\kappa$ B als Heterodimer bestehend aus einer p50 und einer p65 Untereinheit vor. Dieses Heterodimer liegt im Zytoplasma normalerweise in einer inaktiven Form durch Bindung an das regulatorische (inhibierende) Protein I $\kappa$ B vor. NF- $\kappa$ B kann durch die IKK (I $\kappa$ B-Kinase) vermittelte Phosphorylierung von I $\kappa$ B aktiviert werden. Durch die Phosphorylierung kann das Heterodimer aus dem Komplex heraustreten und in den Zellkern eindringen, wo es durch Bindung an Gensequenzen die Transkription proinflammatorischer Zytokine wie TNF- $\alpha$ , IL(Interleukin)-1 $\beta$ , IL-6 und IL-8 sowie von Zelladhäsionsmolekülen wie E-Selektin, ICAM-1 (interzelluläres Adhäsionsmolekül 1) und VCAM-1 veranlassen kann. Die Transkription von ICAM-1 wird in Endothelzellen durch die p65 Untereinheit vermittelt [78].

In physiologischen Entzündungsprozessen sollen die sich im Gewebe befindlichen und störenden Mikroorganismen oder andere Noxen durch die Infiltration von Leukozyten in das Gewebe lokalisiert, bekämpft und zerstört werden [79]. Um eine Migration der Leukozyten in das betroffene Gewebe zu gewährleisten, werden die Leukozyten durch Selektine wie das von Endothelzellen im Entzündungsfall exprimierte E-Selektin oder auch durch P-Selektin zunächst locker gebunden. Sie bewegen sich in der Folge nur noch langsam am Endothel („rolling“) von einer zu der nächsten lockeren Bindung vorbei [79, 80]. Durch nachfolgende



Zytokin-vermittelte Aktivierung der Leukozyten geht die vorher lockere, Selektin-vermittelte Bindung in eine feste, durch nun Integrin-vermittelte Bindung an die Endothelzellen über. Die von den Leukozyten durch Aktivierung exprimierten Integrine binden hierbei fest an die dazugehörigen Rezeptoren auf den Endothelzellen aus der Immunglobulinfamilie wie die Adhäsionsmoleküle ICAM, VCAM-1 oder an Rezeptoren wie RAGE (receptor of advanced glycation endproducts) [81]. ICAM-1 und ICAM-2 werden vom Endothel gebildet und binden an  $\beta$ 2-Integrine, ihre Produktion wird wiederum von IL-1, TNF- $\alpha$  oder Endotoxinen stimuliert [79]. Die folgende Migration der Leukozyten in das Gewebe wird Diapedese genannt und kann entweder para- (zwischen den Endothelzellen) oder transzellulär (durch die Endothelzellen hindurch) stattfinden. Neben der Beteiligung an der festen Bindung der Leukozyten an die Endothelzellen spielt ICAM-1 auch eine unterstützende Rolle bei der transzellulären Migration [80, 81].

Außer den durch Infektion oder Verletzung hervorgerufenen physiologisch wichtigen Entzündungsprozessen, gibt es chronisch entzündliche Erkrankungen wie die der rheumatoiden Arthritis. Diese chronischen Entzündungen haben ein zerstörerisches Potential auf das betroffene Gewebe und meist keine offensichtliche Ursache [79]. In diesem Fall erfüllt die Entzündung also keine Funktion, sondern es handelt sich vielmehr um eine Autoimmunerkrankung mit einer erhöhten Produktion von Entzündungsmediatoren durch die das betroffene Gewebe in Mitleidenschaft gezogen wird [82]. Den Zusammenhang zwischen entzündeten Knorpelgewebe bei Patienten mit rheumatoider Arthritis und einer pathologisch erhöhten ICAM-1 Expression zeigten Davies et al. [82]. Hier wurde vor einer Hüft- oder Kniegelenkserneuerung der geschädigte, entzündete Knorpel entnommen und nach Immunfärbung die Anwesenheit von ICAM-1 an den geschädigten Chondrozyten nachgewiesen. An gesunden, nicht geschädigten Chondrozyten wurde ICAM-1 nicht exprimiert. Des Weiteren konnte die Anwesenheit von IL-1 und TNF- $\alpha$  in Gelenkflüssigkeiten von Patienten mit rheumatoider Arthritis gezeigt werden [83]. ICAM-1 Expression kann durch TNF- $\alpha$ - oder IL-1-vermittelte Aktivierung von NF- $\kappa$ B stimuliert werden. TNF- $\alpha$  aktiviert hierbei NF- $\kappa$ B durch Aktivierung der IKK, wodurch die Dissoziation der p65- und der p50-Untereinheit von I $\kappa$ B veranlasst wird [84]. Dies hat wie oben beschrieben die Transkription verschiedener Entzündungsmediatoren wie TNF- $\alpha$ , verschiedener Interleukine oder eben ICAM-1 zur Folge.

TNF- $\alpha$  spielt eine wichtige Rolle in chronisch entzündlichen Erkrankungen. Beispielsweise konnte in einem Modell mit Kollagen induzierter Arthritis bei Mäusen die Schwellung der Pfoten durch Gabe eines TNF- $\alpha$ -Antikörpers gemildert werden [85].

Zusammengefasst bedeutet dies, dass beim Entzündungsprozess das Zelladhäsionsmolekül ICAM-1 eine wichtige Rolle spielt. ICAM-1 vermittelt die feste Leukozytenadhäsion am Endothel und ermöglicht die Leukozyteninvasion in das entzündete Gewebe. Eine zentrale Rolle in der Entzündung spielen das Zytokin TNF- $\alpha$  und der Kernfaktor NF- $\kappa$ B. Dieser kann von

TNF- $\alpha$  aktiviert werden kann, was unter anderem eine Transkription von ICAM-1 zur Folge hat. Die Überexpression von Zytokinen und Zelladhäsionsmolekülen in chronisch entzündlichen Erkrankungen ist das Kernproblem bei diesen Leiden und verursacht durch einhergehende Leukozyteninfiltration bei rheumatischen Erkrankungen auf Dauer die Zerstörung des Gelenkknorpels. Die *in vitro* Forschung an Hemmstoffen der TNF- $\alpha$  induzierten ICAM-1-Expression an Endothelzellen (HMEC-1) bietet somit einen ersten Ansatz zur Ermittlung potentiell antiinflammatorischer Wirkstoffe.

### 3.1.2 ICAM-1 Assay als Entzündungsmodell *in vitro*

Im ICAM-1 Assay wird ein Teil eines physiologischen Entzündungsprozesses *in vitro* simuliert. Durch die Zugabe des Zytokins TNF- $\alpha$  zu Endothelzellen wird die Expression von ICAM-1 in diesen Zellen stimuliert, ähnlich wie auch in entzündetem Gewebe die ICAM-1 Produktion durch TNF- $\alpha$ -induzierte NF- $\kappa$ B-Aktivierung hervorgerufen wird (s. 3.1.1). Es handelt sich bei dem vorliegenden Assay natürlich nicht um eine echte Entzündungsreaktion, da diese nur *in vivo* durch komplexes Zusammenspiel mehrerer Faktoren entstehen kann und durch die charakteristischen Kardinalsymptome nach Celsus wie Schwellung (Tumor), Rötung (Rubor), Schmerz (Dolor), Funktionseinschränkungen (Functio laesa) und Hitzeentwicklung (Calor) gekennzeichnet ist [86]. Allerdings spielt die ICAM-1-Expression eine wichtige Rolle bei Entzündungen (s. 3.1.1).

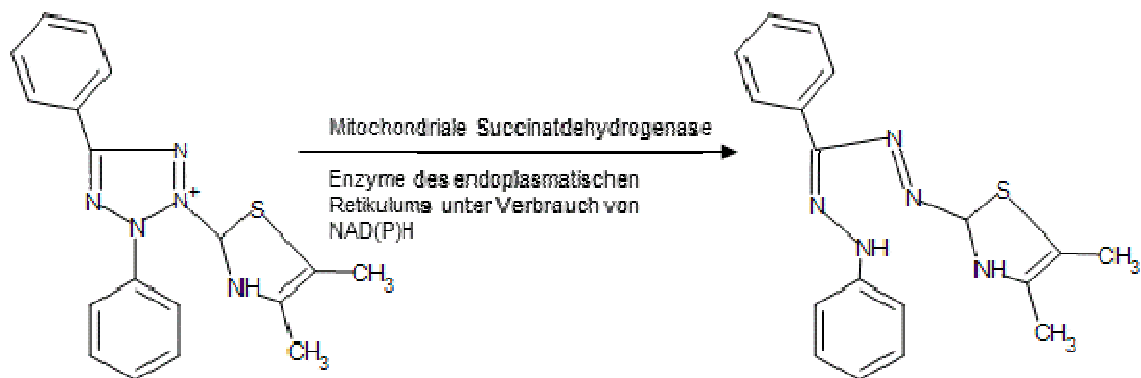
Die etablierte Methode zur durchflussscytometrischen Bestimmung der TNF- $\alpha$  induzierten E-Selektin-Expression in HUVEC-Zellen (human umbilica vein endothelial cells) [87] wurde für die durchflussscytometrischen Bestimmung der TNF- $\alpha$  induzierten ICAM-1-Expression in HMEC-1-Zellen modifiziert [88]. In beiden Assays wird die durchflussscytometrische Bestimmung durch die Zugabe eines FITC (Fluorescein-Isothiocyanat)-markierten Antikörpers gegen ICAM-1 bzw. E-Selektin ermöglicht. Die Assays unterscheiden sich in den Inkubationszeiten mit den Testsubstanzen und mit TNF- $\alpha$  sowie im verwendeten Zelltypus. Verwendet werden im hier beschriebenen Testsystem humane, mikrovaskuläre Endothelzellen (HMEC-1), welche durch Plasmid-vermittelte Virusgentransfektion immortalisiert wurden [89].

Auf einen konfluent gewachsenen Zellrasen werden zunächst die Testsubstanzen gegeben. Nach einer halben Stunde Inkubationszeit erfolgt die Stimulation mit TNF- $\alpha$  und eine weitere Inkubation von 24 Stunden. Danach werden die Zellen durch Formalin fixiert und exprimiertes ICAM-1 durch Zugabe eines FITC-markierten Antikörpers kenntlich gemacht. Die Fluoreszenzintensität der Zellen wird nachfolgend mittels eines Durchflussscytometers (FACS, fluorescence activated cell sorting) bestimmt und ist direkt proportional zu der exprimierten Menge an ICAM-1. Ausschließlich mit TNF- $\alpha$  behandelte HMEC-1-Zellen werden zur Be-

rechnung der ICAM-1 Expression von 100% verwendet. Kontrollzellen ohne TNF- $\alpha$ -Behandlung werden zur Ermittlung der natürlichen ICAM-1 Expression der HMEC-1-Zellen und Kontrollzellen mit Parthenolid- sowie TNF- $\alpha$ -Behandlung werden zur Funktionskontrolle des Assays mitgeführt. Da das Sesquiterpenlacton Parthenolid als Hemmstoff der I $\kappa$ B-Phosphorylierung und damit auch der TNF- $\alpha$  induzierten ICAM-1-Expression bereits beschrieben wurde, ist es als Kontrollsubstanz geeignet [90]. Die Positivkontrolle Parthenolid wurde anfangs noch in einer Konzentration von 10  $\mu$ M, später in einer Konzentration von 5  $\mu$ M mitgeführt. Es stellte sich mit der Erfahrung heraus, dass 5  $\mu$ M Parthenolid noch ausreichend aktiv waren und diese Konzentration für die Zellen besser geeignet ist, da der cytotoxische Effekt der Verbindung weniger zum Tragen kommt.

### 3.1.3 MTT Assay als Cytotoxizitätsmodell

Als Modell für die Cytotoxizität der getesteten Substanzen wurde der 1983 von Tim Mosmann entwickelte Assay mit dem Tetrazoliumsalz MTT (3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazoliumbromid) unter leichter Modifikation verwendet [91]. Der Tetrazolring wird durch die Succinatdehydrogenase der Mitochondrien und Enzymen des endoplasmatischen Retikulums mit NADH oder NADPH als Cofaktor der lebenden Zellen reduktiv geöffnet [92], wodurch es zu einer Farbvertiefung von gelb zu blau durch Bildung eines Formazans mit stark konjugiertem Elektronensystem kommt (s. Abb. 3.1.3)



**Abb. 3.1.3:** Reduktion und Farbvertiefung des Tetrazoliumsalzes MTT (gelb) zu einem Formazan (tiefblau) durch Enzyme des endoplasmatischen Retikulums oder der Mitochondrien.

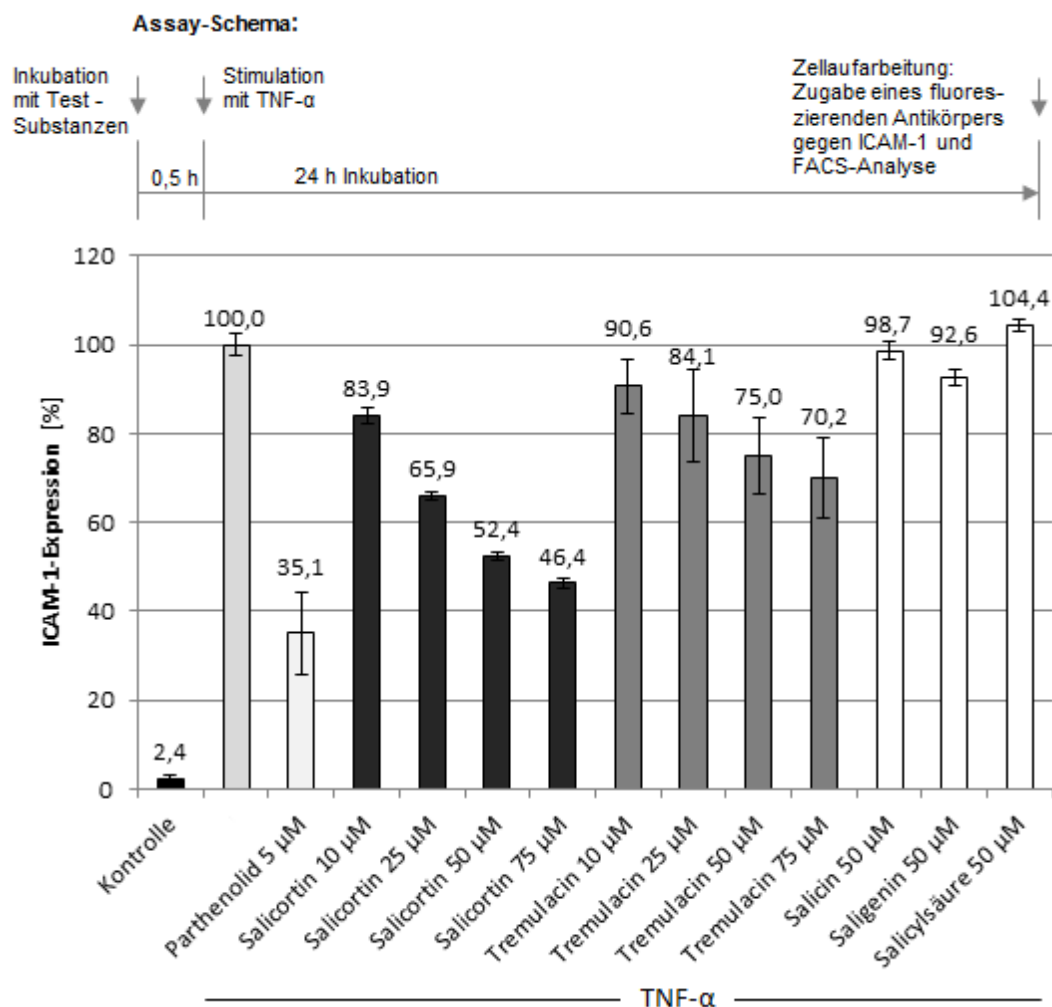
Je nach Viabilität der Zellen ist die Blaufärbung dabei unterschiedlich stark, da tote Zellen ohne funktionierende Mitochondrien oder endoplasmatisches Retikulum keine Reduktion zum blauen Formazan verursachen. Die Intensität der Blaufärbung gibt also die Viabilität der Zellen wieder. Substanzen, welche die Viabilität der Endothelzellen beeinflussen, könnten auch einen Einfluss auf die ICAM-1-Expression haben. Um diesen Einfluss auszuschließen,

wurden die Substanzen in beiden Assays getestet. Idealerweise sollten Substanzen in dem Konzentrationsbereich, in welchem sie aktiv sind, keinen Einfluss auf die Viabilität der Zellen zeigen. Selbstverständlich wurde hier mit den HMEC-1-Zellen der gleiche Zelltyp verwendet wie im ICAM-1 Assay (s. 3.1.2). Auch hier wachsen die Zellen zunächst konfluent an und die zu testende Substanz wird 24 Stunden mit den Zellen inkubiert. Es folgt die Zugabe des in Zellkulturmedium gelösten 3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazoliumbromids und eine weitere Inkubation von 3 Stunden. Die Zellen haben nun das Tetrazoliumsalz zu Formazan, das nicht mehr wasserlöslich ist, umgesetzt. Es befindet sich damit in den Zellen oder kristallisiert aus ihnen heraus. Die Zellen werden durch eine Tensid-haltige Lösung, welche auch das Formazan nachfolgend lösen kann, lysiert. Die Vermessung der Blaufärbung der Lösung erfolgt photometrisch bei 560 nm mit Hilfe eines Plattenlesers, da die Versuche in 96-well Zellkulturplatten durchgeführt werden.

## 3.2 Ergebnisse und Diskussion

### 3.2.1 Aktivität von Salicortin und Tremulacin im ICAM-1 Assay

Salicortin und Tremulacin wurden in vier unterschiedlichen Konzentrationen mit 10, 25, 50 und 75  $\mu\text{M}$  im ICAM-1 Assay getestet. Dabei zeigte sich, dass beide Substanzen in diesem Assay aktiv waren und die TNF- $\alpha$  induzierte ICAM-1 Expression konzentrationsabhängig hemmten (s. Abb. 3.2.1). Salicortin war dabei deutlich aktiver. 50  $\mu\text{M}$  Salicortin reduzierten die ICAM-1-Expression auf 52,4%, Tremulacin in gleicher Konzentration auf 75,0%. Es ist für Salicylalkoholderivate wie Salicortin oder Tremulacin beschrieben worden, dass sie nach oraler Aufnahme zunächst im Darm zu Salicin hydrolisiert und nachfolgend enzymatisch zu Saligenin gespalten werden. Saligenin wiederum wird rasch zu Salicylsäure oxidiert [52, 54], s. 3.1. Um herauszufinden, ob die Aktivität von Salicortin und Tremulacin im ICAM-1 Assay auf ihre bereits beschriebenen Metabolite zurückzuführen sein könnte, wurden Salicin, Saligenin und Salicylsäure in einer Konzentration von 50  $\mu\text{M}$  ebenfalls in diesem Assay getestet. Dabei stellte sich heraus, dass diese Substanzen einen sehr geringen bis gar keinen Einfluss auf die TNF- $\alpha$  induzierte ICAM-1-Expression hatten. Somit waren diese Metabolite, sofern sie überhaupt unter Zellkulturbedingungen entstehen können, nicht an der Aktivität von Tremulacin und Salicortin im ICAM-1 Assay beteiligt.



**Abb. 3.2.1:** ICAM-1-Expression nach TNF-α Stimulation und 24 h Inkubation mit unterschiedlichen Salicortin- und Tremulacin-Konzentrationen sowie mit 50 µM Salicin, Saligenin und Salicylsäure; Parthenolid diente als Positivkontrolle; nur mit TNF-α behandelte Zellen dienten der Ermittlung von 100% ICAM-1-Expression; n = 3 in Duplikaten; Mittelwert ± StabW.

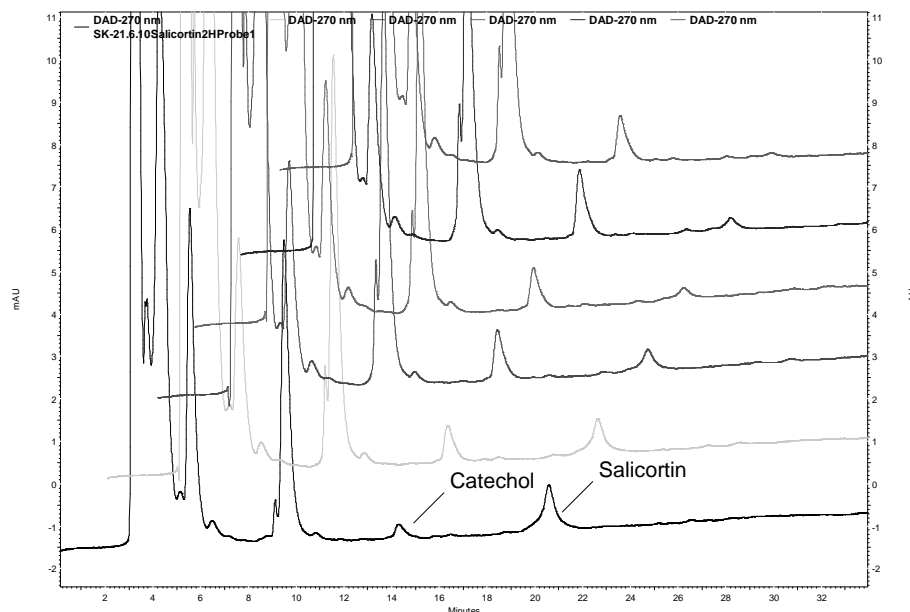
Im ICAM-1 Assay wird ein Teil einer physiologischen Entzündungsreaktion *in vitro* simuliert. Die partielle Hemmung der TNF-α induzierten ICAM-1-Expression durch Tremulacin und Salicortin ließ vermuten, dass diese Substanzen an der entzündungshemmenden Wirkung der Weidenrinde beteiligt sind. Die vorliegenden Ergebnisse zeigen auch, dass hierbei die Aktivität dieser beiden Substanzen nicht auf das häufig postulierte Wirkprinzip dieser Salicylalkoholderivate, der Salicylsäure, zurückzuführen war.

### 3.2.2 Stabilitätskontrolle von Salicortin und Tremulacin unter Zellkulturbedingungen

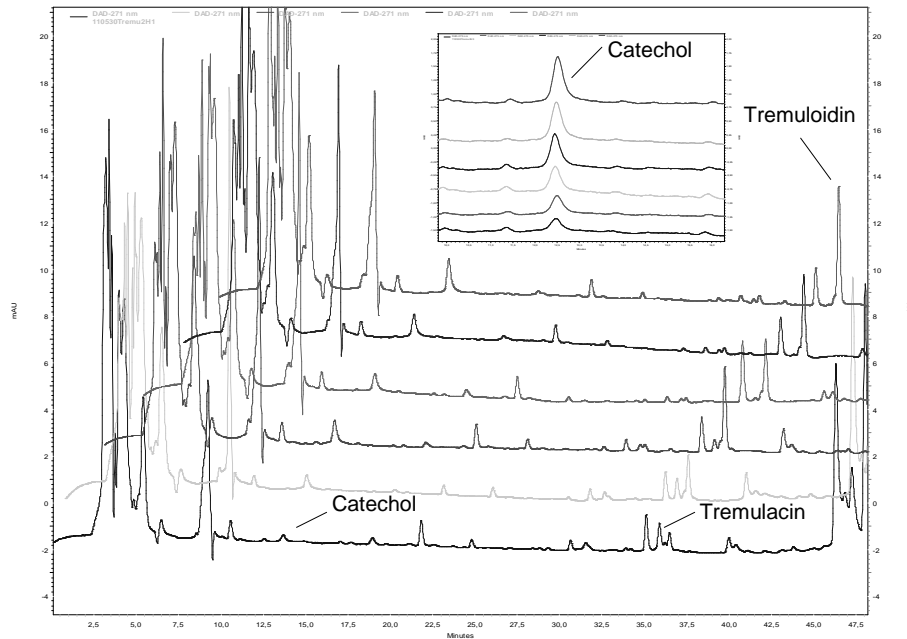
Salicortin und Tremulacin gehören mit ihrer 1-Hydroxy-6-oxo-2-cyclohexencarbonsäureester-Partialstruktur zu den labilen Salicylalkoholderivaten der Weidenrinde. Ruuhola et al. [29] zeigten, dass Salicortin und Tremulacin in neutralem Milieu bereits leicht instabil, in leicht alkalischem Milieu aber völlig instabil sind. Für Salicortin konnte gezeigt werden, dass es

über das 1-Hydroxy-6-oxo-2-cyclohexencarboxylat-Anion zum Catechol degradiert [29], s. 3.1. Mit der Stabilitätskontrolle von Salicortin und Tremulacin sollte nun herausgefunden werden, ob sich dieser für Salicortin beschriebene Abbau zu Catechol auch unter ICAM-1-Assay-Bedingungen in Zellkulturmedium bei Salicortin und Tremulacin ereignet. Da Catechol als entzündungshemmende Substanz beschrieben wurde [93, 94], s. Kapitel 4 (unter 4.1) und Kapitel 6 (unter 6.2.3), war dies von besonderem Interesse. Catechol als aktives Abbauprodukt dieser 1-Hydroxy-6-oxo-2-cyclohexencarbonsäureester-Partialstruktur tragenden Moleküle könnte damit ein mögliches Wirkprinzip darstellen.

Um dies herauszufinden, wurden beide isolierten Substanzen (s. Kapitel 2) analog zu den Assaybedingungen 24 Stunden in Zellkulturmedium inkubiert und nach definierten Zeitpunkten Proben genommen. Nach Fällung der Proteine mit Methanol wurden in der filtrierten, überstehenden Lösung Catechol sowie Salicortin oder Tremulacin mit HPLC-DAD quantifiziert. Die Abbildungen 3.2.2-1 und 3.2.2-2 zeigen Ausschnitte aus Chromatogrammen der HPLC-Läufe, mit denen Catechol, Salicortin und Tremulacin in den jeweiligen Proben quantifiziert wurden. In beiden Abbildungen ist die Abnahme des Salicortin- bzw. des Tremulacin-peaks und die deutliche Zunahme des Catecholpeaks zu beobachten.



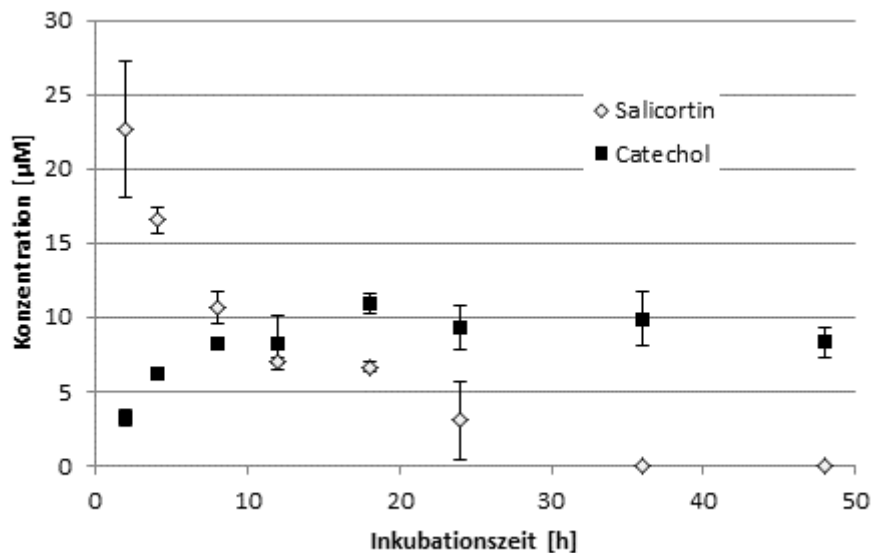
**Abb. 3.2.2-1:** Ausschnitte aus HPLC-Chromatogrammen der Stabilitätskontrolle von Salicortin in Zellkulturmedium bei 37 °C von Stunde 2, 4, 8, 12, 18 und 24 (von unten nach oben), aufgenommen bei 270 nm. Markiert sind der zunehmende Catechol- und der abnehmende Salicortinpeak.



**Abb. 3.2.2-2:** Ausschnitte aus HPLC-Chromatogrammen der Stabilitätskontrolle von Tremulacin in Zellkulturmedium bei 37 °C von Stunde 2, 4, 8, 12, 18 und 24 (von unten nach oben) bei 271 nm sowie bei 275 nm (kleiner Kasten). Markiert sind der zunehmende Catechol- und Tremuloidinpeak sowie der abnehmende Tremulacinpeak.

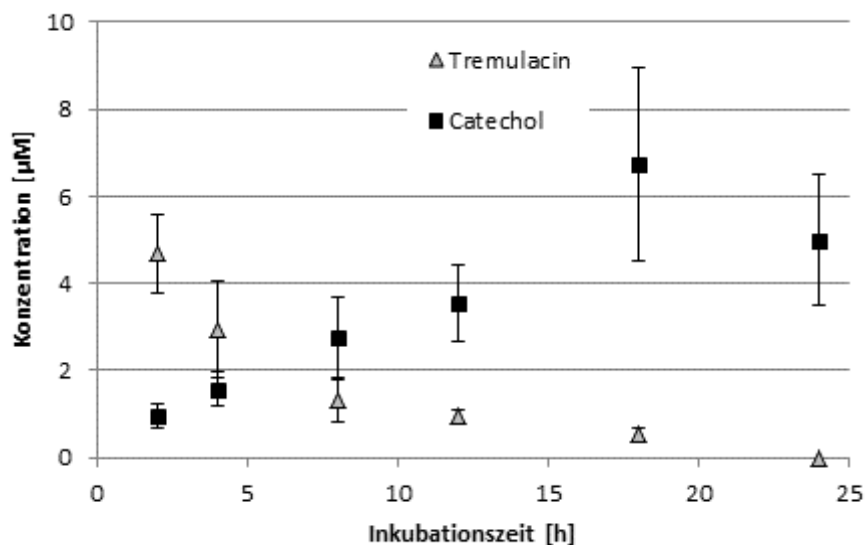
Interessanterweise konnte bei der Stabilitätskontrolle von Tremulacin in den Chromatogrammen die merkliche Zunahme eines weiteren Peaks im Verlauf der 24 Stunden beobachtet werden. Nach der massenspektrometrischen Analyse dieses Peak, konnte die Masse dieses Signals als diejenige von Tremuloidin identifiziert werden ( $[M+COO]^-$   $m/z$  435). Während der Inkubation in Zellkulturmedium wurde demnach durch die Abspaltung des 1-Hydroxy-6-oxo-2-cyclohexencarboxylat-Anions Tremulacin zu Tremuloidin abgebaut und das abgespaltene Anion zu Catechol decarboxyliert und oxidiert.

Auch die Abb. 3.2.2-3 macht deutlich, dass Salicortin über 24 Stunden Inkubation im Zellkulturmedium nicht stabil ist. Die Konzentration von Salicortin nahm im Verlauf von 24 Stunden von 25  $\mu$ M (100%) auf  $3,07 \pm 2,66$   $\mu$ M ( $12,3\% \pm 10,6\%$ ) ab. Bei Salicortin wurden noch zwei weitere Messpunkte nach 36 und 48 Stunden hinzugezogen. Nach 36 Stunden war kein Salicortin mehr zu detektieren. Catechol war bereits beim ersten Messpunkt nach 2 Stunden Inkubation mit einer Konzentration von  $3,22$   $\mu$ M  $\pm 0,57$   $\mu$ M detektierbar. Die Catecholkonzentration stieg bis zum Zeitpunkt von 8 Stunden weiter an, dann blieb sie einigermaßen konstant und pendelte sich über den weiteren Zeitverlauf bei ca. 10  $\mu$ M ein.



**Abb. 3.2.2-3:** Abbau von Salicortin zu Catechol während 48 Stunden Inkubation in Zellkulturmedium bei 37 °C. Maximale Salicortinkonzentration = 25 µM; n = 3; Mittelwert ± StabW.

Auch bei der Stabilitätskontrolle von Tremulacin war bereits beim ersten Zeitpunkt eine Catecholkonzentration von  $0,94 \mu\text{M} \pm 0,27 \mu\text{M}$  messbar (s. Abb. 3.2.2-4). Insgesamt stieg hier im Verlauf von 24 Stunden die Catecholkonzentration jedoch nicht so stark an wie es bei Salicortin der Fall war. Maximal wurden  $6,74 \mu\text{M} \pm 2,24 \mu\text{M}$  Catechol bestimmt.



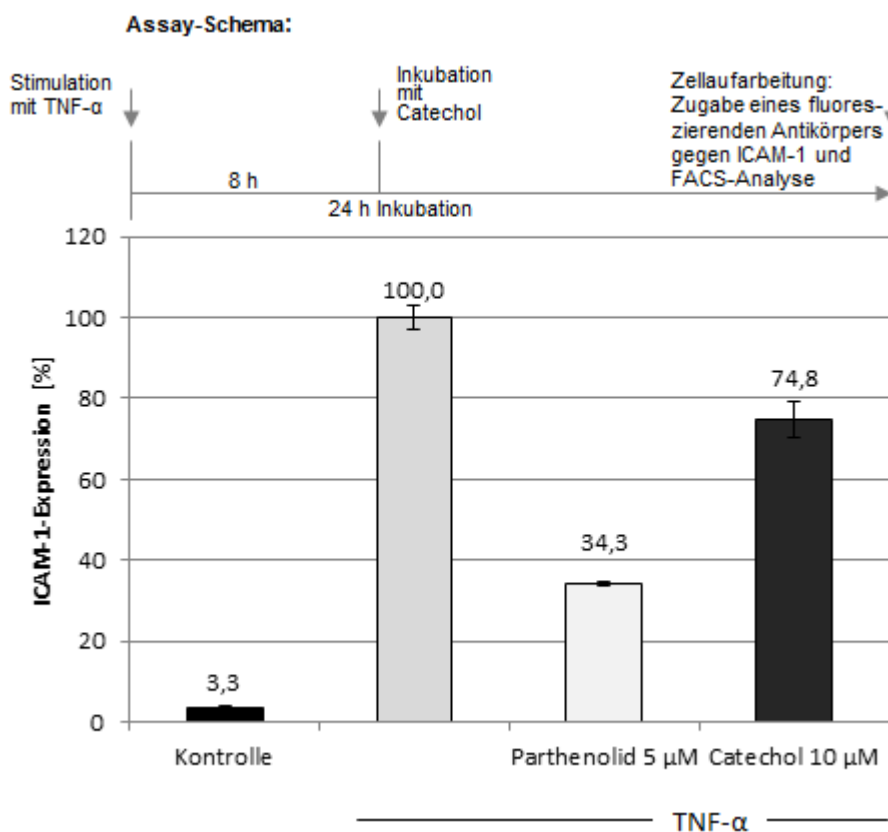
**Abb. 3.2.2-4:** Abbau von Tremulacin zu Catechol während 24 Stunden Inkubation in Zellkulturmedium bei 37°C. Maximale Tremulacinkonzentration = 25 µM; n = 3; Mittelwert ± StabW.

Tremulacin war im Zellkulturmedium instabiler als Salicortin, schon nach 2 Stunden Inkubation waren im Mittel nur noch 18,8% der anfangs 25 mikromolaren Lösung übrig. Die Konzentration sank über 24 Stunden stetig. Nach 24 Stunden war bereits kein Tremulacin mehr in der Lösung vorhanden.



### 3.2.3 Aktivität von Catechol im modifizierten ICAM-1 Assay

Die Ergebnisse aus den Stabilitätsuntersuchungen zeigten, dass weder Salicortin noch Tremulacin unter ICAM-1-Assay-Bedingungen stabil sind. Sie wurden teilweise zu Catechol abgebaut. Da Catechol entzündungshemmende Eigenschaften besitzt, ergibt sich die Frage, ob Catechol das wirksame Prinzip von Tremulacin und Salicortin im ICAM-1 Assay ist. Um dieser Frage nachzugehen, wurde der ICAM-1 Assay modifiziert. Die Stabilitätskontrolle von Salicortin zeigte, dass nach 8 Stunden im Zellkulturmedium ca. 10  $\mu\text{M}$  Catechol aus 25  $\mu\text{M}$  Salicortin entstanden waren und die Konzentration von Catechol über die verbleibende Zeit annähernd konstant blieb. Daher wurde der ICAM-1 Assay so geändert, dass auf konfluente HMEC-Zellen zunächst TNF- $\alpha$  zur ICAM-1-Stimulation gegeben wurde und erst 8 Stunden später 10  $\mu\text{M}$  Catechol. 24 Stunden nach TNF- $\alpha$ -Zugabe wurden die Zellen wie gewohnt aufgearbeitet. Mit dieser ICAM-1 Assay-Modifikation sollte der Abbau von Salicortin zu Catechol besser simuliert werden.



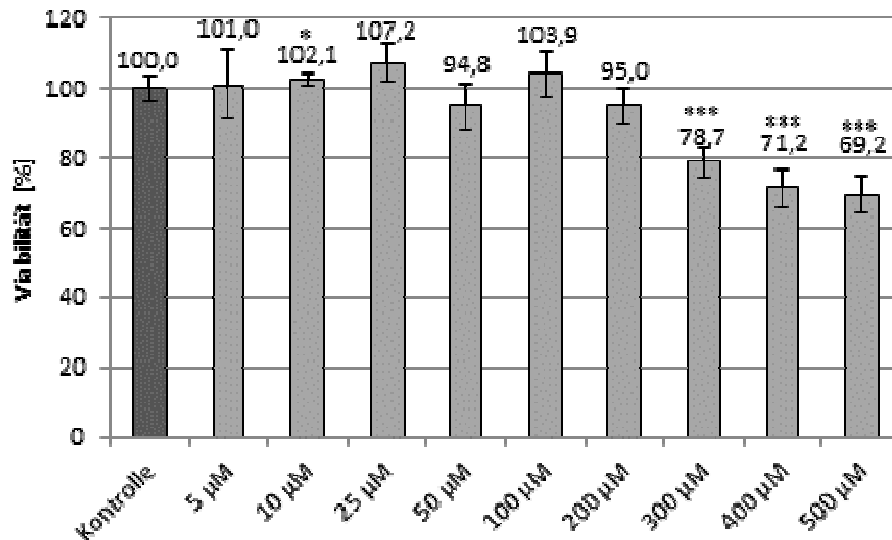
**Abb. 3.2.3:** ICAM-1-Expression nach 24 h Inkubation mit TNF- $\alpha$  und 16 h Inkubation mit 10  $\mu\text{M}$  Catechol; Parthenolid diente als Positivkontrolle; nur mit TNF- $\alpha$  behandelte Zellen dienen der Ermittlung von 100% ICAM-1-Expression; n = 3 in Duplikaten; Mittelwert  $\pm$  StabW.

Abb. 3.2.3 zeigt, dass 10  $\mu\text{M}$  Catechol nach 16 Stunden die ICAM-1-Expression auf 74,8%  $\pm$  4,3% senkten. Da diese Menge Catechol aus 25  $\mu\text{M}$  Salicortin freigesetzt wurde, wurde nun dieses Ergebnis mit der Aktivität von 25  $\mu\text{M}$  Salicortin im ICAM-1 Assay verglichen. 25  $\mu\text{M}$  Salicortin senkten die TNF- $\alpha$  induzierte ICAM-1-Expression auf 65,9%  $\pm$  4,5% (s. Kap. 3.2.1).

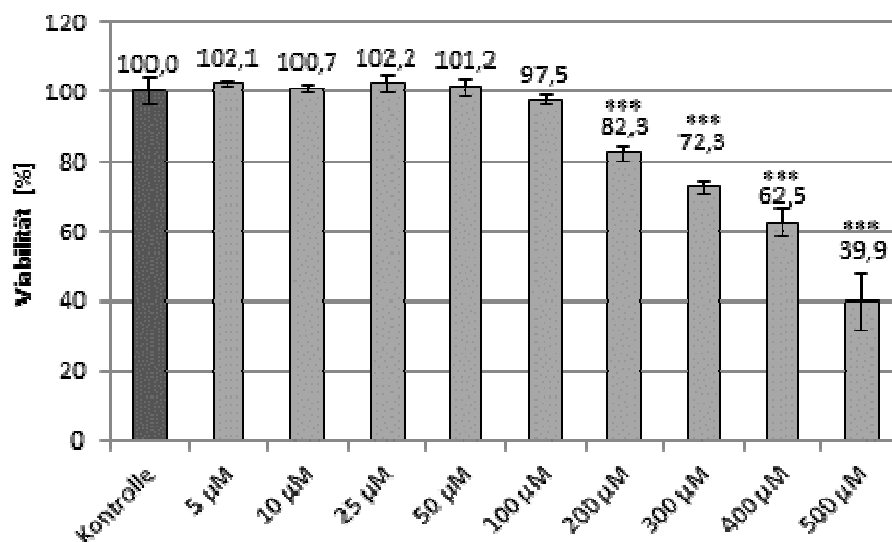
Dies ist ein Wert, der im vergleichbaren Bereich zur Aktivität von 10  $\mu\text{M}$  Catechol nach 16-stündiger Inkubation liegt. Offensichtlich erschienen diese Werte jedoch nicht völlig gleich. Da die Freisetzung von Catechol aus Salicortin allerdings ein dynamischer Prozess ist, durften diese Werte als gut vergleichbar betrachtet werden. Statistisch konnte kein signifikanter Unterschied zwischen der ICAM-1-Expressions-Hemmung von 25  $\mu\text{M}$  Salicortin nach 24-stündiger Inkubation und der ICAM-1-Expressions-Hemmung von 10  $\mu\text{M}$  Catechol nach 16-stündiger Inkubation festgestellt werden ( $p > 0,05$ ). Das legt nahe, dass nicht Salicortin selbst, sondern sein Abbauprodukt Catechol für die Aktivität im ICAM-1 Assay verantwortlich ist. Gleiches gilt auch für Tremulacin. Aus der gleichen Stoffmenge von Tremulacin (25  $\mu\text{M}$ ) entstand weniger Catechol, entsprechend war Tremulacin auch weniger aktiv im ICAM-1 Assay. Dies bestätigt die Vermutung, dass Catechol für den ICAM-1 Assay das entzündungshemmende Prinzip von Salicortin und Tremulacin und damit vermutlich allgemein von Strukturen mit einer 1-Hydroxy-6-oxo-2-cyclohexencarbonsäureester-Partialstruktur *in vitro* darstellt.

#### 3.2.4 Cytotoxizitäts (MTT)-Assay mit Salicortin, Tremulacin und Catechol

Salicortin, Tremulacin und Catechol waren aktiv im ICAM-1 Assay und konnten die TNF- $\alpha$  induzierte ICAM-1-Expression in unterschiedlichem Ausmaß hemmen. Dabei stellte sich heraus, dass Catechol als ein Abbauprodukt von Salicortin und Tremulacin für diese antiphlogistische Wirkung im ICAM-1 Assay verantwortlich ist. Daher wurden alle drei Substanzen auf ihre Cytotoxizität im MTT-Assay mit HMEC-Zellen untersucht, um eine gleichzeitige cytotoxische Wirkung dieser drei Substanzen auf die verwendeten Zellen ausschließen zu können. Es wurden jeweils neun verschiedene Konzentrationen zwischen 5 und 500  $\mu\text{M}$  getestet. Der auch im ICAM-1 Assay getestete Konzentrationsbereich von Tremulacin und Salicortin zwischen 10 und 100  $\mu\text{M}$  zeigte im MTT-Assay keine negative Auswirkung auf die Viabilität der Zellen (s. Abb. 3.2.4-1 und Abb. 3.2.4-2). Somit ist der interessante Konzentrationsbereich dieser beiden Testsubstanzen unkritisch und nicht cytotoxisch für Endothelzellen. Salicortin wirkte sich erst ab 300  $\mu\text{M}$ , Tremulacin ab 200  $\mu\text{M}$  negativ auf die Viabilität der HMEC-Zellen aus. Damit kommt eine cytotoxische Wirkung beider Substanzen erst in höheren, nicht im Entzündungsmodell getesteten Konzentrationen zu tragen.

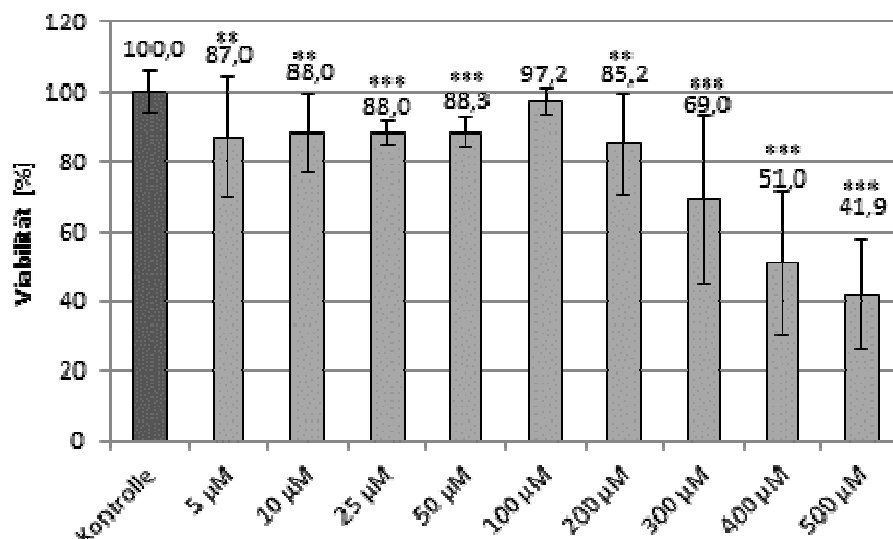


**Abb.3.2.4-1:** MTT-Assay mit HMEC-Zellen, die mit Lösungen von Salicortin in ECGM (Nährmedium) von 5 bis 500 µM versetzt wurden; Kontrollzellen nur mit ECGM dienten der Ermittlung von 100% Viabilität; \*p < 0,05 und \*\*\* p < 0,001 gegenüber Kontrollzellen; n = 3 in Hexaplikaten.



**Abb. 3.2.4-2:** MTT-Assay mit HMEC-Zellen, die mit Lösungen von Tremulacin in ECGM (Nährmedium) von 5 bis 500 µM versetzt wurden; Kontrollzellen nur mit ECGM dienten der Ermittlung von 100% Viabilität; \*\*\*p < 0,001 gegenüber Kontrollzellen; n = 3 in Hexaplikaten.

Bei Catechol war ab einer Konzentration von 5 µM ein geringfügiger, nicht dosisabhängiger aber signifikanter Unterschied der Viabilität der Zellen gegenüber den Kontrollzellen zu beobachten (s. Abb. 3.2.4-3). Die Viabilität wurde hier jedoch nicht stark eingeschränkt und schwankte zwischen 5 und 100 µM im Bereich um ca. 90%. Erst ab einer Konzentration von 200 µM konnte eine dosisabhängige Einschränkung der Zellviabilität beobachtet werden. Diese Ergebnisse sind zufriedenstellend, da die getestete Konzentration von Catechol im ICAM-1 Assay bei 10 µM lag und hier zwar ein signifikanter Unterschied der Viabilität gegenüber der Kontrollzellen auszumachen war ( $p < 0,01$ ), dies aber moderat war und sich mit großer Wahrscheinlichkeit nicht auf die Aktivität im ICAM-1 Assay ausgewirkt hat.



**Abb. 3.2.4-3:** MTT-Assay mit HMEC-Zellen, die mit Lösungen von Catechol in ECGM (Nährmedium) von 5 bis 500 µM versetzt wurden; Kontrollzellen nur mit ECGM dienten der Ermittlung von 100% Viabilität; \*\*p < 0,01 und \*\*\* p < 0,001 gegenüber Kontrollzellen; n = 3 in Hexaplikaten.

### 3.2.5 Zusammenfassung und Ausblick

In Kapitel 3 konnte gezeigt werden, dass die in Kapitel 2 isolierten Salicylalkoholderivate Tremulacin und Salicortin im ICAM-1 Assay aktiv waren. Sie stellen damit potentiell antiinflammatorische Wirkstoffe aus der Weidenrinde dar. Es konnte für den ICAM-1 Assay widerlegt werden, dass Salicylsäure als Metabolit das entzündungshemmende Prinzip beider Strukturen darstellt. Vielmehr wurde gezeigt, dass das Abbauprodukt Catechol das wirksame Prinzip von Tremulacin und Salicortin im untersuchten *in vitro* Assay ist. Dieses *in vitro* Erkenntnis trägt bereits zum weiteren Verständnis des wirksamen Prinzips der Weidenrinde bei. Im weiteren Verlauf dieser Arbeit soll der Abbau dieser Salicylalkoholderivate anhand von Salicortin auf seine *in vivo* Relevanz durch orale Applikation der Substanz in Ratten untersucht werden. Ferner wird in Kapitel 6 die pharmakologische Wirkung von Salicortin in einem *in vivo* Entzündungsmodell untersucht. Auch hier soll die *in vivo* Relevanz der ICAM-1 Assay Ergebnisse ermittelt werden.

Stabilitätsuntersuchungen unter Zellkulturbedingungen für *in vitro* aktive Substanzen sind demnach äußerst wichtig, um zum einen keine voreiligen Schlüsse zur pharmakologisch aktiven Struktur zu ziehen und zum anderen, Erkenntnisse zum Wirkprinzip dieser Substanzen zu erhalten. Entsprechend sollten in Zellkultur getestete Verbindungen zunächst auf ihre Stabilität unter Assaybedingungen untersucht werden, um einen höheren Erkenntnisgewinn zu ihrer Wirkung zu erhalten. Des Weiteren sollten noch andere Substanzen mit einer 1-Hydroxy-6-oxo-2-cyclohexencarbonsäureester-Partialstruktur wie Acetylsalicortin isoliert und

auf ähnliches Verhalten wie Tremulacin und Salicortin untersucht werden, um die bereits getroffenen Untersuchungen zu ergänzen.

### **3.3 Experimenteller Teil**

#### **3.3.1 Zellkultur – HMEC-1-Zellen**

Für die Durchführung des ICAM-1 Assays und des MTT Assays wurden eine humane mikrovaskuläre Endothelzelllinie (Human Microvascular Endothelial Cell Line 1, HMEC-1) verwendet, welche freundlicherweise von Herrn Dr. E. Ades und Herrn F. J. Candal vom CDC (USA) sowie von Herrn Dr. T. Lawley von der Emory University (USA) zur Verfügung gestellt wurden. Da es sich hier um Endothelzellen handelte, welche durch plasmidvermittelte Virusgen-transfektion immortalisiert waren [89], wuchsen diese Zellen adhärent und wurden vor jedem Passagieren zu einer konfluenten, einzelligen Schicht kultiviert. Des Weiteren war es nötig, alle Zellkulturbehälter vor Inkubation mit den Zellen mit einer dünnen Schicht Kollagen auszukleiden („Coating“), um ein gutes Anwachsen, eine hohe Zellviabilität und ein späteres Ablösen der Zellen zu gewährleisten [95]. Dies geschah durch 20-minütige Inkubation (Inkubator, 37 °C, 5% CO<sub>2</sub>) des jeweiligen Behältnisses mit einer Kollagen-Lösung und nachfolgendem Absaugen dieser Lösung. Die Zellen wurden in 75 cm<sup>2</sup> großen Zellkulturflaschen in Zellkulturmedium (ECGM, Endothelial Cell Growth Medium) bei 37 °C und 5% CO<sub>2</sub> im Inkubator kultiviert. Wenn der Zellrasen konfluent gewachsen war (mikroskopische Beurteilung), wurden die Zellen wieder abgelöst und verdünnt neu ausgesät (passagiert). Hierbei war es nötig, die Zellen zunächst mit ca. 20 ml einer PBS-Puffer-Lösung zu waschen, daraufhin mit ca. 3 ml einer Trypsin-EDTA-Lösung durch 5-minütiges Inkubieren im Inkubator abzulösen und diese schließlich in ca. 40 ml Abstopppmedium aufzunehmen. Diese Zellsuspension wurde bei 1000 U/min 5 Minuten zentrifugiert, das Abstopppmedium abgesaugt, die Zellen in Zellkulturmedium wieder suspendiert und in der gewünschten Verdünnung mit Zellkulturmedium auf 25 ml in eine geccoatete Zellkulturflasche ausgesät.

### 3.3.1.1 ICAM-1 Assay

#### 3.3.1.1.1 Substanzaufgabe

HMEC-1-Zellen wurden zunächst in einer 24-well Platte, welche zuvor mit Kollagen gecoatet wurde (s. 3.3.1), konfluent kultiviert. Nach Entfernung des Zellkulturmediums aus jedem Well und Durchführung eines Waschschriffs mit ca. 200 µl PBS-Puffer je Well, schloss sich die Zugabe von 495 µl der zu testende Substanzlösung in entsprechender Konzentration in Zellkulturmedium an. Es folgte eine dreißigminütige Inkubation der Testlösungen mit den Zellen bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub>.

Die konzentrierten Stammlösungen der Substanzen wurden entweder in DMSO oder direkt in Zellkulturmedium hergestellt, wobei die Endkonzentration von DMSO im Assay durch vorheriges Verdünnen der Testlösungen mit Zellkulturmedium hierbei nie größer als 0,1% war.

Als Positivkontrolle diente Parthenolid (5 µM). Es wurden 5 µl einer 50 µM Parthenolid-Lösung (in Zellkulturmedium, frisch hergestellt) zu 490 µl vorgelegtem Zellkulturmedium in die Wells gegeben und anschließend 30 Minuten inkubiert. Des Weiteren wurde stets eine Kontrolle, welche 500 µl des Zellkulturmediums pro Well enthielt und ein TNF-α-Ansatz, welcher 495 µl des Zellkulturmediums enthielt und später noch mit TNF-α versetzt werden sollte, mitgeführt.

Jede zu testende Probe, auch die Positivkontrolle, die Kontrolle und die TNF-α-Gruppe, wurde in doppelten Ansätzen (Duplikate) je Assay analysiert. Getestet wurden Salicortin und Tremulacin in den Endkonzentrationen 10, 25, 50 und 75 µM sowie Salicin, Saligenin und Salicylsäure bei 50 µM in jeweils 3 unabhängigen Versuchen aus jeweils unterschiedlichen Passagen.

#### 3.3.1.1.2 ICAM-1-Expressionsstimulation

Zur Stimulation der ICAM-1-Expression wurden außer zur Kontrollgruppe nach der 30-minütigen Inkubation mit den Testsubstanzen in jedes Well 5 µl einer TNF-α Lösung (1 µg/ml in Zellkulturmedium, frisch hergestellt) gegeben, sodass jedes Well außer bei der Kontrolle 10 ng/ml TNF-α enthielt. Eine weitere Inkubation von 24 Stunden bei 37 °C und 5% CO<sub>2</sub> schloss sich an.

### 3.3.1.1.3 Aufarbeitung der Zellen mit einem FITC-markiertem ICAM-1-Antikörper für die FACS-Analyse

Nach 24 Stunden Inkubation wurden die Zellen durch Zugabe mit ca. 200 µl PBS-Puffer gewaschen, anschließend mit 200 µl einer Trypsin-EDTA-Lösung und 5-minütiger Inkubation bei 37 °C und 5% CO<sub>2</sub> abgelöst und durch Überführen in FACS-Röhrchen mit 100 µl einer Formalin-Lösung fixiert. Nach einer Inkubationszeit bei Raumtemperatur von 15 Minuten schloss sich ein Waschschriff mit der Zugabe von 1000 µl PBS-Puffer, kurzem Vortexen und Zentrifugieren (5 min, 1200 U/min) an. Der Überstand wurde verworfen und die fixierten Zellen mit 5 µl einer Lösung mit Fluorescein-Isothiocyanat (FITC)-markierten Mausantikörpern gegen ICAM-1 versetzt. Nach 20-minütiger Inkubation bei Raumtemperatur unter Lichtausschluss wurde überschüssiger freier Antikörper durch einen erneuten Waschschriff mit 1000 µl PBS-Puffer entfernt (s.o.) und die Zellen daraufhin in 400 µl PBS-Puffer suspendiert, um dann ihre Fluoreszenzintensität im Durchflusscytometer (FACS) zu vermessen.

### 3.3.1.1.4 FACS-Analyse und Auswertung

Mit Hilfe eines Durchflusscytometers konnten zunächst die Zellen nach ihrer Granularität (Seitwärtsstreulicht, SSC) und Größe (Vorwärtsstreulicht, FSC) ausgewählt werden und damit nur die Fluoreszenzintensität dieser selektierte Population detektiert werden. Es wurden pro Ansatz (Well) 5000 Zellen vermessen. Die Fluoreszenzintensität einer nachträglich noch einmal definierten Population wurde mit der Software WinMDI Version 2.9 ausgewertet. Die durchschnittliche Fluoreszenzintensität der nur mit TNF-α behandelten Zellen stellte dabei die ICAM-1-Expression von 100% dar und war damit der Referenzwert mit dem alle anderen prozentualen ICAM-1-Expressionen berechnet wurden.

**Tab. 3.3.1.1.4:** Geräteeinstellungen FACS.

<b>Name und Hersteller Durchflusszytometer</b>	Becton Dickinson FacsCalibur <sup>TM</sup> , Becton Dickinson, Franklin, USA
<b>Software</b>	CellQuestPro, Becton Dickinson, Franklin, USA
<b>Anregungswellenlänge</b>	495 nm
<b>Emissionswellenlänge</b>	519 nm
<b>FSC</b>	10 <sup>-1</sup> V
<b>SSC</b>	320 V
<b>Spannung FL 1</b>	500 V
<b>Fluss</b>	60 µl/min

### 3.3.1.2 Modifizierter ICAM-Assay

Im Fall der speziellen Analyse der ICAM-1-Expressionshemmung einer 10  $\mu\text{M}$  Catechollösung, wurde die zu testende Lösung erst 8 Stunden nach TNF- $\alpha$ -Zugabe zugefügt. Bis auf die Modifizierung des zeitlichen Ablaufs von Substanz- und TNF- $\alpha$ -Zugabe blieb der restliche Verlauf des Assays gleich (s. 3.3.1.1).

### 3.3.1.3 MTT Assay

#### 3.3.1.3.1 Substanzaufgabe

HMEC-Zellen wuchsen in einer zuvor mit Kollagen gecoateten (s. 3.3.1) 96-well Platte zunächst konfluent an. Nach Absaugen des Zellkulturmediums wurden 100  $\mu\text{l}$  der zu testenden Substanzlösungen in Zellkulturmedium auf die Zellen gegeben. Jede Konzentration wurde pro Assay auf 6 aufeinanderfolgende Wells verteilt und vermessen. Analysiert wurden je 9 unterschiedliche Konzentrationen von Catechol, Salicortin und Tremulacin zwischen 5 und 500  $\mu\text{M}$  in jeweils drei unabhängigen Versuchen. Um Randeffekte zu vermeiden, enthielten die äußeren Wells keine zu testende Lösung, sondern nur PBS-Puffer. Eine Kontrolle bestehend aus sechs Wells mit unbehandelten Zellen, die je 100  $\mu\text{l}$  Zellkulturmedium ohne Testsubstanzen enthielten, wurde stets mitgeführt. Es folgte eine 24-stündige Inkubation der Zellen mit den Testlösungen im Inkubator (37 °C, 5%  $\text{CO}_2$ ).

#### 3.3.1.3.2 MTT-Aufgabe und Auflösung der Zellen

Nach 24-stündiger Inkubation wurden die Testlösungen und das Kontrollmedium vorsichtig durch Absaugen entfernt, je 100  $\mu\text{l}$  einer 10%-igen MTT-Lösung in Zellkulturmedium hinzugegeben und 3 Stunden in den Inkubator gestellt. Hierauf folgte das Absaugen der MTT-Lösung, die Zugabe von 100  $\mu\text{l}$  einer 10%-igen wässrigen SDS-Lösung pro Well und die Inkubation bei Raumtemperatur unter Lichtausschluss über Nacht.



### 3.3.1.3.3 Bestimmung der Absorption und Auswertung

Mit Hilfe des Plattenlesegeräts Tecan Spectra Fluor plus (Tecan Group Ltd, Männedorf, Schweiz) konnte die Absorption jedes einzelnen Wells bei 560 nm gemessen werden. Die Absorption der Wells mit Kontrollzellen wurde hierbei als 100% Viabilität festgelegt und diente damit als Referenzwert auf den alle anderen Ergebnisse bezogen wurden.

### 3.3.1.4 Verwendete Geräte, Chemikalien, Verbrauchsmaterialien und Zellkulturmedien in Kapitel 3.3.1

Viele Verbrauchsmaterialien in der Zellkultur konnten steril verpackt erworben werden. Wenn dies nicht der Fall oder mit zu hohen Kosten verbunden war, wurden die Verbrauchsmaterialien durch Autoklavieren oder Hitzesterilisation selbst sterilisiert.

**Tab. 3.3.1.4-1:** Verwendete Chemikalien/Verbrauchsmaterialien in Kapitel 3.3.1.

Name	Qualität/Beschreibung	Hersteller
Kollagen G	4 mg/ml from bovine calf skin	Biochrom AG, Berlin, Deutschland
DMSO p.A.	99,90%	Merck, Darmstadt, Deutschland
FACS-Röhrchen (Zentrifugenröhrchen)	5 ml Polystyren Round Bottom Tube	Becton Dickinson, Franklin, USA
FITC-markierter ICAM-1 Antikörper	Mouse Anti Human CD54 FITC	Biozol, Eching, Deutschland
FKS – fetales Kälberserum	Hitzeinaktiviert	Biochrom AG, Berlin, Deutschland
MTT - Thiazolyl Blue Tetrazolium Bromide	99%	Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland
Parthenolid	≥ 97%	Calbiochem, Bad Soden, Deutschland
Pipetten, serologische	steril, 5 – 50 ml	TPP, Trasadingen, Schweiz
D-Salicin	≥ 98%	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland
2-Hydroxybenzylalkohol (Saligenin)	99%	Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland
Salicylsäure	≥ 99%	Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland
Salicortin	96,2%	Isolat, siehe Kapitel 2, 2.3.2.1
SDS (sodium dodecyl sulfate oder Natrium-dodecylsulfat)	27310 Units/g	Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland
TNF-α	≥ 95%	Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland
Tremulacin	85,7%	Isolat, siehe Kapitel 2, 2.3.2.1
Trypsin/EDTA Konzentrat (10x)	10fach konzentriert für die Zellkultur (zum Verdünnen mit PBS-Puffer auf 0,5% / 0,2%)	Biochrom AG, Berlin, Deutschland
Zellkulturflasche	Cellstar 75 cm <sup>2</sup> , 250 ml	Greiner bio-one, Frickenhausen, Deutschland
Zellkulturtestplatten	96 well, 24 well	TPP, Trasadingen, Schweiz

**Tab. 3.3.1.4-2:** Verwendete Zellkulturmedien/-lösungen in Kapitel 3.3.1.

Name	Zusammensetzung/Hersteller
<b>Abstopppmedium</b>	Medium 199 (PAN Biotech GmbH, Aidenbach, Deutschland) + 10% FKS
<b>Kollagen-Lösung für das Coating</b>	500 ml PBS-Lösung + 1,25 ml Kollagen G (0,25% V/V)
<b>PBS-Puffer</b> (Dulbeccos phosphate buffered saline)	Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland
<b>SDS-Lösung</b>	10% (m/V) SDS in Reinstwasser
<b>Trypsin/EDTA Lösung</b>	PBS-Puffer + 10% (V/V) Trypsin-EDTA-Konzentrat
<b>Zellkulturmedium</b>	500 ml Endothelial Cell Growth Medium (ECGM) + 23,5 ml supplements + 3,5 ml antibiotics (alle: Provitro, Berlin, Deutschland) + 50 ml FKS

**Tab 3.3.1.4-3:** Verwendete Geräte in Kapitel 3.3.1.

Funktion	Name	Hersteller
<b>Autoklav</b>	<i>Melag Autoklav 23</i>	Melag Medizintechnik, Berlin, Deutschland
<b>Inkubator</b> , Einstellung immer bei 37°C und 5% CO <sub>2</sub>		New Brunswick Scientific, Edison, USA
<b>Pipetten</b>	<i>Eppendorf Research®</i>	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
<b>Reinstwasseranlage</b>	<i>Astacus Membra Pure</i>	MembraPure GmbH, Bodenheim, Deutschland
<b>Sterilwerkbank</b>	<i>HeraSafe KS</i>	Thermo scientific, Langenselbold, Deutschland
<b>Zentrifuge</b>	<i>Heraeus Megafuge 1.0 R Sepa-tech,</i>	Thermo scientific, Langenselbold, Deutschland

### 3.3.2 Stabilitätskontrolle von Salicortin und Tremulacin unter ICAM-1 Assay Bedingungen

#### 3.3.2.1 Inkubation und Probenaufarbeitung

Proben einer 50 µM Lösung von Salicortin oder Tremulacin gelöst in ECGM wurden mit 500 µl/Well in einer 24-Well-Platte für insgesamt 24 Stunden (Tremulacin), bzw. 48 Stunden (Salicortin) in den Inkubator gestellt. Nach 2, 4, 8, 12, 18 und 24 Stunden wurde eine Probe von 400 µl entnommen, bei Salicortin zusätzlich auch nach 36 und 48 Stunden. Mit der Zugabe von 400 µl Methanol und der anschließenden 20-minütigen Zentrifugation bei 14000 U/min und 10 °C erfolgte die Fällung der Proteine aus dem Zellkulturmedium. Die überstehende Lösung wurde daraufhin durch Nanosep-Filter durch 30-minütiges Zentrifugieren bei 14000 U/min und 10°C filtriert. Hierauf schloss sich die Analyse dieses Filtrats mittels analytischer HPLC an. Die Stabilitätsuntersuchung wurde für beide Substanzen und jeden Zeitpunkt in 3 unabhängigen Versuchen durchgeführt.

#### 3.3.2.2 Quantifizierung von Catechol, Salicortin und Tremulacin aus den Proben der Stabilitätsuntersuchungen

In den aufgearbeiteten Proben (beschrieben in 3.3.2.1) wurde Catechol als Abbauprodukt aus Salicortin bzw. Tremulacin quantifiziert. Daneben wurde auch die Abnahme der Konzen-

tration der jeweiligen Ausgangssubstanz Salicortin oder Tremulacin bestimmt. Die Quantifizierung erfolgte mittels analytischer HPLC und Dioden-Array-Detektor (DAD) unter Verwendung eines wässrig-methanolischen Fließmittelsystems an einer RP18-Trennsäule. Die Retentionszeiten lagen bei 14,3 min für Catechol, bei 20,9 min für Salicortin und bei 36,3 min für Tremulacin. Es wurde für jede Substanz eine Kalibriergerade als Mittelwert aus drei unabhängig voneinander ermittelten Kalibriergeraden errechnet. Für jede Substanz wurden mit drei verschiedenen Einwaagen drei Stammlösungen in Methanol hergestellt, welche mit Methanol auf die gewünschten Konzentrationen verdünnt wurden. Für die Kalibriergeraden wurden die Peakflächen von 1, 2,5, 5, 10, 20, 40, 60 und 100 µM Catechol und Salicortin sowie von 1, 3, 8, 5, 17 und 25 µM Tremulacin ermittelt. Mit Hilfe der Geradengleichungen der Kalibriergeraden konnte dann nach Bestimmung der jeweiligen Peakflächen in den Proben die Konzentration von Catechol, Salicortin und Tremulacin berechnet werden. Aus den Kalibriergeraden ergaben sich folgende Geradengleichungen mit den dazugehörigen Korrelationskoeffizienten ( $R^2$ ):

Catechol:  $y = 20074x - 20086$ ;  $R^2 = 0,9936$ ; Salicortin:  $y = 8186,3x - 29412$ ;  $R^2 = 0,9911$  und Tremulacin:  $y = 10970x - 6254,2$ ;  $R^2 = 0,9947$ .

**Tab. 3.3.2.2:** HPLC-Bedingungen der Stabilitätskontrolle, HPLC-System s. Tab. 2.3.2.3.

<b>Fließmittel</b>	
Fließmittel A	H <sub>2</sub> O (Millipore®) mit 0,1% THF (Tetrahydrofuran Lichrosolv®, Merck, Darmstadt, Deutschland)
Fließmittel B	Methanol (Lichrosolv®, Merck, Darmstadt, Deutschland)
<b>Gradient</b>	
Min	Fließmittelzusammensetzung [%B in A]
0 – 45	20% B → 80% B
45 – 50	80% B → 20% B
51 – 60	20% B
<b>Einstellungen</b>	
Temperatur Autosampler	4 °C
Temperatur Säulenofen	30 °C
Fließgeschwindigkeit	0,6 ml/min
Injektionsvolumen	20 µl
Detektionswellenlänge Catechol	275 nm
Detektionswellenlänge Salicortin	270 nm
Detektionswellenlänge Tremulacin	271 nm
<b>Trennsäule</b>	
Hibar® 250-4 mm Kartusche mit Purospher Star® RP18-e (5 µm) und Vorsäule, Merck, Darmstadt, Deutschland	

### 3.3.3 Statistik

Für die statistische Auswertung wurde IBM SPSS Statistics 20 von IBM Deutschland GmbH, (Ehningen, Deutschland) verwendet. Es wurde auf Mittelwertgleichheit im t-Test zweier unabhängiger Stichproben getestet.

## 4. *In vivo* Metabolisierung von Salicortin zu Catechol nach peroraler Aufnahme

### 4.1 Hintergrund des Tiermodells

Wie in Kapitel 3 gezeigt wurde, ist Salicortin unter Zellkulturbedingungen nicht stabil und wird zu Catechol abgebaut. Es stellte sich ebenfalls heraus, dass die Aktivität von Salicortin in dem in Kapitel 3 vorgestellten *in vitro* Entzündungsassay (ICAM-1 Assay) auf sein Abbauprodukt Catechol zurückzuführen ist. Den Abbau von Salicortin zu Catechol *in vitro* im alkalischen Milieu oder in der Gegenwart von Blattenzymen zeigten zuvor schon Ruuhola et al. [29], s. Kapitel 3 unter 3.1.

Catechol ist demnach neben Salicylsäure ein weiterer möglicher entzündungshemmender Metabolit von Salicortin. Seine potentiell antiphlogistischen Eigenschaften wurden neben den Ergebnissen aus Kapitel 3 auch von Ma und Kinneer [93] sowie von Zheng et al. [94] *in vitro* beschrieben. Ma und Kinneer zeigten, dass Catechol die LPS (Lipopolysaccharid)-induzierte TNF- $\alpha$ -Expression in Makrophagen senkt. Zheng et al. demonstrierten die Hemmung der LPS-induzierten NF- $\kappa$ B-Aktivierung, der Stickstoffmonoxid (NO)- und der TNF- $\alpha$ -Produktion in BV-2 Mikrogliazellen durch Catechol. Auch für das Catecholderivat Hydroxytyrosol (Hydroxyethylcatechol), einem Inhaltsstoff von Olivenöl, wurden *in vitro* antiinflammatorische Eigenschaften beschrieben [96].

Eine weitere Arbeitsgruppe zeigte außerdem, dass unter verschiedenen isolierten Verbindungen aus Zweigen von *Salix pseudo-lasiogyne* nur solche mit einer 1-Hydroxy-6-oxo-2-cyclohexencarbonsäureester-Partialstruktur die LPS-induzierte NO-Produktion in BV-2 Mikrogliazellen reduzieren konnten [62]. Diese 1-Hydroxy-6-oxo-2-cyclohexencarbonsäure-Partialstruktur ist wie in Kapitel 3 bereits ausführlich beschrieben die Grundvoraussetzung für die Bildung von Catechol. Dies führt zu der Frage, ob diese Verbindungen mit der genannten Partialstruktur auch aufgrund ihrer Instabilität und ihres Abbaus zu Catechol unter Assaybedingungen in dem von Yang et al. [62] beschriebenen Assay aktiv waren.

Die Bildung von Catechol scheint dementsprechend das wirksame Prinzip von Verbindungen mit einer 1-Hydroxy-6-oxo-2-cyclohexencarbonsäureester-Partialstruktur wie Salicortin darzustellen. Bisher wurde allerdings noch nicht geklärt, ob Catechol auch *in vivo* ein Abbauprodukt von Salicortin ist und damit auch *in vivo* ein wirksames Prinzip von Salicortin darstellen könnte. Die *in vivo* Relevanz der *in vitro* Ergebnisse aus Kapitel 3 sollte das Tiermodell mit männlichen Wistar-Ratten im vorliegenden Kapitel 4 klären. Die Tiere bekamen hierfür

Salicortin in einer Dosierung von 100 mg/kg Körpergewicht peroral verabreicht. Ihnen wurde daraufhin nach definierten Zeitpunkten Blut abgenommen. Aus den hieraus gewonnenen Seren sollten dann Catechol und auch Salicylsäure nach einer vorher optimierten und validierten Methode quantifiziert werden.

## **4.2. Ergebnisse und Diskussion**

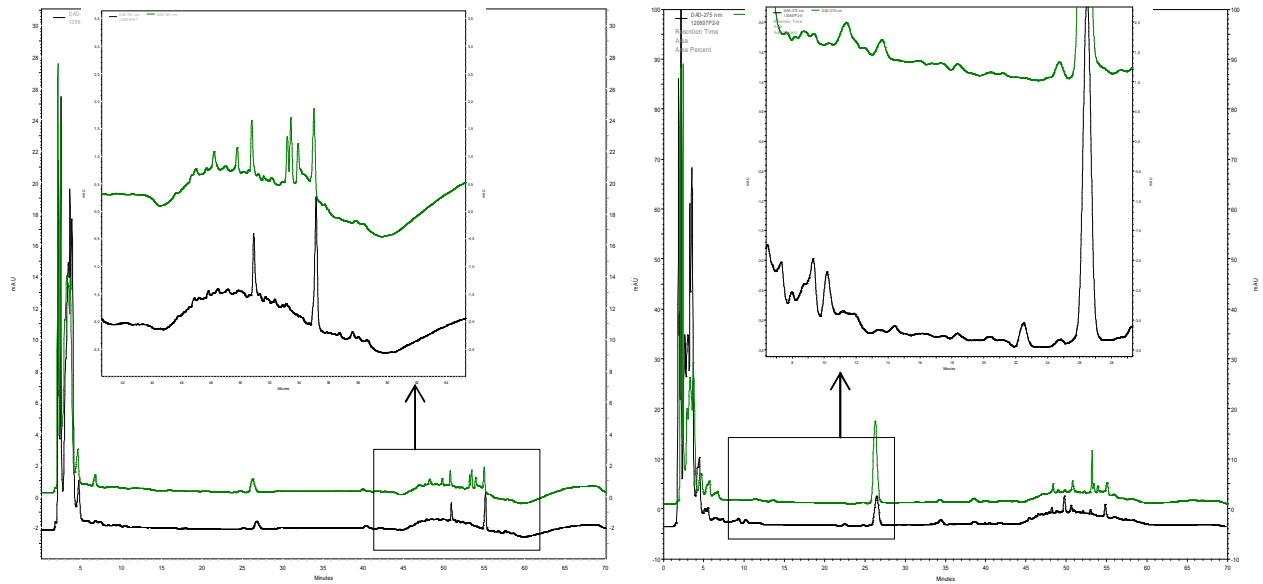
### 4.2.1 Aufarbeitung der Serumproben, HPLC-Methode und Validierung

In Kapitel 7.3.3 wird eine optimierte und validierte Aufarbeitungs- und HPLC-Methode für die Quantifizierung von Catechol und Salicylsäure aus enzymatisch aufgearbeiteten menschlichen Serumproben vorgestellt. Als Validierungsparameter wurden Kalibrierung, Wiederfindung, Präzision des Geräts, Quantifizierungs- sowie Detektionsgrenzen für Catechol und Salicylsäure herangezogen. Vergleichende unter 4.2.1.1 vorgestellte Untersuchungen von aufgearbeiteten Serumproben des Menschen und der Ratte zeigten, dass sich Catechol und Salicylsäure in der jeweiligen Matrix so ähnlich verhalten, dass auf eine zusätzliche Ermittlung dieser Parameter mit Rattenserum unter Ausnahme der Wiederfindung verzichtet werden konnte. An dieser Stelle sei auf die Validierungsparameter in Kapitel 7 unter 7.2.2.1 sowie auf die Aufarbeitungs- und HPLC-Methode in Kapitel 7 unter 7.3.3 verwiesen.

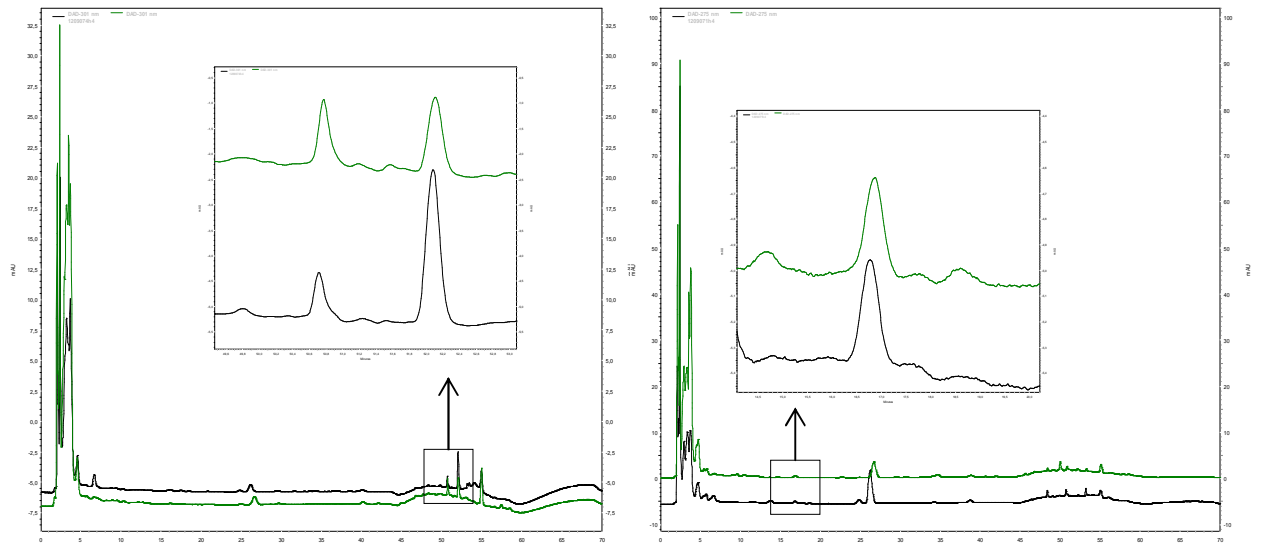
#### 4.2.1.1 Vergleichbarkeit von Human- und Rattenserum

##### 4.2.1.1.1 Vergleichbarkeit der Selektivität

Die in Kapitel 7 vorgestellte HPLC-Methode zur Quantifizierung von Catechol und Salicylsäure nach enzymatischer Aufarbeitung war sowohl in menschlichem Serum als auch im Rattenserum angemessen selektiv. Es traten im Bereich des Catechol- (16,8 min) und des Salicylsäurepeaks (52,1 min) keine Störsignale auf. Die Abbildungen 4.2.1.1.1-1 und 4.2.1.1.1-2 veranschaulichen dies. Abbildung 4.2.1.1.1-1 zeigt die Abwesenheit von Störsignalen für Salicylsäure bei 301 nm und für Catechol bei 275 nm in Kontrollseren von Mensch und Ratte. Die Abbildung 4.2.1.1.1-2 gibt die erfolgreiche Abtrennung der Salicylsäure- und Catecholsignale von anderen Serumbestandteilen sowohl im Rattenserum als auch im humanen Serum wieder.



**Abb. 4.2.1.1.1-1:** HPLC-Chromatogramm bei 301 nm (links) und 275 nm (rechts) von Kontrollseren (Ratte = grün, Mensch = schwarz) ohne Störpeaks bei den Retentionszeiten von Catechol (16,8 min) und Salicylsäure (52,1 min).



**Abb. 4.2.1.1.1-2:** HPLC-Chromatogramme bei 301 nm (links) und 275 nm (rechts) von Serumproben (Ratte = schwarz, Mensch = grün). Die Chromatogramme zeigen Salicylsäure bei 301 nm 1,5 h nach WRE-Einnahme (Mensch) und 4 h nach Salicortin-Applikation p.o. (Ratte), Catechol bei 275 nm 0,5 h nach WRE-Einnahme und 1 h nach Salicortin-Applikation.

Da nicht nur bei der Selektivität der Methode für diese beiden Matrices, sondern auch bei Betrachtung des Gesamtverlaufs der Chromatogramme kein erheblicher Unterschied zwischen aufgearbeiteten Ratten- und Humanseren festzustellen war, konnte die für menschliche Seren entwickelte Methode auch für die Aufarbeitung von Rattenseren verwendet werden. Dies wurde des Weiteren durch sehr ähnliche Ergebnisse der Wiederfindungsversuche von Catechol und Salicylsäure aus den beiden Matrices deutlich, wie im Folgenden unter 4.2.1.1.2 beschrieben ist.

#### 4.2.1.1.2 Vergleichbarkeit der Wiederfindung

Durch Vergleich der Ergebnisse aus den Wiederfindungsversuchen mit Catechol aus Rattenserum mit den Ergebnissen von Catechol aus menschlichem Serum, konnte im t-Test zweier unabhängiger Stichproben kein signifikanter Unterschied zwischen der Wiederfindung von Catechol aus den beiden Matrices in allen getesteten Konzentrationsbereichen festgestellt werden ( $p > 0,1$ ). Die Mittelwerte aus den Wiederfindungsversuchen und die dazugehörigen Standardabweichungen sind in Tabelle 4.2.1.1.2 aufgeführt.

**Tab 4.2.1.1.2:** Ergebnisse der Wiederfindungsversuche mit Catechol, Salicylsäure und Methylcatechol (IS) aus menschlichem Serum und Rattenserum. Angegeben sind die Mittelwerte und Standardabweichungen in %,  $n = 5$ .

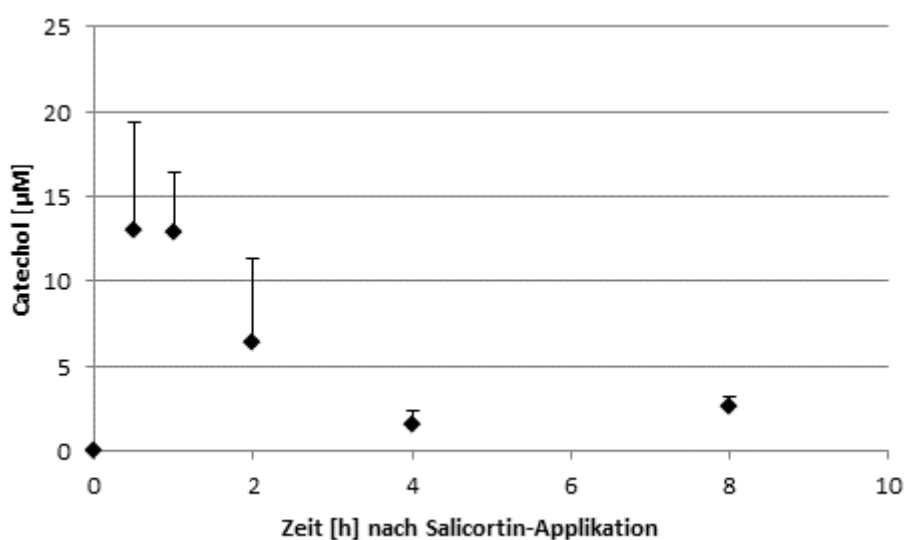
Matrix	Probe	Wiederfindung	
		Mittelwert [%]	Standardabweichung [%]
Mensch	2 $\mu$ M Catechol	99,09	8,92
	8 $\mu$ M Catechol	93,33	10,27
	16 $\mu$ M Catechol	83,40	8,63
Ratte	2 $\mu$ M Catechol	92,14	8,54
	8 $\mu$ M Catechol	81,42	2,17
	16 $\mu$ M Catechol	90,51	4,23
Mensch	2 $\mu$ M Salicylsäure	85,34	6,10
	10 $\mu$ M Salicylsäure	76,91	4,78
	20 $\mu$ M Salicylsäure	80,38	6,23
Ratte	2 $\mu$ M Salicylsäure	95,82	7,33
	10 $\mu$ M Salicylsäure	84,40	3,37
	20 $\mu$ M Salicylsäure	91,36	6,50
Mensch	9 $\mu$ M Methylcatechol	88,70	2,76
Ratte	9 $\mu$ M Methylcatechol	88,88	3,43

Auch die Wiederfindung des internen Standards aus menschlichem Serum und aus Rattenserum war laut t-Test (unverbundene Stichproben) gleich ( $p > 0,6$ ). Lediglich für die Wiederfindung von Salicylsäure aus den beiden Matrices konnte keine Gleichheit gezeigt werden. Hier lag bei allen Konzentrationsbereichen ein signifikanter Unterschied vor ( $p < 0,05$ ). Da die Werte dennoch in ähnlichen Bereichen lagen, die Selektivität der Methode wie oben beschrieben sehr gut und außerdem die Analytik von Catechol von weit höherem Interesse war als die von Salicylsäure, wurden weitere Validierungsschritte zur Salicylsäure mit Rattenserum unterlassen.



#### 4.2.2 Catechol- und Salicylsäurekonzentration im Serum von Wistar-Ratten nach peroraler Applikation von Salicortin und enzymatischer Aufarbeitung der Serumproben

Durch die Salicortin-Applikation per Schlundsonde in männlichen Wistar-Ratten sollte geklärt werden, ob Salicortin auch *in vivo* zu Catechol abgebaut wird und dieses damit einen möglichen wirksamen Metaboliten von Salicortin darstellt (s. 4.1). Aus dem nach definierten Zeitpunkten abgenommenen Blut wurde Serum gewonnen, dieses enzymatisch mit Sulfatase und  $\beta$ -Glucuronidase aufgearbeitet, extrahiert und nachfolgend mit HPLC-DAD analysiert. Die folgende Abbildung zeigt, dass Catechol als Metabolit von Salicortin im Serum der Ratten tatsächlich detektierbar war. 30 Minuten nach Salicortin-Gabe wurde im Serum bereits die Maximalkonzentration von 13,0  $\mu\text{M}$  erreicht.



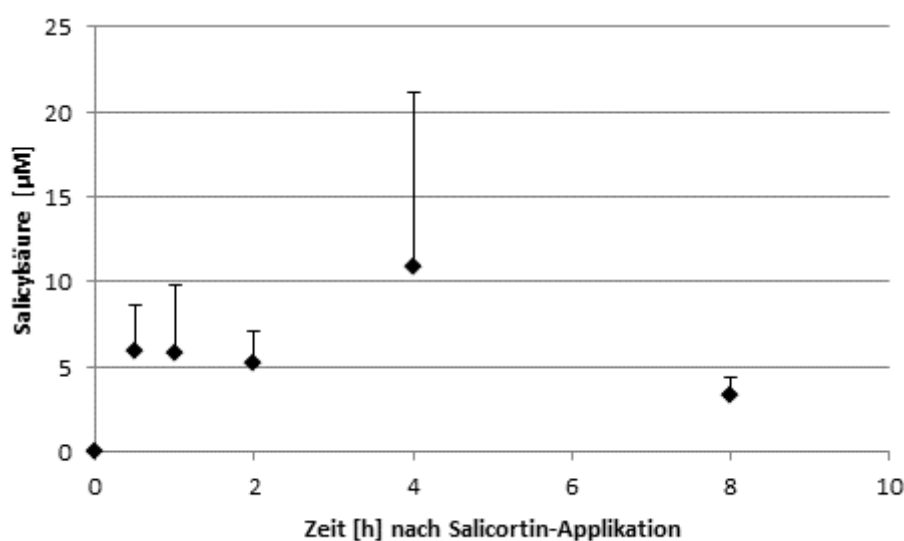
**Abb. 4.2.2-1:** Catecholkonzentration in enzymatisch aufgearbeiteten Seren von männlichen Wistar-Ratten nach oraler Salicortin-Gabe von 100 mg/kg KG; n = 7 pro Zeitpunkt; Mittelwert + StabW.

Diese fiel nach vier Stunden auf  $1,5 \pm 0,9 \mu\text{M}$  ab, wobei nach acht Stunden noch immer  $2,6 \pm 0,6 \mu\text{M}$  zu finden waren. Eine  $\text{AUC}_{0-8\text{h}}$  von  $35,4 \mu\text{M}\cdot\text{h}$  und eine Halbwertszeit von 0,97 h wurden bestimmt (s. Tab. 4.2.2). Somit konnte erstmalig gezeigt werden, dass Catechol einen *in vivo* Metabolit des am häufigsten in der Weidenrinde vorkommenden Salicylalkoholderivats Salicortin und damit ein mögliches wirksames Prinzip von Verbindungen mit einer 1-Hydroxy-6-oxo-2-cyclohexencarbonsäureester-Partialstruktur *in vivo* darstellt. Die Metabolisierung zu Catechol verlief zudem mit  $t_{\text{max}} = 0,5 \text{ h}$  sehr schnell.

Die teilweise großen Standardabweichungen lassen sich durch starke interindividuelle Schwankungen erklären, da für jeden Zeitpunkt sieben unterschiedliche Tiere zur Verfügung standen. Leider war es prinzipiell nicht möglich, den Tieren eine Verweilkanüle zu legen und

nach verschiedenen Zeitpunkten vom gleichen Tier Blut zu nehmen, da im Rahmen dieses Pilotversuch zunächst zu viel Blut pro Zeiteinheit abgenommen werden musste.

Ähnliche Schwankungen waren bei der Analytik von Salicylsäure in diesen Seren zu beobachten. Das An- und Abfluten war hier nicht so eindeutig wie im Fall von Catechol, aber auch Salicylsäure war als Metabolit von Salicortin identifizierbar. Die Maximalkonzentration von Salicylsäure in den Rattenserum wurde erst nach vier Stunden mit  $10,9 \mu\text{M}$  erreicht. Eine  $\text{AUC}_{0-8\text{h}}$  von  $54,4 \mu\text{M}\cdot\text{h}$  sowie eine Halbwertszeit von  $2,4 \text{ h}$  wurde bestimmt (s. Tab. 4.2.2). Acht Stunden nach Salicortin-Applikation waren noch  $3,3 \pm 0,9 \mu\text{M}$  Salicylsäure in den Rattenserum detektierbar (s. Abb. 4.2.2.-2).



**Abb. 4.2.2-2:** Salicylsäurekonzentration in enzymatisch aufgearbeiteten Seren von männlichen Wistar-Ratten nach oraler Salicortin-Gabe von  $100 \text{ mg/kg KG}$ ;  $n = 7$  pro Zeitpunkt; Mittelwert + StabW.

Wenn man die AUCs der beiden Salicortin-Metabolite Salicylsäure und Catechol vergleicht, so ist die Bioverfügbarkeit von Salicylsäure gegenüber Catechol ungefähr anderthalbfach höher. Frühere Untersuchungen zeigten, dass es unter bestimmten sauren Bedingungen möglich ist, dass Salicortin zu Salicoylsalicin derivatisiert [24]. Dementsprechend könnte die 1-Hydroxy-6-oxo-2-cyclohexencarbonsäureester-Partialstruktur entweder zu Catechol und Salicin oder zu Salicoylsalicin abgebaut werden. Salicoylsalicin wiederum könnte zwei Moleküle Salicylsäure liefern, was die höhere Bioverfügbarkeit von Salicylsäure aus Salicortin gegenüber Catechol erklären würde. Diese Theorie wurde allerdings von Buß [97] widerlegt. In dieser Dissertation wurde die Bioverfügbarkeit von Salicylsäure nach oraler Salicortingabe im Vergleich zur oralen Salicingabe in gesunden Probanden untersucht. Hierbei war die mit Hilfe der AUC ermittelte Bioverfügbarkeit von Salicylsäure nach Salicortingabe geringer als nach Salicingabe. Bei semimolarer Gabe von Salicortin im Vergleich zu Salicin lag die Bioverfügbarkeit der Salicylsäure nur bei 30% gegenüber der Salicin-Applikation. Das bedeu-

tet, dass die niedrigere Bioverfügbarkeit von Catechol gegenüber Salicylsäure in der vorliegenden Arbeit entweder an der weniger vollständig ablaufenden Metabolisierung, an der geringeren Stabilität von Catechol im Blut der Ratten oder an einer möglichen höheren Gewebsverteilung von Catechol im Vergleich zu Salicylsäure liegen könnte. Catechol mit einem  $pK_s$ -Wert von 9,25 [98] liegt bei physiologischem pH-Wert des Serums im Gegensatz zur Salicylsäure eher als ungeladenes Molekül vor. Insofern Catechol noch nicht konjugiert wurde, könnte es als ungeladenes und kleines Molekül im Vergleich zum geladenen Salicylsäurecarboxylat-Anion schneller und effektiver in das umliegende Gewebe diffundieren.

**Tab. 4.2.2.:** Pharmakokinetische Parameter von Catechol und Salicylsäure aus enzymatisch aufgearbeiteten Rattenserum nach oraler Salicortin-Gabe (100 mg/kg KG) , n = 7 pro Zeitpunkt.

<b>Catechol</b>	<b><math>c_{\max}</math> [<math>\mu\text{M}</math>]</b>	<b><math>t_{\max}</math> [h]</b>	<b><math>t_{1/2}</math> [h]</b>	<b><math>AUC_{0-8h}</math> [<math>\mu\text{M}\cdot\text{h}</math>]</b>
Mittelwert	13,0	0,5	0,97	35,4
<b>Salicylsäure</b>	<b><math>c_{\max}</math> [<math>\mu\text{M}</math>]</b>	<b><math>t_{\max}</math> [h]</b>	<b><math>t_{1/2}</math> [h]</b>	<b><math>AUC_{0-8h}</math> [<math>\mu\text{M}\cdot\text{h}</math>]</b>
Mittelwert	10,9	4,0	2,40	54,4

#### 4.2.3 Catechol- und Salicylsäurekonzentration in nicht enzymatisch aufgearbeiteten Seren von Wistar-Ratten nach peroraler Applikation von Salicortin

Die drei Serumproben, welche den höchsten Catecholgehalt nach enzymatischer Aufarbeitung aufwiesen, wurden zusätzlich nicht mit den oben genannten Enzymen versetzt, ansonsten aber wie die enzymatisch aufgearbeiteten Proben bearbeitet. Nach HPLC-Analyse konnte hier in keiner der Proben ein Catecholsignal detektiert werden. Dieses Ergebnis zeigte, dass Catechol nur konjugiert (als Sulfat oder Glucuronid) vorlag, bzw. dass die Menge des freien Catechols unter dem Detektionslimit des DAD lag.

Diese Proben wurden ebenfalls massenspektrometrisch untersucht. Hierbei konnte die Molekülmasse des Catecholsulfats leicht gefunden werden ( $m/z$  188,9859 [ $\text{M}]^-$  gegenüber  $m/z$  188,9863 [ $\text{M}]^-$  laut Berechnung). Die Molekülmasse des Catecholglucuronids trat hingegen in der Peakliste des Massenspektrometers nicht auf, konnte aber händisch als sehr kleines Signal gefunden werden ( $m/z$  285,0616 [ $\text{M}]^-$ ).

Salicylsäure lag ihm Serum frei vor, da die Flächen des Salicylsäurepeaks ohne enzymatische Aufarbeitung denen nach enzymatischer Aufarbeitung entsprachen.

#### 4.2.4 Catecholkonzentration im Serum von Wistar-Ratten nach peroraler Applikation von Salicortin und nur partieller enzymatischer Aufarbeitung der Serumproben

Ein Teil der Serumproben wurde entweder nur mit Sulfatase oder nur mit  $\beta$ -Glucuronidase versetzt. Wie in 4.2.3 wurden die drei Serumproben bearbeitet, welche den höchsten Catecholgehalt nach enzymatischer Aufarbeitung aufwiesen.

Nach Aufarbeitung nur mit  $\beta$ -Glucuronidase konnte wenig Catechol per DAD detektiert und quantifiziert werden, beim Versetzen nur mit Sulfatase hingegen deutlich mehr. Hierbei stellte sich näherungsweise heraus, dass das Catecholglucuronid ungefähr  $13,8\% \pm 8,4\%$  und das Catecholsulfat  $86,2\% \pm 14,2\%$  des nach gesamt-enzymatischer Aufarbeitung erhaltenen Catechols ausmachte.

#### 4.2.5 Zusammenfassung und Ausblick

In Kapitel 4 konnte gezeigt werden, dass Salicortin auch *in vivo* nach oraler Aufnahme zu Catechol abgebaut wird. Catechol scheint damit neben der Salicylsäure ein möglicher wirksamer Metabolit von Salicylalkoholderivaten mit einer 1-Hydroxy-6-oxo-2-cyclohexencarbonsäureester-Partialstruktur und damit auch ein zusätzliches wirksames Prinzip der Weidenrinde zu sein. Im vorliegenden Tiermodell mit männlichen Wistar-Ratten kam Catechol nicht frei im Blut, sondern konjugiert vor. Im Phase-II-Metabolismus wird die Substanz hauptsächlich mit Sulfat und nur zu einem geringen Teil mit Glucuronsäure konjugiert (zur Diskussion der Wirksamkeit von Phase-II-Metaboliten siehe Kapitel 5 unter 5.2.3).

In der Literatur wurde bereits mehrfach beschrieben, dass verschiedene Salicylalkoholderivate nach Aufnahme zunächst zu Salicin hydrolysiert, nachfolgend zu Saligenin dekonjugiert und schließlich zu Salicylsäure oxidiert werden [51-54]. Nachdem dies bereits im Menschen für Salicortin bei isolierter Gabe beschrieben wurde [97], konnte im vorliegenden Tiermodell dies erstmals im Tier bestätigt werden.

Die vorliegende Untersuchung zum Metabolismus von Salicortin *in vivo* ist ein Pilotversuch zur Klärung der Frage, ob Catechol auch *in vivo* ein Metabolit von Salicortin ist. Die Berechnung der pharmakokinetischen Parameter war aufgrund der kleinen Gruppen mit je relativ wenigen Individuen, der starken individuellen Schwankungen der Serumkonzentrationen sowie durch den kurzen Zeitraum von acht Stunden nicht vollständig, beziehungsweise nicht genau genug möglich. Zur genaueren Berechnung der pharmakokinetischen Parameter sollte dieser Versuch mit mehr Individuen über einen Zeitraum von 24 Stunden (wie bei der pharmakokinetischen Studie in Kapitel 7) wiederholt werden. Hierbei wäre es wünschens-

wert, nicht pro Zeitpunkt eine Gruppe von Tieren zu haben, sondern eine Gesamtgruppe, bei welcher den Tieren über den Zeitraum von 24 Stunden immer wieder Blut abgenommen wird. Dies könnte insgesamt die Anzahl der Tiere verringern und außerdem eine weniger starke Streuung der Serumkonzentrationen bedeuten. Die Verwendung einer Verweilkanüle in Ratten ist prinzipiell möglich [99], jedoch müsste zum Wohlergehen der Tiere die abgenommene Blutmenge sehr gering gehalten werden, was wiederum die Quantifizierung aus den Seren erschwert. Allerdings wurde die Aufarbeitungsmethode der Seren so optimiert, dass auch kleine Volumina Serum (bis zu 50 µl) aufgearbeitet werden könnten. Damit sollte diese Variante des Versuchsaufbaus praktisch umsetzbar sein. Ferner wäre eine genauere Analyse des Verhältnisses von Catecholsulfat zu Catecholglucuronid interessant. Aus Zeitgründen wurden hier nur drei Proben analysiert. Die Auswertung aller Proben bezüglich dieser Fragestellung gäbe größeren Aufschluss zu den Metabolisierungswegen des Catechols. Des Weiteren wäre die Untersuchung der Gewebsverteilung von Catechol und Salicylsäure interessant. Dies könnte Erklärungen zu den unterschiedlichen Bioverfügbarkeiten von Catechol und Salicylsäure liefern.

Grundsätzlich ist die Tatsache, dass Catechol als Metabolit von Salicortin quantifizierbar war, ein interessantes Ergebnis, welches zur Aufklärung des Wirkprinzips von Salicylalkoholderivaten mit einer 1-Hydroxy-6-oxo-2-cyclohexencarbonsäureester-Partialstruktur und damit der Weidenrinde beiträgt. Die antiinflammatorische Wirksamkeit von Salicortin in Abgrenzung zum Salicin wird im Folgenden in Kapitel 6 in einem Entzündungsmodell im Tier untersucht. Hier wird eine eventuelle Überlegenheit der Wirksamkeit von Salicortin mit seinen zwei möglichen Metaboliten Catechol und Salicylsäure gegenüber Salicin mit seinem möglichen Metabolit Salicylsäure analysiert. Dadurch soll ein Beitrag zur Beantwortung der Frage geleistet werden, ob Catechol tatsächlich an der entzündungshemmenden Aktivität des Salicortins und damit der Weidenrinde beteiligt ist.

### **4.3. Experimenteller Teil**

#### 4.3.1 Tiermodell

Alle Tierversuche bis zur Serumgewinnung wurden am Institut für Pharmakologie der Pharmazeutischen Fakultät der Universität Kairo in Kairo (Ägypten) unter der Leitung von Prof. Dr. Mohamed T. Khayyal durchgeführt. Sie wurden nach der europäischen Richtlinie

86/609/EEC und nach vorheriger Genehmigung der Ethikkommission für Tierversuche der Pharmazeutischen Fakultät in Kairo durchgeführt (Genehmigungsnummer: PT 412).

#### 4.3.1.1 Tiere

Männliche Wistar-Ratten mit einem Körpergewicht von 150-200 g wurden von der „Animal Breeding Unit of the National Ophthalmology Institute“ in Giza (Ägypten) bezogen. Die Tiere wurden mindestens eine Woche vor den Versuchen im Tierstall zur Eingewöhnung gehalten. Sie erhielten eine Standard-Diät (Pellets) und Wasser zur freien Verfügung. Die Raumtemperatur lag bei  $22\text{ °C} \pm 2\text{ °C}$ , die Luftfeuchtigkeit wurde ebenfalls konstant gehalten. Des Weiteren wurde ein Hell-Dunkel-Rhythmus von je 12 Stunden eingehalten.

#### 4.3.1.2 Salicortin-Applikation, Blutnahme und Serumgewinnung

Vor Salicortin-Gabe erhielten die Tiere 24 h keine Nahrung, aber Wasser zur freien Verfügung. Das isolierte Salicortin (vgl. Kapitel 2 unter 2.2.5.1) wurde in Wasser gelöst und mit Hilfe einer Schlundsonde oral in einer Dosierung von 100 mg/kg Körpergewicht (KG) appliziert. Je sieben Tiere wurden pro Zeitpunkt (0, 0,5, 1, 2, 4 und 8 Stunden nach Applikation) nach dem Zufallsprinzip in eine Gruppe eingeteilt. Zu den definierten Zeitpunkten nach Salicortin-Gabe wurden die Tiere mit Ether leicht betäubt, Vollblut entnommen und getötet. Das Blut wurde sofort für 15 Minuten bei 3000 U/min zentrifugiert (K2015 multi-micro Zentrifuge, Centurion Scientific Ltd, Großbritannien) und das abdekantierte Serum bis zur weiteren Analyse bei  $-80\text{ °C}$  aufbewahrt.

#### 4.3.2 Analytik der Serumproben

An dieser Stelle sei auf das Kapitel 7.3.3 verwiesen.

#### 4.3.3 Statistik

Für die statistische Auswertung wurde IBM SPSS Statistics 20 von IBM Deutschland GmbH (Ehningen, Deutschland) verwendet. Es wurde auf Mittelwertgleichheit im t-Test zweier unabhängiger Stichproben getestet.

#### 4.3.4 Pharmakokinetische Parameter

Für die Berechnung der pharmakokinetischen Parameter wurde das Programm WinNonlin 6.3 der Firma Pharsight, St. Louis, USA verwendet. Aufgrund der wenigen Messwerte und der unregelmäßigen Konzentrations-Zeit-Verläufe konnte nur die AUC von 0 bis 8 Stunden bestimmt werden. Versuchsweise wurden die Halbwertszeiten aus dem Abfall der Konzentrationen bei Catechol zwischen Stunde 1 und 4, bei Salicylsäure zwischen Stunde 4 und 8 berechnet. Die Bestimmung der Standardabweichung für die einzelnen Parameter war nicht möglich.

Die Berechnung der pharmakokinetischen Parameter erfolgte durch Dr. Martin Kees, Klinik für Anästhesiologie und operative Intensivmedizin der Charité, Berlin.





## 5. Synthese des Catecholmetabolits Catecholglucuronid und seine Aktivität im ICAM-1 Assay

### 5.1 Hintergrund

#### 5.1.1 Hintergrund der Testung von Metaboliten

Viele Polyphenole, insbesondere Flavonoide sind in *in vitro* Testsystemen positiv auf ihre pharmakologische Aktivität getestet worden. Inzwischen hat sich allerdings herausgestellt, dass diese pharmakologisch aktiven, unkonjugierten Substanzen äußerst selten bis gar nicht im Blut von Probanden nach peroraler Einnahme wiederzufinden sind [100, 101]. Aus diesem Grund wurde gefordert, dass mehr physiologisch relevante, also *in vivo* tatsächlich zirkulierende Derivate der getesteten Substanzen in den *in vitro* Testsystemen zu untersuchen sind [102]. Damit sind vor allem die Konjugate der Substanzen gemeint, welche tatsächlich im Blut und im Gewebe ankommen. Die meisten Polyphenole werden im Phase-II-Metabolismus bei der Darmwandpassage oder in der Leber mit Glucuronsäure und/oder Sulfat konjugiert, auch Methylierungen einer Hydroxylfunktion zu Methylethern und typische Phase-I-Reaktionen sind möglich [100]. Für Catechol sind diesbezüglich noch keine Daten in der Literatur beschrieben worden. Prinzipiell waren somit drei Phase-II-Metaboliten denkbar: Catecholglucuronid, Catecholsulfat und Catecholmethylether (Guajacol), bzw. dessen Glucuronid und Sulfat, s. Abb 5.1.1:

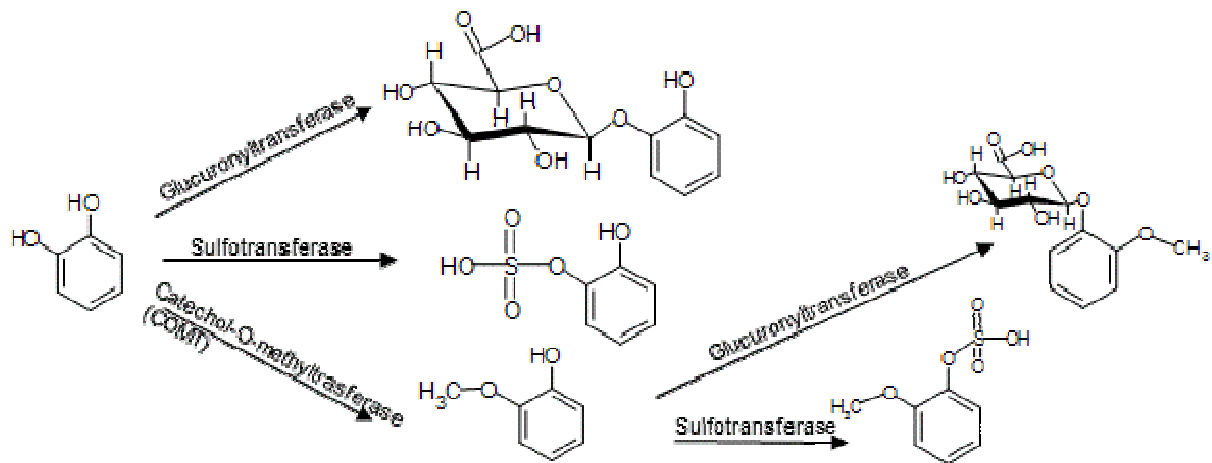


Abb. 5.1.1: Möglicher Phase-II-Metabolismus von Catechol.

Vor allem wurde erwartet, dass Catechol als Polyphenol zu Catecholglucuronid und Catecholsulfat im Phase-II-Metabolismus konjugiert wird, da dies auch bei Hydroxytyrosol, welches dem Catechol als Hydroxyethylcatechol sehr ähnlich ist [103], und bei Flavonoiden mit einer Catecholpartialstruktur beobachtet wurde (z.B. bei Quercetin, [101]). Tatsächlich stellte sich aber sowohl bei den *in vivo* Untersuchungen mit Ratten (s. Kapitel 4) als auch in der klinischen Studie mit gesunden Freiwilligen (s. Kapitel 7) heraus, dass Catechol im Serum nach peroraler Aufnahme des Vorläufermoleküls Salicortin bzw. des Weidenrindenextraktes hauptsächlich als Sulfat und nur zu einem sehr geringen Teil als Glucuronid konjugiert vorlag. Das Methylierungsprodukt Guajacol konnte in den Serumproben per HPLC-DAD hingegen nicht identifiziert werden, genauso wie das unkonjugierte, freie Catechol.

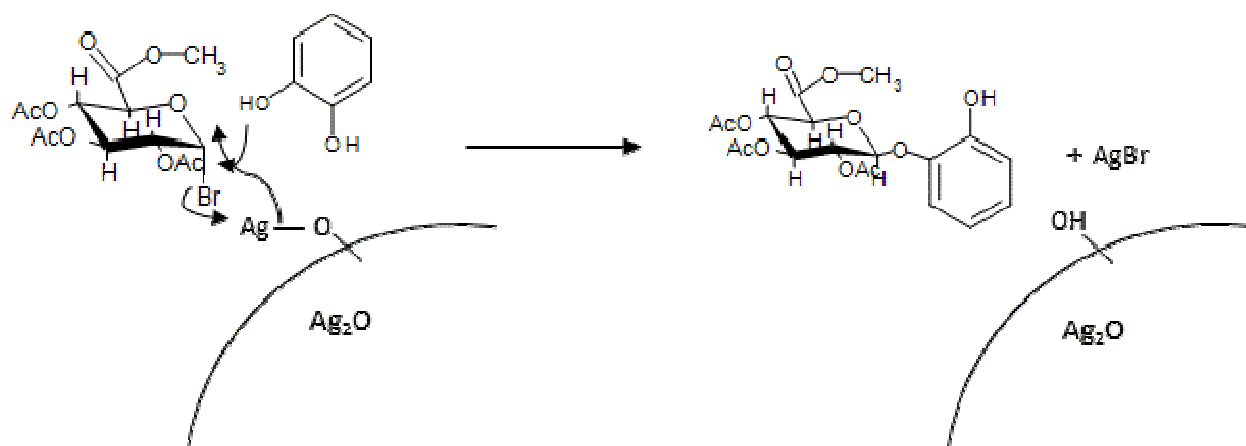
Es wurde aber bereits vorher mit der Synthese des Catecholglucuronids begonnen, um mit der *in vitro* Testung von physiologisch relevanteren Phase-II-Konjugaten beginnen zu können. Nach erfolgreicher Synthese des Catecholglucuronids sollte dieses in dem vorher schon verwendeten ICAM-1 Assay (s. Kapitel 3) auf seine Aktivität überprüft werden.

#### 5.1.2 Hintergrund der Glucuronidsynthese

Für die Synthese von Glycosiden hat sich die sogenannte Königs-Knorr-Methode [104] durchgesetzt. Das Prinzip dieser bereits 1901 publizierten Methode beruht auf der nukleophilen Substitution eines Alkohols mit einem durch Acetylgruppen geschützten Zuckerhalogenid in der Gegenwart von Silbersalzen. Königs und Knorr setzten ursprünglich  $\alpha$ -Acetobromglucose durch Lösen in Methanol mit selbigem in Gegenwart von Silbercarbonat zu Tetraacetyl- $\beta$ -methylglucosid um [104]. Verschiedenste Reaktionsmechanismen für diese Reaktion sind bereits diskutiert worden. Durch die Inversion am sterischen Zentrum trifft wohl am ehesten die Annahme zu, dass es sich um eine nukleophile Substitution zweiter Ordnung, eine  $S_N2$ -Reaktion handelt [105]. Die Hydroxylgruppen des eingesetzten Glycosylhalogenids müssen dabei durch Acetylgruppen geschützt werden, damit sie nicht selbst in einer nukleophilen Substitution mit weiteren Glycosylhalogenidmolekülen reagieren. Diese Schutzgruppen können nach erfolgreicher Reaktion durch sanfte alkalische Hydrolyse leicht wieder entfernt werden.

Bei der gewünschten Catecholglucuronidsynthese bestand der Hauptunterschied zu der ursprünglich publizierten Königs-Knorr-Reaktion darin, dass statt  $\alpha$ -Acetobromglucose Acetobromo- $\alpha$ -D-glucuronsäuremethylester als Glycosylhalogenid, Catechol anstelle von Methanol und Silber(I)oxid statt Silbercarbonat eingesetzt werden sollte. Zur Durchführung der Synthese wurden verschiedene Lösungsmittel getestet (s. 5.2.1).

Der Reaktionsmechanismus sollte wie bei Königs und Knorr in einer  $S_N2$ -Reaktion verlaufen. Folgendes Schema kann angenommen werden:



**Abb. 5.1.2:** Schema der Glucuronidierungsreaktion von Catechol mit Acetobromo- $\alpha$ -D-glucuronsäuremethylester. Bei der mutmaßlichen  $S_N2$ -Reaktion kommt es zur Inversion am sterischen Zentrum des Glucuronsäureesters unter Ausbildung einer  $\beta$ -D-glycosidischen Bindung.

Das Silbersalz liegt bei der Methode nach Königs und Knorr immer ungelöst vor. Es wird angenommen, dass die Substitutionsreaktion wie in Abb. 5.1.2 dargestellt an der Oberfläche des Feststoffes stattfindet [105].

## 5.2 Ergebnisse und Diskussion

### 5.2.1 Synthese des Catecholglucuronids

#### 5.2.1.1 Synthese der geschützten Catecholglucuronidvorstufe (peracetylierter Catecholglucuronsäuremethylester)

Für die Synthese des Catecholglucuronids war es nötig, zunächst ein Glucuronsäureesterhalogenid zu verwenden, an welchem die Hydroxylgruppen durch Acetylierung geschützt waren. Aus einer nukleophilen Substitution dieses Halogenids mit Catechol im basischen Milieu sollte die Synthese eines peracetylierten Catecholglucuronsäuremethylester resultieren (s. Prinzip der Königs-Knorr-Synthese, 5.1.2). Tatsächlich stellte sich diese zunächst sehr einfach erscheinende Einschrittsynthese als besonders schwierig heraus. Catechol erweist sich

für eine nukleophile Substitution nicht besonders zugänglich. Des Weiteren sind bisher keine Syntheseveruche von Catecholkonjugaten in der Literatur beschrieben worden, was die Methodensuche erschwerte.

Begonnen wurde mit einer leicht modifizierten Königs-Knorr-Methode nach Needs und Kroon [106]. Hier sollte der Acetobromo- $\alpha$ -D-glucuronsäuremethylester in Gegenwart von Silber-(I)-oxid mit dem gewünschten Edukt in Pyridin als Lösungsmittel und  $\text{CaSO}_4$  als Trockenmittel umgesetzt werden. Diese Methode war von den Autoren für die Glucuronidierung von Quercetin an Position 3 beschrieben worden. Sie funktionierte allerdings für Catechol nicht. Die Methode wurde sowohl in Pyridin als auch in Acetonitril durchgeführt. In Acetonitril war gar kein Glucuronidierungsprodukt und in Pyridin ausschließlich das Diglucuronid in sehr geringer Ausbeute nach massenspektrometrischer Analyse erkennbar. Eine Diglucuronidierung sollte durch geringeren Anteil des Zuckerhalogenids im Reaktionsansatz unterdrückt werden, was allerdings lediglich im Ausbleiben sämtlicher Glucuronidierungsprodukte resultierte.

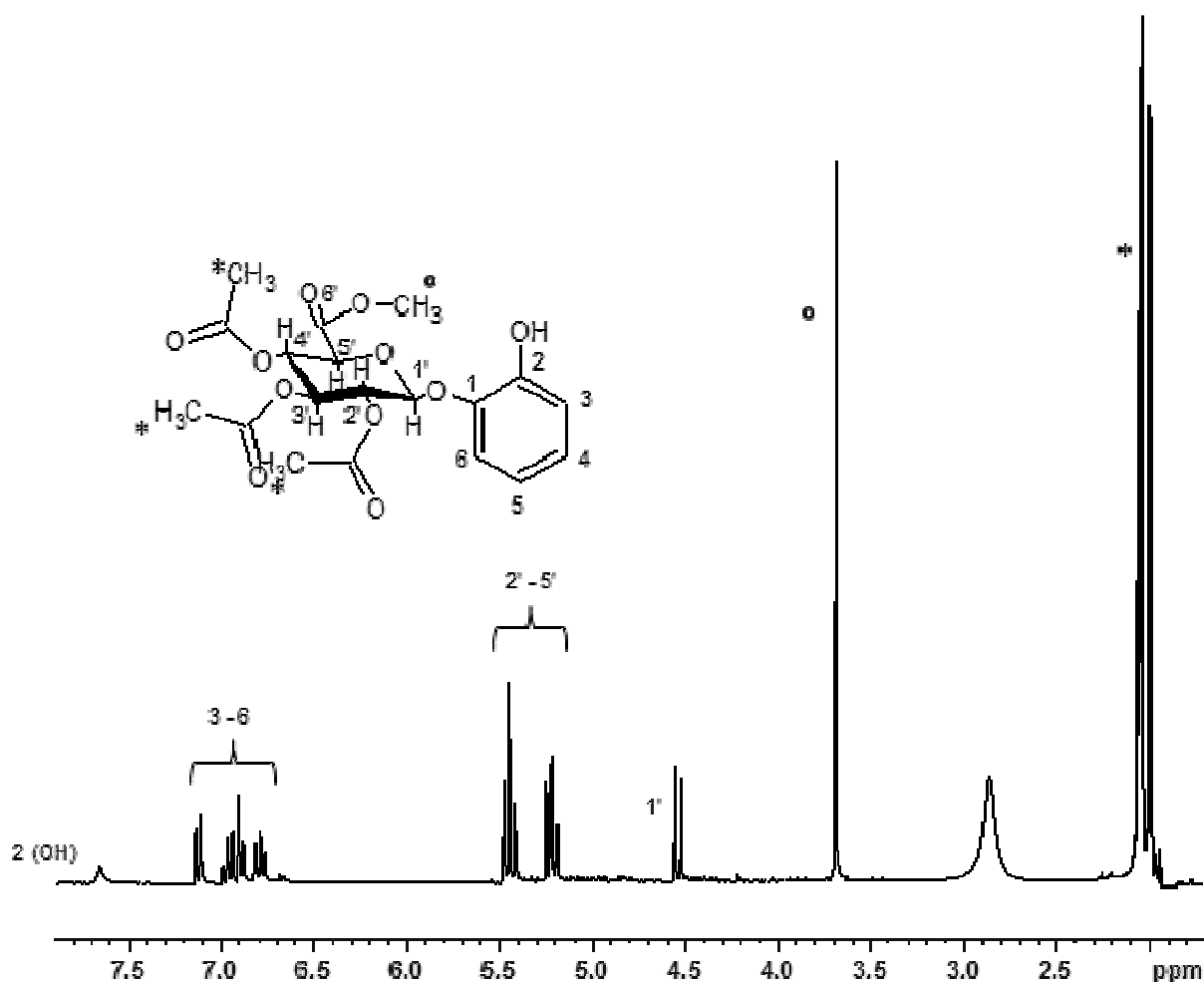
Needs und Kroon schlagen in ihrer Publikation für die Glucuronidierung der 3'-Position von Quercetin, welche der OH-Gruppe in Catechol chemisch ähnlicher ist als die Hydroxylgruppe an 3-Position, 2,3,4-tri-O-acetyl- $\alpha$ -D-glucopyranosyluronsäure-trichloracetimidat als Glucuronsäure-Donor vor. Dieses Edukt wurde ebenso von Lucas et al. [107] für die Glucuronidierung von Hydroxytyrosol, welches als „Hydroxyethylcatechol“ dem Catechol sehr ähnlich ist, beschrieben. Aus finanziellen, praktischen und sicherheitstechnischen Gründen schied diese Synthesemöglichkeit vorzeitig aus.

Stattdessen wurde eine abgewandelte Königs-Knorr-Methode nach González-Manzano et al. [108] angewendet. In dieser Publikation wird beschrieben, dass Acetobromo- $\alpha$ -D-glucuronsäuremethylester in Gegenwart von Kaliumcarbonat mit Catechin zu diversen Glucuroniden umgesetzt wurde, unter anderem zu dem 3'- und 4'-Glucuronid. Aceton diente als Lösungsmittel. Diese Variante führte zwar im Fall von Catechol zu einer geringen Umsetzung mit dem Zuckerhalogenid, allerdings kam es hier zu einer Elimination eines Essigsäuremoleküls aus der peracetylierten Glucuronsäureesterpartialstruktur mit Bildung einer Doppelbindung. Dieses Problem wurde auf den hohen Anteil an  $\text{K}_2\text{CO}_3$  (vierfache Menge zum eingesetzten Glucuroniddonor) im Reaktionsgemisch zurückgeführt. Durch Reduktion dieses Anteils konnte das Eliminationsproblem aber nicht behoben werden.

Eine weitere Variation der Königs-Knorr-Synthese nach Maloney und Hecht [109] wurde ebenfalls versucht. In dieser Veröffentlichung beschreiben die Autoren die Umsetzung eines Kämpferolderivats an 3-Position mit einem Zuckerhalogenid unter Anwesenheit von Silber(I)oxid und Dichlormethan als Lösungsmittel. Die Anwendung dieser Methode mit Catechol, Acetobromo- $\alpha$ -D-glucuronsäuremethylester und  $\text{Ag}_2\text{O}$  in Dichlormethan sowie Molekularsieb als Trocknungsmittel funktionierte, wenn auch nur in einem sehr geringen Ausmaß mit einer Ausbeute von 3,4%. Aufgrund des Mangels an besseren Alternativen wurde diese

schlechte Ausbeute allerdings akzeptiert. Sie konnte genug peracetyliertes Catecholglucuronid für eine Entschützungsreaktion liefern.

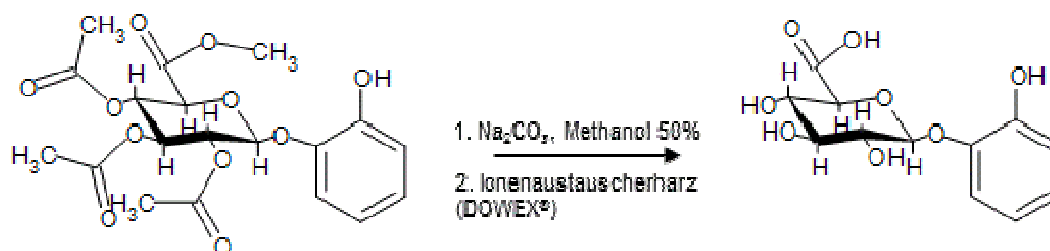
Die Bestätigung, dass dieser erste Syntheseschritt der nukleophilen Substitution von Acetobromo- $\alpha$ -D-glucuronsäuremethylester mit Catechol zu einem peracetylierten Catecholglucuronsäuremethylester erfolgreich war, lieferten NMR- und MS-Ergebnisse. Im Protonenspektrum von Catechol-1-O-(2',3',4'-tri-O-acetyl)- $\beta$ -D-glucuronsäuremethylester war das anomere Proton bei einer chemischen Verschiebung von  $\delta = 4,54$  ppm und einer Signalaufspaltung in ein Duplett leicht zu identifizieren. Die relativ große Kopplungskonstante des anomeren Protons von  $J = 9,1$  Hz ließ auf die gewünschte  $\beta$ -D-Verknüpfung des Catechols mit dem Zuckerderivat schließen [75]. Die neun Protonen der Acetylschutzgruppen ergaben zusammen ein gemeinsames Signal bei  $\delta = 2,04$  ppm, die drei Protonen der Methyl estergruppe zeigten ein gemeinsames Singulett bei  $\delta = 3,67$  ppm. Vier aromatische Protonen im Bereich von  $\delta = 6,75 - 7,12$  ppm, vier weitere Zuckerprotonen im Bereich von  $\delta = 5,19 - 5,45$  ppm sowie eine OH-Gruppe bei  $\delta = 7,65$  ppm konnten außerdem zugeordnet werden (s. Abb. 5.2.1.1). Die massenspektrometrische Analyse bestätigte die Molekülmasse der Substanz von 426 g/mol ( $m/z$  444  $[M+NH_4]^+$ ).



**Abb. 5.2.1.1:** Strukturformel und  $^1\text{H}$ -Spektrum des peracetylierten Catecholglucuronsäuremethylesters in Aceton- $\text{D}_6$ , 300 MHz, 295 K. Die Signale im Protonenspektrum sind mit den zugehörigen Protonen beschriftet.

### 5.2.1.2 Entschützung der geschützten Vorstufe zum Catecholglucuronid

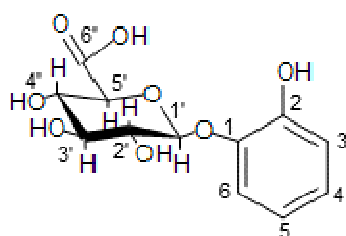
Durch alkalische Hydrolyse des peracetylierten Catecholglucuronsäuremethylesters mit einer wässrig-methanolischen Natriumcarbonatlösung konnten sowohl die Acetyl- als auch die Methylschutzgruppe dieser Vorstufe abgespalten werden (s. Abb. 5.2.1.2, Methode nach Needs und Kroon [106]).



**Abb. 5.2.1.2:** Reaktionsschema der alkalischen Hydrolyse der geschützten Vorstufe zu Catecholglucuronid.

Nach anschließender Ansäuerung des Reaktionsgemischs mit Ionenaustauscherharz und durch nachfolgende Aufreinigung an der semipräparativen HPLC konnte das gewünschte Catecholglucuronid isoliert werden. Bei der Aufreinigung an der semipräparativen HPLC war insbesondere auf ein Ansäuern der Fließmittel zu achten, da die Glucuronsäurepartialstruktur als Säure sonst im Dissoziationsgleichgewicht mit ihrem Carboxylatanion keinen definierten Peak ergibt, sondern zu starkem „Tailing“ neigt. Hierfür wurde Trifluoressigsäure verwendet, da diese flüchtige Säure durch behutsame Rotationsverdampfung (s. experimenteller Teil, 5.3.1.2) nachher wieder entfernt werden kann.

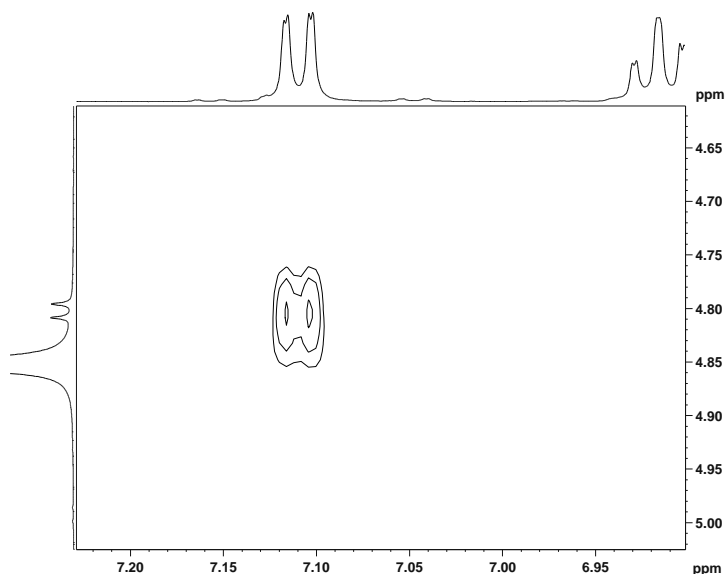
### 5.2.1.3 Strukturaufklärung des synthetisierten Catecholglucuronids



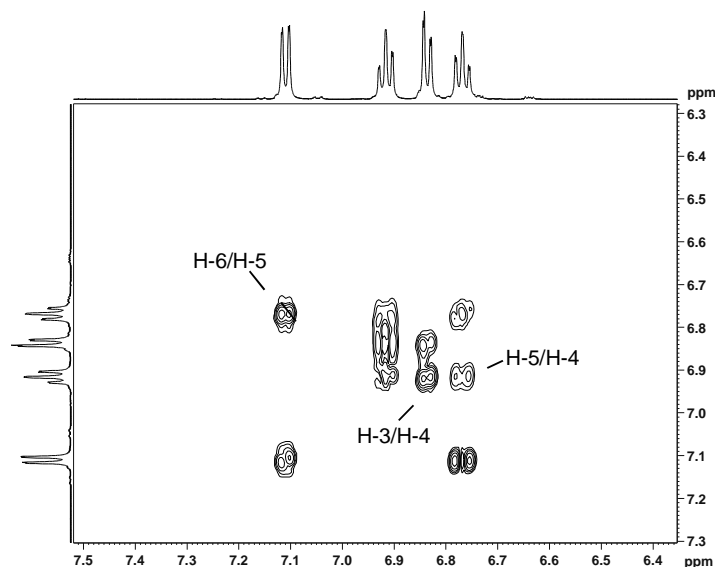
**Abb. 5.2.1.3-1:** Strukturformel des Catecholglucuronids.

Durch zweidimensionale NMR-Experimente konnte die Struktur des Catecholglucuronids vollständig aufgeklärt werden. Aufgrund der chemischen Verschiebung im Protonenspektrum von  $\delta = 4,80$  ppm und der typischen Signalaufspaltung in ein Duplett, konnte das anomere Proton leicht identifiziert werden. Es war somit Ausgangspunkt für die weitere Strukturaufklä-

rung sowie Referenzfläche für das Integral eines Protons. Ähnlich wie bei Salicortin (s. Kapitel 2, 2.2.5.2) konnte hier durch die räumliche Nähe der Protonen 1' und 6 mit Hilfe des NOESY-Spektrums das Signal von H-6 gefunden werden (s. Abb. 5.2.1.3-2). Durch ein COSY-Experiment konnten alle weiteren Signale der aromatischen Protonen zugeordnet werden, da die vicinalen Protonen hier eindeutige Cross-Peaks ergaben (s. Abb. 5.2.1.3-3). Die Aufklärung der Glucuronidpartialstruktur verlief wie die der Glucosepartialstruktur in Salicortin (s. 2.2.5.2) mit Hilfe eines HMBC-Experimentes.



**Abb. 5.2.1.3-2:** Ausschnitt aus dem NOESY-Spektrum von Catecholglucuronid ( $^1\text{H}$ ,  $^1\text{H}$ ). Identifizierung von H-6 ( $\delta = 7,11$  ppm) über Wechselwirkung mit H-1' ( $\delta = 4,80$  ppm). 600 MHz, 298 K, Methanol- $\text{D}_4$ .



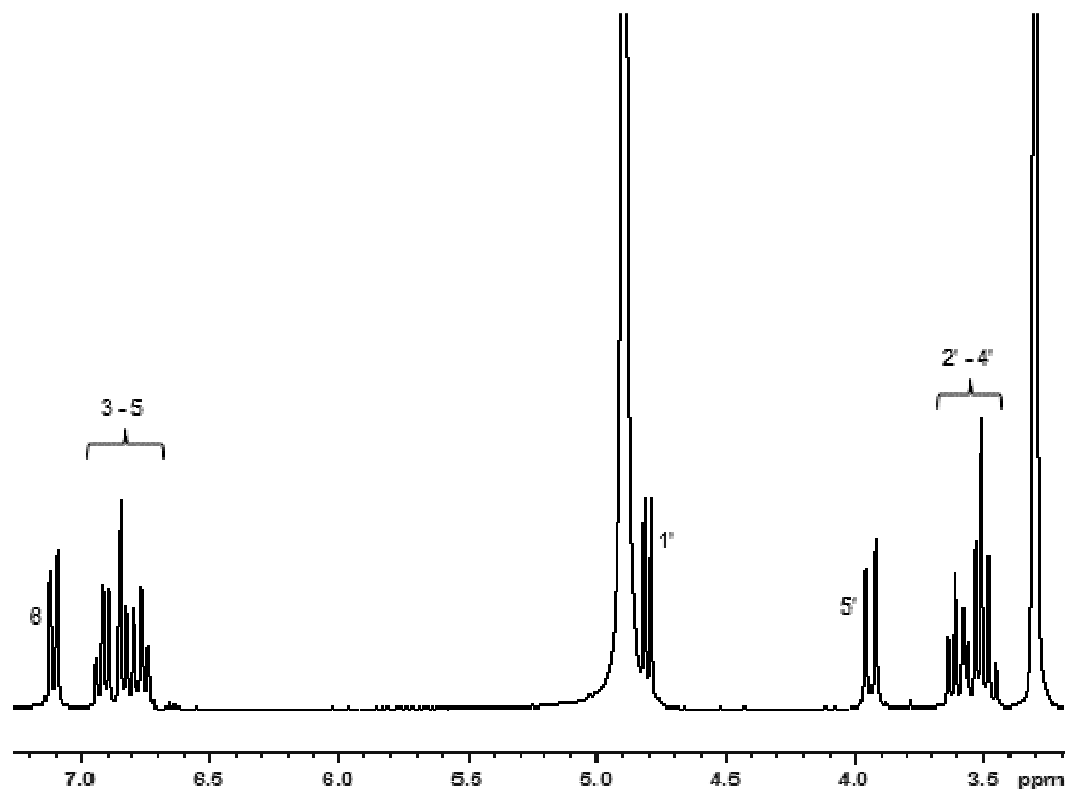
**Abb. 5.2.1.3-3:** Ausschnitt aus dem COSY-Spektrum von Catecholglucuronid ( $^1\text{H}$ ,  $^1\text{H}$ ). Identifizierung von H-5 ( $\delta = 6,77$  ppm), H-4 ( $\delta = 6,92$  ppm) und H-3 ( $\delta = 6,84$  ppm) durch Wechselwirkungen der vicinalen Protonen (markiert). H-6 ( $\delta = 7,11$  ppm) diene als Ausgangspunkt nach Identifizierung durch das NOESY-Spektrum (s. Abb. 5.2.1.3-2). 600 MHz, 298 K, Methanol- $\text{D}_4$ .

Tab. 5.2.1.3 fasst alle NMR-Daten des Catecholglucuronids zusammen. Abbildung 5.2.1.3-4 zeigt das Protonenspektrum. Neben der NMR-Spektroskopie wurde ebenfalls durch die

Massenspektrometrie (ESI-MS-Experimente, s. Kapitel 2, 2.3.2.2.2) die Molekülmasse des Catecholglucuronsäurecarboxylats im Negativ-Modus mit  $m/z$  285  $[M]^-$  bestätigt.

**Tab. 5.2.1.3:** NMR-Daten von Catecholglucuronid (600 MHz  $^1\text{H}$ , 150 MHz  $^{13}\text{C}$ ), 298 K, gelöst in Methanol- $\text{D}_4$ .

$^1\text{H}$	$\delta$ [ppm], Signalaufspaltung, $J$ [Hz]	$^{13}\text{C}$	$\delta$ [ppm]
1'	4,80 d (7,7)	1'	104,6
2'	3,54 m	2'	74,6
3'	3,49 m	3'	77,0
4'	3,61 m	4'	73,0
5'	3,94 d (9,7)	5'	76,7
		6'	172,1
		1	146,6
		2	148,7
3	6,84 dd (1,4; 8,0)	3	117,3
4	6,92 dt (1,3; 7,8)	4	125,2
5	6,77 dt (1,5; 7,8)	5	121,0
6	7,11 dd (1,2; 8,0)	6	119,2

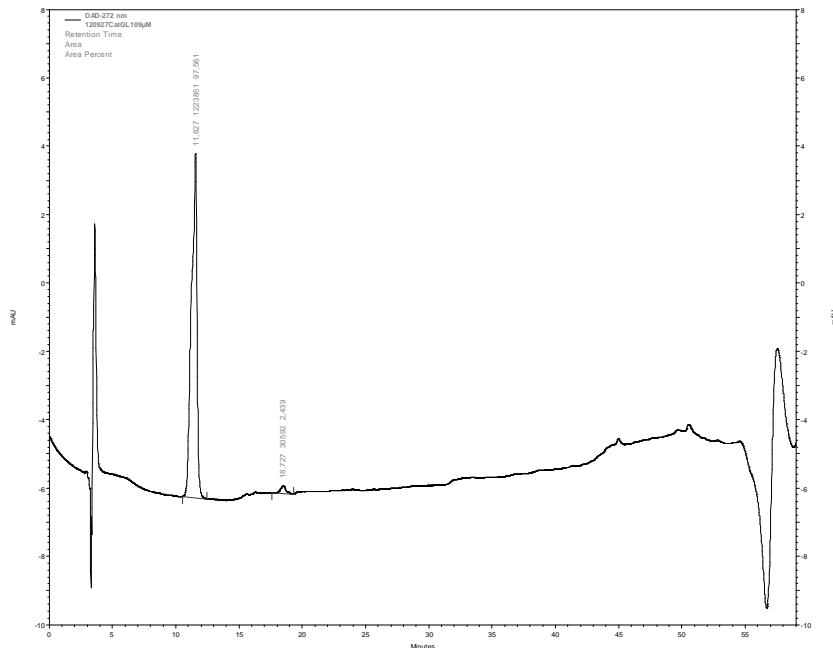


**Abb. 5.2.1.3-4:**  $^1\text{H}$ -Spektrum von Catecholglucuronid in Methanol- $\text{D}_4$ , 300 MHz, 295 K. Die Signale sind mit den zugehörigen Protonen beschriftet.



#### 5.2.1.4 Reiheitsbestimmung des synthetisierten Catecholglucuronids

Die Reinheit von Catecholglucuronid wurde mittels HPLC in seinem UV-Maximum von 272 nm, welches wiederum im HPLC-Chromatogramm des DAD-Detektors ermittelt wurde, mit Hilfe der Normalisierung bestimmt (siehe Abb. 5.2.1.4). Die Reinheit lag bei 97,6% und war damit ausreichend hoch für die sich anschließenden *in vitro* Testungen.

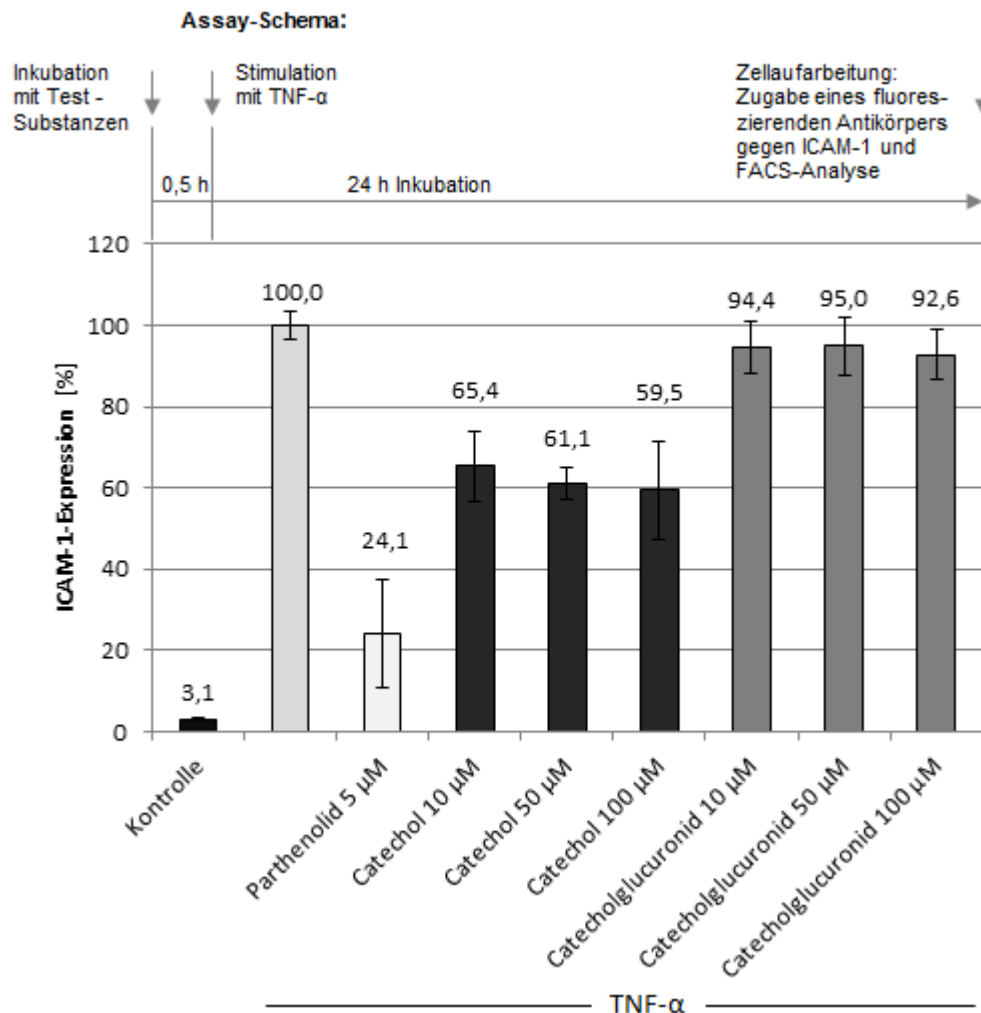


**Abb. 5.2.1.4:** HPLC-Chromatogramm der Reinheitsbestimmung des synthetisierten Catecholglucuronids. Die zur Berechnung der Reinheit integrierten Peaks sind mit ihrem prozentualen Anteil an der Gesamtpeakfläche im Chromatogramm dargestellt.

#### 5.2.2 *In vitro* Aktivität des Catecholglucuronids im ICAM-1 Assay

Sowohl das Catecholglucuronid als auch Catechol selbst wurden auf ihre potentiellen anti-inflammatorischen Eigenschaften im ICAM-1 Assay (Erläuterungen zum Assay s. Kapitel 3 unter 3.1.1 und 3.1.2) getestet. Catechol konnte in den getesteten Konzentrationen von 10, 50 und 100 µM die TNF-α induzierte ICAM-1-Expression reduzieren, was auf potentiell entzündungshemmende Eigenschaften hinweist (s. Abb. 5.2.2). Die prozentualen ICAM-1-Expressionen bei allen getesteten Catecholkonzentrationen waren hoch signifikant verschieden zu der ICAM-1-Expression, welche bei reiner TNF-α-Stimulation gemessen wurde ( $p < 0,001$ ). Allerdings war keine konzentrationsabhängige Hemmung zwischen 10 und 100 µM Catechol zu beobachten. Die gleichen getesteten Konzentrationen des Catecholglucuronids zeigten keine bis fast keine Hemmung der TNF-α induzierten ICAM-1-Expression. Nur bei

Catecholglucuronid in 100  $\mu\text{M}$  war ein signifikanter Unterschied zu der ICAM-1-Expression, welche bei reiner TNF- $\alpha$ -Stimulation gemessen wurde, festzustellen ( $p < 0,05$ ; Statistik s. Kapitel 2.3.5).



**Abb. 5.2.2:** ICAM-1-Expression nach TNF- $\alpha$  Stimulation und 24 h Inkubation mit verschiedenen Catechol- und Catecholglucuronid-Konzentrationen; Parthenolid diente als Positivkontrolle; nur mit TNF- $\alpha$  behandelte Zellen dienten der Ermittlung von 100% ICAM-1-Expression;  $n = 3$  in Duplikaten; Mittelwert  $\pm$  StabW.

Catechol war nach Einnahme eines Weidenrindenextraktes oder nach Salicortingabe nicht frei im Serum der Probanden oder Ratten, sondern nur in Form seiner Konjugate zu finden (s. Kapitel 4 und 7). Es sollten daher die Konjugate synthetisiert und im ICAM-1 Assay getestet werden, um eine physiologisch höher relevante Aussage über die entzündungshemmenden Eigenschaften von Catechol *in vitro* zu erhalten (s. 5.1.1). Es gelang aus Zeitgründen nur das Catecholglucuronid zu synthetisieren. Wie sich später herausstellte, war dies nicht das Hauptkonjugat, sondern das Catecholsulfat. Dennoch kam das Catecholglucuronid zu einem geringen Anteil im Rattenserum vor (s. Kapitel 4) und wurde daher im ICAM-1 Assay getestet. Im Gegensatz zu dem unkonjugierten Catechol zeigte das Catecholglucuronid in

den getesteten Konzentrationen (bis 100  $\mu\text{M}$ ) keine nennenswerte Aktivität im ICAM-1 Assay (s. Abb. 5.2.2).

Auch andere Arbeitsgruppen testeten Polyphenolmetabolite, um physiologisch relevantere Aussagen *in vitro* zu erhalten mit dem Ergebnis, dass die Konjugate im Gegensatz zu den unkonjugierten Molekülen häufig keine Aktivität mehr zeigten [100]. Da sich aber wiederum die unkonjugierte „Wirkform“ häufig in den betroffenen Geweben wiederfinden ließ [110], müssen einige Zielgewebe zur Dekonjugation in der Lage sein [111]. Die Glucuronide oder Sulfate sind im Blut meistens stabiler als die unkonjugierten Moleküle. Damit wurde postuliert, dass sie als geeignetere Transportformen die aktiven Substanzen an den Wirkort bringen, um sie dort durch dekonjugierende Enzyme in den betroffenen Geweben wieder als unkonjugierte „Wirkform“ freizugeben [111].

Catechol konnte *in vitro* die TNF- $\alpha$  induzierte ICAM-1-Expression von Endothelzellen reduzieren, das Konjugat Catecholglucuronid jedoch nicht. Im Zellkulturmedium wie auch im Serum liegt das Catecholglucuronid aufgrund seiner Acidität eher als deprotoniertes Carboxylatanion vor. Falls keine speziellen Transportmechanismen in den Zellen vorhanden sind, kann in dieser sehr polaren Form das Molekül die Membran der Endothelzellen nur schlecht passieren und somit auch nicht in das Zellinnere gelangen. Catechol hingegen kann durch seine lipophileren Eigenschaften die Zellenmembran durchdringen und seine Wirkung in der Zelle entfalten. Aus diesem Grund war vermutlich Catechol, nicht aber Catecholglucuronid im ICAM-1 Assay aktiv. Wie oben erläutert, gibt es in bestimmten Geweben Deglucuronidierungsmechanismen, sodass die polaren Konjugate wieder in ihre unpolare Ursprungssubstanz hydrolisiert werden können. Dies wurde speziell auch in entzündeten Geweben beobachtet [112]. Catecholglucuronid als inaktives Molekül im ICAM-1 Assay könnte somit als stabile Transportform des aktiven Catechols dennoch zur Wirkung kommen, wenn es vom entzündeten Zielgewebe dekonjugiert und als entzündungshemmendes Catechol in die Zelle aufgenommen werden würde.

### 5.2.3 Zusammenfassung und Ausblick

In Kapitel 5 konnte durch eine Variante der Methode nach Königs und Knorr das Catecholglucuronid dargestellt werden, wenn auch in sehr kleiner Ausbeute. Dieses Catecholkonjugat wurde *in vitro* im ICAM-1 Assay auf seine entzündungshemmenden Eigenschaften getestet, da Catechol selbst als freies Molekül im Blut nach oraler Aufnahme von Salicortin oder Weidenrindenextrakt (s. Kapitel 4 und 7) nicht detektierbar war, sondern nur in Form seiner Konjugate. Dies sollte somit die realen Verhältnisse an einem potentiellen Wirkort, dem Endothel, *in vitro* besser imitieren. Das Catecholglucuronid zeigte hierbei keine Aktivität. Die

komplexe Situation in einem entzündeten Gewebe kann im ICAM-1 Assay nicht komplett imitiert werden. Es wird nur ein Teil der ablaufenden physiologischen Entzündungsreaktionen dargestellt. Dass vor allem entzündete Gewebe in der Lage sind Konjugate wieder in ihre Ursprungsform zu dekonjugieren, kann hierbei nicht erfasst werden. Es ist zu vermuten, dass Catechol durch peripher wirkende Glucuronidasen und Sulfatasen auch als Konjugat indirekt entzündungshemmende Eigenschaften aufweist. Um dies zu bestätigen, könnten *in vivo* Versuche mit Entzündungsmodellen im Tier durchgeführt werden. Hierbei könnten in einer Testgruppe i.v. Catecholkonjugate und in einer weiteren Catechol peroral verabreicht werden. Wenn eine vorher ausgelöste Entzündungsreaktion in beiden Gruppen ähnlich reduziert werden kann, wäre die entzündungshemmende Eigenschaft von Catecholkonjugaten *in vivo* bestätigt. Dass dies auf peripher wirkende dekonjugierende Enzyme zurückzuführen ist, könnte durch gleichzeitige Gabe von enzymhemmenden Substanzen wie dem  $\beta$ -Glucuronidase hemmenden D-Gluconsäure-1,4-lacton (vgl. [113]) und dem mutmaßlichem Ausbleiben des entzündungshemmenden Effekts überprüft werden. Allerdings wäre hier die Untersuchung mit einem gleichzeitig applizierten Sulfatasehemmer wesentlich interessanter, da sich in Kapitel 4 und 7 gezeigt hatte, dass Catechol hauptsächlich zum Sulfat konjugiert wurde. Hier sind bisher nur Steroidsulfatase-Hemmstoffe entwickelt worden, denn sie stellen eine Therapie des Mammakarzinoms dar [114-116]. Eventuell blockieren diese Hemmstoffe auch andere Sulfatasen. Dies müsste experimentell untersucht oder neue Sulfatase-Hemmstoffe für diesen Ansatz entwickelt werden.

Aus Zeitgründen konnte nur das Catecholglucuronid synthetisiert und im ICAM-1 Assay getestet werden. Das Catecholsulfat stellte sich erst später im Verlauf dieser Arbeit als Hauptmetabolit des Catechols heraus und konnte daher nicht mehr synthetisiert und getestet werden. Aufgrund seiner dem Catecholglucuronid ähnlich hohen Polarität ist aber auch hier davon auszugehen, dass dieses Konjugat im ICAM-1 Assay keine Aktivität aufweisen würde. Das Catecholsulfat müsste für die Untersuchung dieser Vermutung sowie für die oben beschriebene Untersuchung des Einflusses von Sulfatasen auf die pharmakologische Wirkung des Catecholsulfats noch dargestellt werden.

## 5.3 Experimenteller Teil

### 5.3.1 Synthese des Catecholglucuronids

#### 5.3.1.1 Synthese des geschützten (peracetylierten) Catecholglucuronids

Zunächst wurden Schlenkkolben, Trockenrohr und Molekularsieb (4 Å) über mehrere Tage im Ofen bei 120 °C getrocknet. Daraufhin trocknete das Lösungsmittel Dichlormethan mindestens über Nacht durch Zugabe des Molekularsiebs.

0,51 mmol Catechol (entsprechen 56,2 mg) und 1,02 mmol Ag<sub>2</sub>O (entsprechen 236,4 mg) wurden zusammen mit ca. 0,5 g Molekularsieb und 10 ml Dichlormethan in einen unter Stickstoff und Lichtausschluss versetzten Schlenkkolben gegeben und bei 38 °C in ein Wasserbad gehängt. Nach Aufsetzen eines Trockenrohrs wurde die Mischung kurz mittels Magnetrührer und Rührfisch gerührt. 2,04 mmol Acetobromo- $\alpha$ -D-glucuronsäuremethylester wurden in 5 ml Dichlormethan gelöst dazugegeben und der Reaktionsansatz unter Stickstoff 4,5 Stunden gerührt.

Der Abbruch der Reaktion erfolgte durch Filtration des Reaktionsansatzes über Celite®-Material. Der Schlenkkolben und das Filtermaterial wurden mit ca. 30 ml Dichlormethan in mehreren Schritten nachgespült.

Aus dem Filtrat wurde das Lösungsmittel durch Rotationsverdampfung (Gerät s. Kapitel 2 unter Tab. 2.3.1.1-1) entfernt und dabei trocken auf 1,5 g Kieselgel aufgezogen, um einen ersten Aufreinigungsschritt des Reaktionsgemischs mit der Flash-Chromatographie anzuschließen. Dieser verlief an Normalphasenmaterial mit einem Fließmittelsystem aus Hexan und Ethylacetat (Bedingungen s. Tabelle 5.3.1.1-1, Gerät s. Kapitel 2 unter Tab 2.3.1.2). Die Fraktion, welche zwischen 580 und 980 ml eluierte, wurde gesammelt und das Lösungsmittel durch Rotationsverdampfung entfernt.

**Tab. 5.3.1.1-1:** Flash-Chromatographie-Bedingungen zur Aufreinigung des Syntheseansatzes.

Fließmittel	
Fließmittel A	Hexan (p.A., ≥99,25%, Acros Organics, Geel, Belgien), entgast
Fließmittel B	Ethylacetat (p.A., ≥99,99%, Acros Organics, Geel, Belgien), entgast
Gradient	
Min	Fließmittelzusammensetzung [%B in A]
0 - 2,5	30%
2,5 - 7,5	30% → 40%
7,5 - 17,5	40%
17,5 - 27,5	40% → 50%
27,5 - 37,5	50%
Einstellungen	
Fließgeschwindigkeit	30 ml/min
Sammlung pro Glas (integrierter Fraktionssammler)	20 ml
Detektionswellenlänge am UV-Detektor	275 nm
Trennsäule	
Normalphasensäule mit ca. 25 g Kieselgel (selbstgepackt): SVP Si60 D26-Kartusche von Merck Chimie SAS, Fontenay-sous-Bois, Frankreich. Kieselgel 60 mit 0,063-0,200 mm Korngröße (Merck, Darmstadt, Deutschland) wurde für die Trockenaufgabe und als Säulenmaterial verwendet.	

Diese Fraktion wurde anschließend wieder in ca. 1 ml Isopropanol 20% (HPLC-Qualität und Wasser Millipore®) gelöst und in zwei Schritten an der semipräparativen HPLC aufgetrennt. Die Aufreinigung erfolgte an RP18-Material als stationäre Phase mit Wasser und Isopropanol als Fließmittelsystem (Gerät und Bedingungen siehe Tabelle 5.3.1.1-2). Es wurde der Peak gesammelt, welcher in Minute 21 eluierte, das Lösungsmittel unter Stickstoff entfernt und nach Differenzwägung eine Masse von 7,4 mg bestimmt.

**Tab. 5.3.1.1-2:** Semipräparative HPLC und ihre Bedingungen bei der Abtrennung des geschützten Catecholglucuronids.

Fließmittel	
Fließmittel A	H <sub>2</sub> O (Millipore®, Anlage s. Tab. 2.3.1.1-1)
Fließmittel B	Isopropanol (Rotisol®, für HPLC, Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland)
Gradient	
Min	Fließmittelzusammensetzung [%B in A]
0 – 2	20%
2 – 5	20% → 30%
5 – 16	30%
16 – 18	30% → 40%
18 – 23	40%
23 – 26	40% → 80%
26 – 29	80%
Einstellungen	
Fließgeschwindigkeit	5 ml/min
Detektionswellenlänge	273 nm
Gerät und Software	
Varian Prostar semipräparative HPLC, ehemals Varian Deutschland GmbH, Darmstadt, Deutschland mit folgenden Elementen:	
2 Pumpen	Prostar Model 210
DAD	Prostar Model 335
Software	Galaxy
Trennsäule	
Knauer RP18 Eurospher 16 mm x 250 mm, Knauer GmbH, Berlin, Deutschland	

Nach Analyse des Protonenspektrums und der Molekülmasse (Massenspektrometer s. Kapitel 2 unter 2.3.2.2.2) zeigte sich, dass es sich bei der abgetrennten Substanz um das geschützte (= peracetylierte) Catecholglucuronid handelte. Das Protonenspektrum wurde in deuteriertem Aceton an einem Avance 300 Gerät mit 300.13 MHz der Firma Bruker (Bruker Corporation, Billerica, USA) aufgenommen.

#### 5.3.1.2 Entschützung des peracetylierten Catecholglucuronids zu Catecholglucuronid

Das gesamte geschützte Catecholglucuronid wurde in 10 ml Methanol 50% gelöst, 300 µl einer 0,5 M Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>-Lösung hinzugefügt und zusammen eine Stunde bei Raumtemperatur unter Stickstoff gerührt. Es schloss sich das Kühlen des Reaktionsansatzes in einem Eisbad und um einen pH-Wert von 3 zu erzielen, die Zugabe von Ionenaustauscherharz an. Dieser Ansatz wurde über einen Spritzenvorsatzfilter filtriert und mit zunächst 5 ml Methanol 50%, dann mit 5 ml Methanol 100% nachgespült. Aus diesem Filtrat wurde das Lösungsmittel unter Stickstoff entfernt. Zur Aufreinigung des getrockneten Filtrats wurde dieses wieder in 1 ml Wasser (Millipore®) gelöst und in insgesamt 3 Schritten an der semipräparativen HPLC aufgetrennt (Bedingungen siehe Tab. 5.3.1.2). Als stationäre Phase diente RP18-Material. Das Fließmittelsystem setzte sich aus Wasser und Acetonitril, beide mit Trifluoressigsäure angesäuert, zusammen. Der Peak, welcher zwischen Minute 17 und 18 eluierte, wurde gesammelt. Trifluoressigsäure ist eine flüchtige Säure und konnte daher durch behutsame Rotationsverdampfung zusammen mit Acetonitril in mehreren Schritten aus der Lösung entfernt werden. Hierbei wurde je Schritt nicht mehr als die Hälfte des Lösungsmittels aus der Lösung entfernt, danach das entfernte Volumen wieder mit Wasser (Millipore) ergänzt und dieser Schritt insgesamt zehnmal wiederholt. Nach Einfrieren unter Rotation erfolgte die Gefrier-trocknung der in Wasser gelösten Substanz (Geräte s. Kapitel 2 unter Tab. 2.3.1.1-1). Die Auswaage der Substanz betrug 3,4 mg. Dass es sich hierbei um das Catecholglucuronid handelte, wurde durch Aufnahme eines Protonen- (Lösungsmittel und Gerät s. 5.3.1.1) und Massenspektrums bestätigt (Gerät s. Kapitel 2 unter 2.3.2.2.2).

**Tab. 5.3.1.2:** Bedingungen bei der Isolierung des Catecholglucuronids an der semipräparativen HPLC (Gerät und Trennsäule siehe Tab. 5.3.1.1-2).

<b>Fließmittel</b>	
Fließmittel A	H <sub>2</sub> O (Millipore) mit 0,1% TFA ( $\geq 95\%$ , Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland)
Fließmittel B	Acetonitril (Lichrosolv®, Merck, Darmstadt, Deutschland) mit 0,1% TFA ( $\geq 95\%$ , Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland)
<b>Gradient</b>	
Min	Fließmittelzusammensetzung [%B in A]
0 – 5	5%
5 – 7	5% → 10%
7 – 10	10%
10 – 20	10% → 30%
20 – 22	30% → 5%
22 – 25	5%
<b>Einstellungen</b>	
Fließgeschwindigkeit	5 ml/min
Detektionswellenlänge	272 nm

### 5.3.1.3 Strukturaufklärung und Reinheitsbestimmung des Catecholglucuronids

Die genaue Struktur des Catecholglucuronids wurde durch zweidimensionale NMR-Experimente aufgeklärt. Die Experimente, Vorhergehensweise und das Gerät wurden bereits in Kapitel 2 unter 2.3.2.2.1 beschrieben und prinzipiell genauso für die Strukturaufklärung des Catecholglucuronids angewandt. Die Substanz wurde für die Durchführung der NMR-Experimente in 600  $\mu$ l deuteriertem Methanol gelöst. Die Molekülmasse des Catecholglucuronids wurde durch ESI-MS-Experimente (Gerät s. 2.3.2.2.2) und die Reinheit mit der analytischen HPLC bestimmt. Nach Lösen der Substanz in Methanol und Verdünnung zu einer 108 mikromolaren Lösung, wurden für die Reinheitsbestimmung die Inhaltsstoffe der Lösung mittels HPLC aufgetrennt und mit einem DAD detektiert (Bedingungen s. Tab. 5.3.1.3). Die Peakflächen des erhaltenen Chromatogramms wurden im UV-Maximum von 272 nm, welches mit Hilfe der HPLC-Software ermittelt wurde, bestimmt. Das Verhältnis der Peakfläche des Catecholglucuronids zur Gesamtpeakfläche im Chromatogramm gab die Reinheit des Stoffes in Prozent wieder (Normalisierung). Eventuelle Systempeaks wurden durch einen HPLC-Lauf mit derselben Methode und Injektion von reinem Lösungsmittel (Methanol, HPLC-Qualität) ermittelt und nicht mit in die Berechnung mit einbezogen.



**Tab. 5.3.1.3:** HPLC-Bedingungen (Gerät s. Tab. 2.3.2.3) der Reinheitsermittlung von Catecholglucuronid.

Fließmittel	
Fließmittel A	H <sub>2</sub> O (Millipore <sup>®</sup> ) mit 0,1% H <sub>3</sub> PO <sub>4</sub> (p.A., 85%, Merck, Darmstadt, Deutschland)
Fließmittel B	Methanol (Lichrosolv <sup>®</sup> , Merck, Darmstadt, Deutschland)
Gradient	
Min	Fließmittelzusammensetzung [%B in A]
0 – 45	20% → 80%
45 – 50	80%
50 – 51	80% → 20%
51 – 60	20%
Einstellungen	
Temperatur Autosampler	4 °C
Temperatur Säulenofen	40 °C
Fließgeschwindigkeit	1 ml/min
Injektionsvolumen	20 µl
Detektionswellenlänge	272 nm
Trennsäule	
Lichrocart <sup>®</sup> 250-4 mm Kartusche mit Purospher Star <sup>®</sup> RP18-e (5 µm) und Vorsäule, Merck, Darmstadt, Deutschland	

#### 5.3.1.4 Sonstige verwendete Chemikalien und Verbrauchsmaterialien in Kapitel 5.3.1

**Tab. 5.3.1.4:** Verwendete Chemikalien/Verbrauchsmaterialien in Kapitel 5.3.1.

Name	Qualität	Hersteller
Catechol	≥ 99%	Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland
Ag <sub>2</sub> O	62,5%-100,5%	Merck, Darmstadt, Deutschland
Molekularsieb 4 Å	p. A.	Fluka, Buchs, Schweiz
Dichlormethan	p. A., ≥ 99,99%	Acros Organics, Geel, Belgien
Acetobromo-α-D-glucuronsäuremethylester = (2,4,3-Tri-O-acetyl-α-D-Glycopyranosylbromid)uronsäuremethylester	> 95%	Resealife Chem Science, Burgdorf, Schweiz
Celite <sup>®</sup> 560	Korngröße ≤ 148,5 µm	Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland
Aceton-D <sub>6</sub>	99,8%	Deutero GmbH, Kastellaun, Deutschland
Methanol-D <sub>4</sub>	99,8%	Deutero GmbH, Kastellaun, Deutschland
Natriumcarbonat (Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub> )	p.A.	Riedel de Haen, Seelze, Deutschland
Methanol Lichrosolv <sup>®</sup>	HPLC-Qualität	Merck, Darmstadt, Deutschland
Ionenaustauscherharz = DOWEX <sup>®</sup> 59 WX 4	~65%	Fluka, Buchs, Schweiz
Spritzenvorsatzfilter Minisart 16534 0,2 µm Porengröße		Sartorius AG, Göttingen, Deutschland

#### 5.3.2 ICAM-1 Assay von Catecholglucuronid und Catechol

Sowohl das Catecholglucuronid als auch Catechol selbst wurde in den drei jeweils gleichen Konzentrationen von 10, 50 und 100 µM im ICAM-1 Assay getestet. Als Lösungsmittel für die Stammlösungen diente DMSO, welches aber durch nachfolgende Verdünnungsschritte mit Zellkulturmedium die Endkonzentration von 0,1% nie überschritt. Substanzaufgabe, Stimula-

tion der Zellen und Messung der ICAM-1-Expression verhielten sich wie in Kapitel 3.3.1.1.1 - 3.3.1.1.4 beschrieben. Alle Konzentrationen wurden dreimal in Duplikaten getestet.

## 6. Entzündungshemmende Eigenschaften von Salicortin *in vivo*

### 6.1 Hintergrund

#### 6.1.1 Hintergrund der *in vivo* Testung von Salicortin

In Kapitel 3 wurde bereits auf die Komplexität physiologischer Entzündungsgeschehen eingegangen. Bestimmte Teilbereiche von Entzündungsreaktionen können *in vitro* simuliert werden. Im ICAM-1 Assay in Kapitel 3 wurde ein Teil eines Entzündungsmechanismus *in vitro* simuliert, genauere Aussagen über tatsächlich stattfindende Entzündungsreaktionen *in vivo* kann dieser und auch jeder andere *in vitro* Assay jedoch nicht liefern. Solche Assays sind ein gutes Werkzeug, um Substanzen nach ihrem pharmakologischen Potential zunächst zu screenen. Wenn sie in diesen Assays eine Aktivität zeigen, sollte sich die Testung in einem passenden Tiermodell anschließen, um die *in vivo* Relevanz der *in vitro* Ergebnisse zu überprüfen [117]. So können die *in vivo* Versuche auf ein notwendiges Maß reduziert werden. Ohne *in vivo* Versuche kommt man bei der Entwicklung neuer Wirkstoffen allerdings nicht aus, da die *in vitro* Beobachtungen sich nicht zwangsläufig auf die konzertierten Abläufe in einem lebenden Organismus übertragen lassen und daher ihre tatsächliche Wirkung in diesem nachgewiesen werden muss („*in vitro* hypothesis, *in vivo* veritas“ [118]), [119]. Folglich wurde für die *in vivo* Testung von Salicortin ein Entzündungsmodell gewählt: die Carra-geen-induzierten Entzündung im „Six-day-old air pouch Modell“. Hierbei sollte vor allen Dingen untersucht werden, ob sich der in Kapitel 4 beobachtete *in vitro* Abbau von Salicortin zu Catechol auf die entzündungshemmenden Eigenschaften von Salicortin auswirkt. Neben Catechol wurde Salicortin noch zu Salicylsäure metabolisiert (s. Kapitel 4). Dass Salicylsäure antiphlogistische Eigenschaften hat, ist seit langem bekannt [7, 14, 120]. Aus Salicortin können demnach zwei entzündungshemmende Moleküle, das Catechol und die Salicylsäure entstehen. Um den Beitrag von Catechol am Gesamteffekt von Salicortin in Abgrenzung zur Salicylsäure abschätzen zu können, sollten im *in vivo* Modell sowohl Salicortin als auch Salicin äquimolar getestet werden. Aus Salicin kann nach oraler Aufnahme nur Salicylsäure entstehen und in äquimolarer Dosierung zu Salicortin auch nur so viel, wie aus Salicortin entstehen könnte. Wenn eine Überlegenheit von Salicortin im *in vivo* Entzündungsmodell gegenüber Salicin festzustellen wäre, dann wäre diese demnach auf das entstehende Catechol zurückzuführen.

### 6.1.2 Carrageen-induzierte Entzündung im „Six-day-old air pouch Modell“ als Entzündungsmodell *in vivo*

Hierbei handelt es sich um ein Tiermodell einer akuten Entzündung, das entweder an Mäusen oder an Ratten durchgeführt wird. Den Tieren wird über sechs Tage Luft subkutan an dieselbe Stelle injiziert. Eine Entzündung wird dadurch ausgelöst, dass nach 6 Tagen in dieses „air pouch“ eine wässrige Carrageen-Lösung injiziert wird. Aufgrund der wiederkehrenden mechanischen Belastung durch das Luftkissen, differenzieren die Zellen im „air pouch“ so, dass sie den Zellen im Synovium, der Gelenksinnenhaut, sehr ähnlich werden [121]. Dies hat den Vorteil, dass die nachfolgend induzierte Entzündung die der Gelenkentzündung sehr nahe kommt und sich dieses Modell daher insbesondere für die Studie von Wirkstoffen eignet, welche bei entzündlichen Gelenkserkrankungen eingesetzt werden. Weidenrindenextraktpräparate sind unter anderem bei rheumatischen Erkrankungen, welche mit Gelenkentzündungen häufig einhergehen, indiziert (s. Kapitel 1 unter 1.2.2, 1.3.2, 1.7). Aus diesem Grund ist die Carrageen-induzierte Entzündung im „Six-day-old air pouch Modell“ ein geeignetes *in vivo* Modell für die Untersuchung von Salicortin als ein möglicher anti-inflammatorischer Wirkstoff aus der Weidenrinde.

Durch die lokal reizende Wirkung von Carrageen wird die Entzündung im „air pouch“ ausgelöst. Diese macht sich durch vermehrte Bildung eines Exsudats bemerkbar, welches sich im „air pouch“ ansammelt und dadurch relativ leicht entnommen und somit analysiert werden kann. In diesem Exsudat sammeln sich bestimmte Entzündungsmarker wie Leukozyten, Eikosanoide (Prostacycline, Leukotriene und Prostaglandine (insbesondere PGE<sub>2</sub>)) und Zytokine (IL-1  $\beta$ , IL-6 und TNF- $\alpha$ ) an [36, 122, 123]. Das Ausmaß der Entzündung kann damit durch die Quantifizierung der Exsudatmenge und der darin enthaltenen Entzündungsmarker erfolgen. Die Tiere werden dabei in verschiedene Gruppen aufgeteilt. Zwei Kontrollgruppen dienen der Ermittlung der vollständigen, bzw. der ausbleibenden Entzündungsreaktion durch Carrageen-Injektion ohne Komedikation, bzw. durch Injektion einer isotonischen Salzlösung [36]. Je nach Fragestellung wird in einer bestimmten Zeit vor Carrageen-Injektion in einer weiteren Testgruppe die zu untersuchende Substanz den Tieren verabreicht. Hat die Substanz antiphlogistische Eigenschaften, ist die gebildete Exsudatmenge und/oder die gebildete Menge an Entzündungsmarkern im Vergleich zu der Carrageenkontrollgruppe bei vollständiger Entzündungsreaktion geringer.

Bei der rheumatoiden Arthritis und in fortgeschrittenem Stadium der Gelenksarthrose werden die Entzündungsmarker hauptsächlich im Exsudat des entzündeten Gelenks gebildet [124, 125]. Bei Patienten mit rheumatoider Arthritis wurde eine erhöhte Konzentration von einigen Zytokinen allerdings nicht nur in der Flüssigkeit entzündeter Gelenke, sondern auch im Plasma festgestellt. Hierbei spielen vor allem die Interleukine-1  $\alpha$  und  $\beta$  eine wichtige Rolle

[126, 127]. Die lokale Entzündung hat damit auch systemische Auswirkungen. Für die Carrageen-induzierte Entzündung im „Six-day-old air pouch Modell“ gibt es diesbezüglich widersprüchliche Angaben. Romano et al. [122] konnten keine Anhaltspunkte für eine systemische Infektion finden, da sie bei diesem Entzündungsmodell in der Maus weder eine erhöhte Expression von IL-1, noch von IL-6 oder TNF- $\alpha$  im Serum der Tiere finden konnten. Khayyal et al. [36] hingegen zeigten deutliche Anhaltspunkte für eine systemische Auswirkung der Entzündungsreaktion bei der Anwendung dieses Entzündungsmodells in Wistar-Ratten. Hier wurden erhöhte Serumkonzentrationen von IL-6, IL-1  $\beta$  und TNF- $\alpha$  in der Carrageen-Gruppe gegenüber der Kontrollgruppe beobachtet. Die Bestimmung des Ausmaßes einer Entzündung kann somit nicht nur durch die Quantifizierung der Entzündungsparameter im Exsudat, sondern gegebenenfalls auch im Plasma oder Serum erfolgen.

#### 6.1.3 Quantifizierte Entzündungsmarker im *in vivo* Modell

Wie in 6.1.2 erläutert, kann das Ausmaß der provozierten Entzündung im „Six-day-old air pouch Modell“ durch die Quantifizierung der vermehrt gebildeten Entzündungsmarker im Exsudat und teilweise auch im Plasma der Tiere erfasst werden. In der vorliegenden *in vivo* Studie mit Salicortin wurden folgende, im Weiteren näher erläuterte Entzündungsmarker im Exsudat, im Plasma oder auch in beiden Matrices quantifiziert:

##### 6.1.3.1 Zytokine

###### 6.1.3.1.1 Interleukin 1 beta (IL-1 $\beta$ )

Interleukin 1 beta ist ein wichtiger Entzündungsmediator. Bei diesem Zytokin handelt es sich um ein Polypeptid der Interleukin 1-Familie. Neben IL-1  $\beta$  sind außerdem IL-1  $\alpha$  und IL-1Ra bekannt. IL-1  $\alpha$  und IL-1  $\beta$  können von verschiedenen Zellen gebildet werden, vor allem durch Makrophagen, Endothelzellen und Lymphozyten [127]. Durch Bindung an den IL-1 Rezeptor kommt es unter anderem zur vermehrten Bildung von Phospholipase A<sub>2</sub> (PLA<sub>2</sub>), Adhäsionsmolekülen am Endothel (z.B. ICAM-1), induzierbarer NO-Synthase (iNOS) und Cyclooxygenase 2 (COX 2) [128]. Dies bewirkt wiederum, dass proinflammatorische und pyrogene Eicosanoide (insbesondere PGE<sub>2</sub>) sowie Stickstoffmonoxid verstärkt gebildet und

Leukozyten in das entzündete Gewebe aufgenommen werden. Ferner sind IL-1  $\alpha$  und IL-1  $\beta$  verantwortlich für die Bildung gewebsschädigender reaktiver Sauerstoffspezies (ROS) und Knorpel sowie Knochen abbauender Enzyme [129]. Dies sind alles Faktoren, welche insbesondere die rheumatischen Erkrankungen wie die der Arthrose und der rheumatoiden Arthritis betreffen. Das Ausmaß der erhöhten IL-1 Expression korreliert mit dem Krankheitsgrad der rheumatoiden Arthritis [130]. Erhöhte IL-1 Konzentrationen wurden in Gelenksflüssigkeiten von Arthrose-Patienten bestimmt [131].

IL-1Ra ist ein körpereigener Rezeptorantagonist, der die Wirkung von IL-1  $\alpha$  und IL-1  $\beta$  durch Bindung an den IL-1 Rezeptor ohne Auslösen der Signalkaskade blockieren kann [132]. Für die Therapie der rheumatoiden Arthritis ist IL-1Ra interessant, da ein rekombinanter IL-1Ra (Anakinra, Kineret<sup>®</sup>) hierfür bereits zugelassen ist.

#### 6.1.3.1.2 Tumor Nekrose Faktor alpha (TNF- $\alpha$ )

TNF- $\alpha$  ist ein körpereigenes Zytokin und ein äußerst wichtiger Entzündungsmediator. Die oben beschriebene Signalkaskade, welche durch Bindung von IL-1  $\alpha$  und IL-1  $\beta$  an ihren Rezeptor ausgelöst wird, ist der durch TNF- $\alpha$  und seinen Rezeptor ausgelösten Signalkaskade sehr ähnlich. Dadurch ist die entzündliche Wirkung beider Zytokine bei rheumatischen Erkrankungen vergleichbar (s. 6.1.3.1.1). Es handelt sich zwar um zwei unterschiedliche Rezeptortypen, dennoch ist die Signaltransduktion in vielen Bereichen die gleiche, wie beispielsweise die Translokation und Aktivierung von NF- $\kappa$ B (genauere Ausführung dazu s. Kapitel 3 unter 3.1.1). Der hauptsächliche Unterschied zwischen diesen beiden Zytokinen liegt darin, dass die Aktivierung durch TNF- $\alpha$  in einem programmiertem Zelltod (Apoptose) enden kann, was bei IL-1 nicht der Fall ist [128]. TNF- $\alpha$  nimmt zudem eine übergeordnete Rolle unter den Zytokinen ein. Es aktiviert unter anderem die Produktion von IL-1, IL-6, IL-8 und von GM-CSF (Granulozyten Makrophagen colony stimulating factor), was wiederum weitere Entzündungsprozesse nach sich zieht [133]. TNF- $\alpha$  wird wie IL-1 in den entzündeten Gelenken bei der rheumatoiden Arthritis und bei entzündlichen Stadien der Arthrose sowie im Blut der betroffenen Patienten mit rheumatoider Arthritis überexprimiert [131, 134]. Es stellt daher derzeit ein therapeutisches Target bei der rheumatoiden Arthritis dar. Monoklonale Antikörper gegen TNF- $\alpha$ , z.B. Infliximab (Remicade<sup>®</sup>), werden zur Therapie der rheumatoiden Arthritis, aber auch zur Therapie anderer chronisch entzündlicher und Autoimmunerkrankungen wie Morbus Crohn, Colitis ulcerosa oder Psoriasis eingesetzt [135, 136]. Als Antikörper gegen TNF- $\alpha$  kann Infliximab die Entzündung auslösende Wirkung von TNF- $\alpha$

aufheben. Zur Anti-TNF- $\alpha$  Therapie steht außerdem ein rekombinantes TNF- $\alpha$ -Rezeptor-FC-Fusionsprotein zur Verfügung, Etanercept (Enbrel®) [137, 138].

#### 6.1.3.1.3 Interleukin 6 (IL-6)

Auch IL-6 gehört zu den körpereigenen, proinflammatorischen Zytokinen. Wie schon IL-1 und TNF- $\alpha$ , wird auch IL-6 bei Patienten mit rheumatoider Arthritis und entzündlichen Formen der Arthrose in der Synovialflüssigkeit, bei Patienten mit rheumatoider Arthritis auch im Serum überexprimiert [131, 139]. Ähnlich und im Synergismus zu TNF- $\alpha$  und IL-1, werden durch Bindung von IL-6 an seinen Rezeptor verschiedene Entzündungsreaktionen ausgelöst. Unter anderem werden bestimmte Leukozyten (B- und T-Lymphozyten) aktiviert und ihre Apoptose reguliert, die Leukozyten-Migration in das entzündete Gewebe oder der Gelenk- und Knochenabbau bei Überexpression in der rheumatoiden Arthritis verstärkt [140]. Die Relevanz von IL-6 bei entzündlichen Erkrankungen verdeutlichte ein *in vivo* Experiment: hier wurde gezeigt, dass IL-6 defizitäre Mäuse keine Collagen induzierte Arthritis entwickeln können [141]. Mit Tocilizumab (RoActemra®) steht ein monoklonaler Antikörper gegen den IL-6 Rezeptor für die Therapie der rheumatoiden Arthritis zur Verfügung [142].

#### 6.1.3.2 Marker des oxidativen Stresses

##### 6.1.3.2.1 Glutathion (GSH)

Glutathion ist ein körpereigenes Tripeptid aus Glycin, Cystein und Glutaminsäure. Dieses Tripeptid dient als Radikalfänger für reaktive Sauerstoffspezies (reactive oxygen species, ROS). Durch die freie Thiolgruppe des Cysteins kann Glutathion durch Reduktion der ROS unter eigener Oxidation zu einem Disulfid diese inaktivieren. ROS verursachen sogenannten oxidativen Stress. Sie entstehen bei der Zellatmung als Intermediate zwischen Sauerstoff ( $O_2$ ) und seinem Reduktionsprodukt Wasser ( $H_2O$ ) und verursachen Lipidperoxidation, DNA-Strangbrüche oder Protein- und Enzyminaktivierungen. Physiologisch können sie auch absichtlich produziert werden, z.B. von Phagozyten durch ihre NADPH-Oxidase. ROS dienen den Phagozyten als Waffe gegen Bakterien und andere Krankheitserreger [143]. Bei einer Entzündung werden vermehrt ROS gebildet [144]. Durch die pathologische Überproduktion dieser ROS kann das Gewebe geschädigt werden und zu chronisch entzündlichen Erkan-

kungen führen. Es wurden erniedrigte Serumkonzentrationen von Glutathion bei Patienten mit rheumatoider Arthritis gegenüber gesunden Kontrollpersonen festgestellt [145]. Auch die Gesamtserumthiolkonzentration in Patienten mit rheumatoider Arthritis ist gegenüber Kontrollpersonen vermindert. Das Ausmaß korreliert mit dem Grad der Erkrankung [146]. Somit kann eine erniedrigte GSH-Serumkonzentration einen erhöhten Glutathionverbrauch, damit oxidativen Stress und indirekt auch eine Entzündung anzeigen.

#### 6.1.3.2.2 Malondialdehyd (MDA)

Malondialdehyd ist ein Markermolekül für oxidativen Stress, da es sich hierbei um ein Nebenprodukt der Lipidperoxidation handelt [147]. Patienten mit rheumatoider Arthritis zeigen deutlich erhöhte Plasmakonzentrationen von MDA gegenüber Gesunden [145]. Diese Patienten unterliegen vermehrt oxidativem Stress, hervorgerufen durch die chronische Entzündung (s. 6.1.3.2.1). Damit kann eine erhöhte MDA-Plasmakonzentration oxidativen Stress und folglich eine Entzündung indizieren.

#### 6.1.3.2.3 Myeloperoxidase (MPO)

Myeloperoxidase ist ein Enzym, das in phagozytären Neutrophilen vorkommt. Es katalysiert die Umsetzung von Wasserstoffperoxid mit Chlorid zu hypochloriger Säure, ein wirksames antimikrobielles Agens. Neben der gewollten, physiologischen Mikroorganismen abwehrenden Funktion von MPO, kann bei einer Überexpression durch die vermehrte Bildung des Oxidans hypochlorige Säure das Gewebe geschädigt und eine Entzündung hervorgerufen oder verstärkt werden [148]. Es handelt sich um eine Form des oxidativen Stresses (s. 6.1.3.2.1). Bei Patienten mit rheumatoider Arthritis wurden erhöhte Plasmakonzentrationen von MPO gegenüber Gesunden detektiert, wobei das Maß der Erhöhung nicht mit dem Ausmaß der Erkrankung korrelierte [149]. In der Synovialflüssigkeit von rheumatischen Gelenken wurden Neutrophile in großen Mengen gefunden und durch sie gebildete Oxidantien in Zusammenhang mit dem Gelenksschaden gebracht [150]. Bei Pferden konnten erhöhte MPO-Konzentrationen in der Synovialflüssigkeit von infizierten Gelenken gegenüber gesunden Gelenken gezeigt werden [151]. Erhöhte Aktivitäten von Myeloperoxidase in Serum oder Exsudat korrelieren demnach mit erhöhtem oxidativen Stress und können eine Entzündung, bzw. eine Infektion anzeigen.



## 6.2 Ergebnisse und Diskussion

In der Carrageen induzierten Entzündung im „Six-day-old air pouch Modell“ wurden Salicortin und Salicin den Tieren oral in je zwei unterschiedlichen Dosierungen appliziert. Die Dosierungen von Salicortin lagen bei 100 mg/kg Körpergewicht (KG) und 50 mg/kg KG, um eine Dosisabhängigkeit der Wirkungen zu analysieren. Die entsprechenden annähernd äquimolaren Dosierungen von Salicin waren 70 mg/kg KG und 35 mg/kg KG. Die genauen äquimolaren Dosierungen wären 67,5 mg/kg KG (entspr. 100 mg/kg KG Salicortin) und 33,8 mg/kg KG (entspr. 50 mg/kg KG Salicortin). Aus praktischen Gründen wurden diese aufgerundet. Eine Stunde vor der Carrageen-Injektion in die „air pouches“ wurden die Testsubstanzen peroral verabreicht. Acetylsalicylsäure (ASS) als entzündungshemmender Wirkstoff in 100 mg/kg KG diente dabei als Positivkontrolle, welche als Inhibitor der Cyclooxygenase die Ausschüttung proinflammatorischer Zytokine reduzieren sollte [152, 153]. Außerdem schien sie als Positivkontrolle besonders geeignet, da sie als Salicylsäurederivat den Salicylalkoholderivaten Salicortin und Salicin strukturell sehr ähnlich ist. In der Kontrollgruppe bekamen die Tiere keine Testsubstanz, sondern nur isotone Kochsalzlösung statt Carrageen in das „air pouch“ injiziert. In der Carrageen-Kontrollgruppe bekamen die Tiere keine Testsubstanzen, aber Carrageen in die „air-pouches“ injiziert. Die erstere Kontrollgruppe diente der Ermittlung der normal exprimierten Entzündungsparameter und die letztere der Ermittlung dieser bei 100% Entzündung. Sechs Stunden nach Carrageen-Injektion wurde das Exsudat aus den „air pouches“ sowie Blut zur Plasmagewinnung entnommen. Die Konzentrationen der in 6.1.3 vorgestellten Zytokine und Marker des oxidativen Stresses wurden nachfolgend im Plasma sowie im Exsudat der Tiere quantifiziert. Lediglich MPO wurde nur im Exsudat bestimmt.

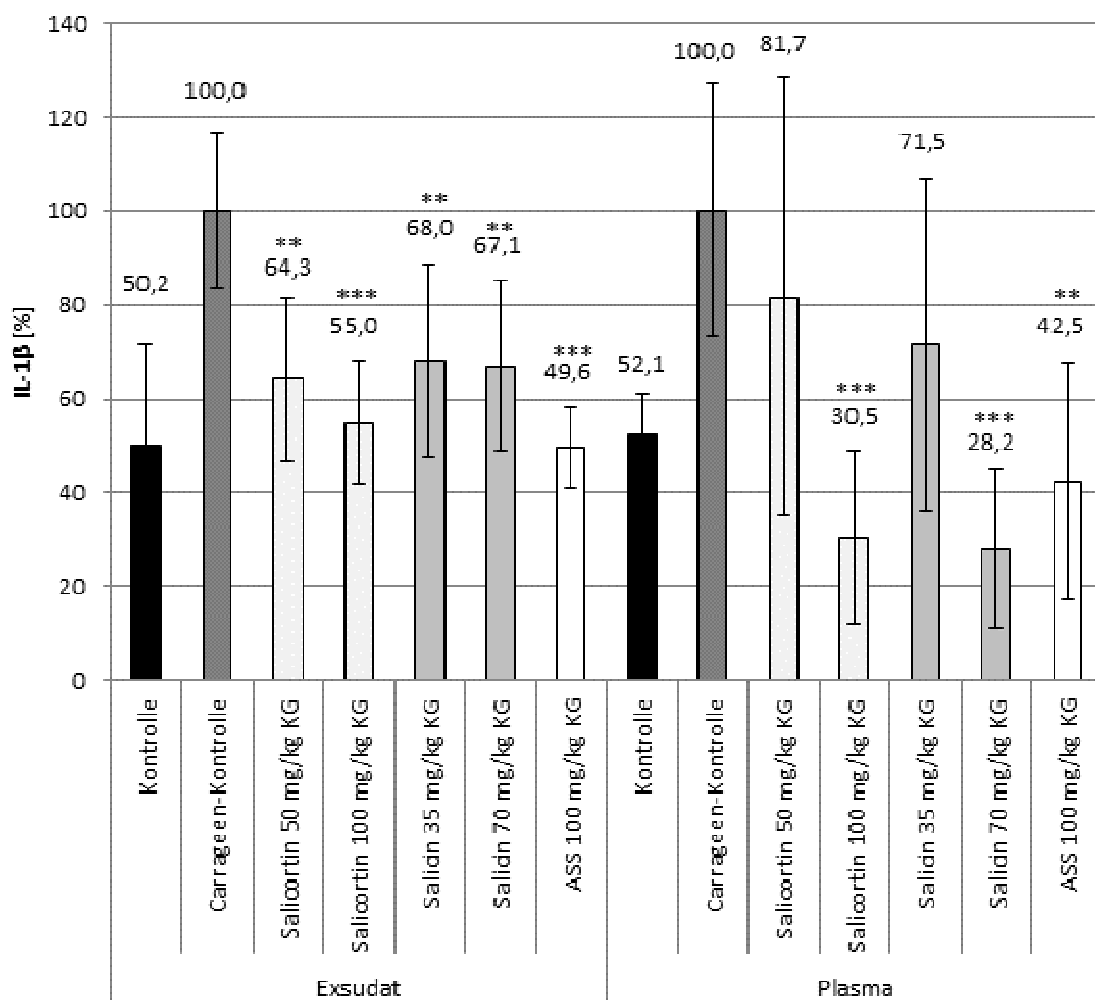
### 6.2.1 Zytokine im Exsudat und Plasma

#### 6.2.1.1 IL-1 $\beta$

IL-1  $\beta$  wurde sowohl im Plasma als auch im Exsudat der Tiere im „air pouch Modell“ durch Carrageen-Injektion gegenüber der Kontrollgruppe verdoppelt und diente damit als repräsentativer Entzündungsmarker.

Im Exsudat des entzündeten Gewebes (entzündetes „air pouch“) war die Reduktion von IL-1  $\beta$  durch Salicortin gegenüber der Carrageen-Kontrolle deutlich erkennbar (s. Abb. 6.2.1.1). Beide Konzentrationen zeigten hier einen signifikanten Unterschied zur Carrageen-Kontrolle,

allerdings nicht untereinander ( $p > 0,05$ ). Die Reduktion von IL-1  $\beta$  durch Salicin erschien nicht ganz so ausgeprägt wie bei Salicortin, jedoch war auch hier ein signifikanter Unterschied zur Carrageen-Kontrolle und kein Unterschied untereinander sowie zu Salicortin auszumachen. Somit waren beide Testsubstanzen dazu in der Lage, IL-1  $\beta$  im Exsudat des *in vivo* Modells zu reduzieren. Hierbei schienen Salicin und Salicortin gleich aktiv zu sein, wobei ein geringer Vorteil bei Salicortin auszumachen war, der aber nicht statistisch signifikant war. Auch ASS verringerte die IL-1  $\beta$ -Konzentration im Exsudat. Es war kein Vorteil von ASS gegenüber Salicortin bestimmbar, aber von ASS gegenüber Salicin ( $p < 0,05$ ). Weder bei Salicortin noch bei Salicin war eine Dosisabhängigkeit der Wirkung festzustellen.



**Abb. 6.2.1.1:** Prozentualer IL-1  $\beta$ -Spiegel im Exsudat und Plasma von Wistar-Ratten in der Carrageen-induzierten Entzündung im „air pouch Modell“ nach oraler Gabe zweier verschiedener Dosierungen von Salicortin und Salicin sowie von 100 mg/kg KG ASS. Die Carrageen-Kontrollgruppe (keine Testsubstanzgabe, aber Carrageen-Injektion) diente der Ermittlung von 100% IL-1  $\beta$  Expression; n = 6-10; Mittelwert  $\pm$  StabW; \*\*\*  $p < 0,001$ ; \*\*  $p < 0,01$  vs. Carrageen-Kontrolle.

Im Gegensatz dazu konnte bei der Reduktion von IL-1  $\beta$  im Plasma bei beiden Substanzen eine Dosisabhängigkeit festgestellt werden ( $p < 0,01$ ). Beide geringer applizierten Mengen zeigten keine signifikante Hemmung der IL-1  $\beta$  Produktion gegenüber der Carrageen-

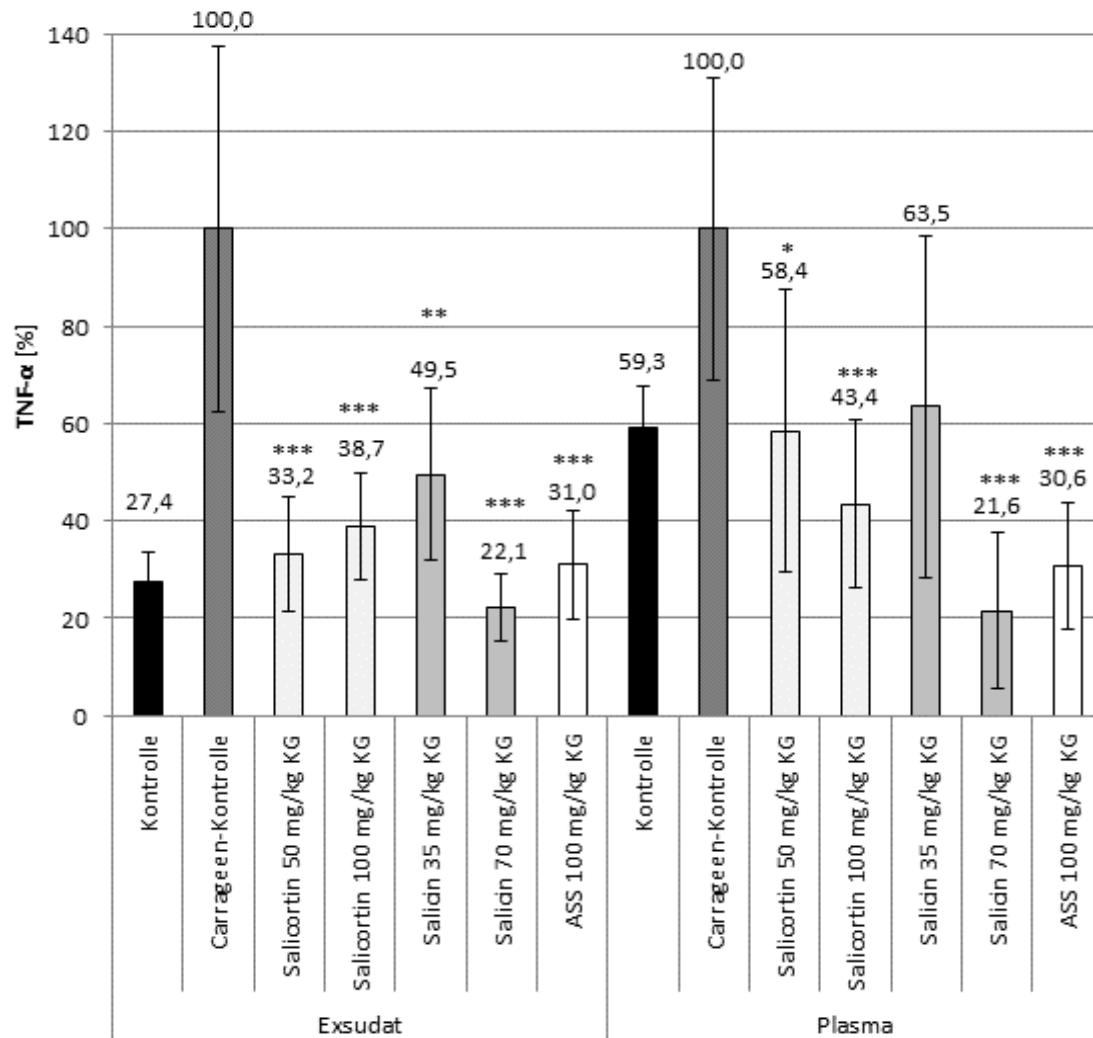
Kontrolle. Die höhere Dosis ergab jedoch bei beiden eine hoch signifikante Reduktion der IL-1  $\beta$ -Plasmakonzentration gegenüber der Carrageen-Kontrolle, wobei sie sich weder untereinander, noch von ASS unterschieden. ASS hemmte somit im ähnlichen Ausmaß wie die höheren Dosen von Salicortin und Salicin die IL-1  $\beta$  Produktion im Plasma.

#### 6.2.1.2 TNF- $\alpha$

TNF- $\alpha$  wurde im Exsudat der Tiere im „air pouch Modell“ durch Carrageen-Injektion ca. 3,5-fach und im Plasma um mehr als 1,5-fach erhöht. Auch TNF- $\alpha$  diente damit als repräsentativer Entzündungsmarker.

Salicortin zeigte hoch signifikant eine reduzierende Wirkung auf die Carrageen-induzierte TNF- $\alpha$ -Produktion im Exsudat (s. Abb. 6.2.1.2), allerdings war keine Dosisabhängigkeit festzustellen ( $p > 0,05$  zwischen beiden Dosierungen). Auch bei Salicin war in beiden Dosierungen ein signifikanter Unterschied zur Carrageen-Kontrolle und außerdem eine Dosisabhängigkeit zu beobachten. 70 mg/kg KG Salicin zeigten einen Vorteil gegenüber 35 mg/kg KG Salicin ( $p < 0,01$ ) und ebenso gegenüber der circa äquimolaren Menge von Salicortin ( $p < 0,01$  zu 100 mg/kg KG Salicortin). Auch ASS war hoch signifikant verschieden zu der Carrageen-Kontrolle und senkte die TNF- $\alpha$  Konzentration in ähnlichem Maße wie die beiden anderen Substanzen. Es war kein Unterschied zwischen ASS, Salicin und Salicortin festzustellen außer zwischen ASS und Salicin in 35 mg/kg KG. Hier zeigte ASS Überlegenheit ( $p < 0,05$ ).

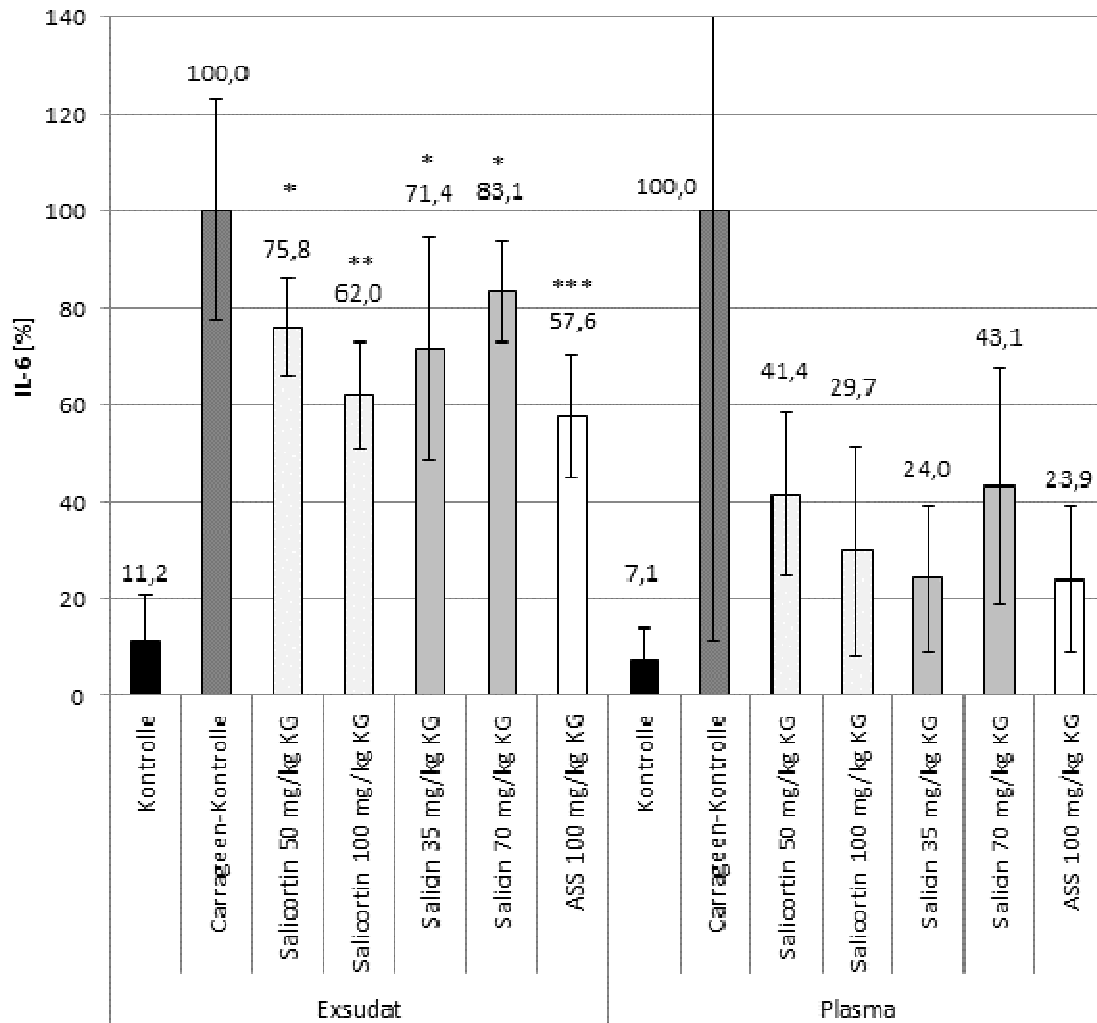
In den Plasmaproben war die TNF- $\alpha$ -Expression in beiden Dosierungen von Salicortin und die höhere Dosierung von Salicin signifikant verschieden zu der Carrageen-Kontrolle. Bei Salicortin war kein signifikanter Unterschied zwischen 100 mg/kg KG und 50 mg/kg KG festzustellen, jedoch eine gewisse Tendenz einer dosisabhängigen Wirkung. Des Weiteren war wie schon beim Exsudat beobachtet bei den höheren Dosierungen Salicin dem Salicortin in seiner TNF- $\alpha$ -Hemmung überlegen ( $p < 0,05$ ). Auch bei ASS war die TNF- $\alpha$ -Konzentration in den Plasmaproben hoch signifikant verschieden von jener in der Carrageen-Kontrolle. ASS war außerdem signifikant aktiver als Salicortin in 50 mg/kg KG ( $p < 0,05$ ) und Salicin in 35 mg/kg KG ( $p < 0,05$ ). Bei den höheren Dosierungen beider Testsubstanzen war kein Unterschied zu ASS feststellbar.



**Abb. 6.2.1.2:** Prozentualer TNF- $\alpha$ -Spiegel im Exsudat und Plasma von Wistar-Ratten in der Carrageen-induzierten Entzündung im „air pouch Modell“ nach oraler Gabe zweier verschiedener Dosierungen von Salicortin und Salidin sowie von 100 mg/kg KG ASS. Die Carrageen-Kontrollgruppe (keine Testsubstanzgabe, aber Carrageen-Injektion) diente der Ermittlung von 100% TNF- $\alpha$  Expression; n = 3-10; Mittelwert  $\pm$  StabW; \*\*\* p < 0,001, \*\* p < 0,01, \* p < 0,05 vs. Carrageen-Kontrolle.

### 6.2.1.3 IL-6

Im Exsudat diente IL-6 als überaus geeigneter Entzündungsmarker für das verwendete *in vivo* Modell. Durch die Carrageen-induzierte Entzündung wurde die Konzentration von IL-6 im Exsudat um ein Neunfaches gesteigert. Im Plasma war das Gegenteil der Fall. Hier streuten die Werte bei der Carrageen-Kontrolle so stark um den Mittelwert, dass keine eindeutige Steigerung der IL-6-Konzentration im Plasma bestimmbar war. Dennoch war die Carrageen-Kontrolle signifikant verschieden von der Kontrolle (p < 0,01). Ansonsten war bei den Plasmaproben aufgrund der starken Streuung der Werte kein signifikanter Unterschied zwischen der Carrageen-Kontrolle und den Testsubstanzen festzustellen.



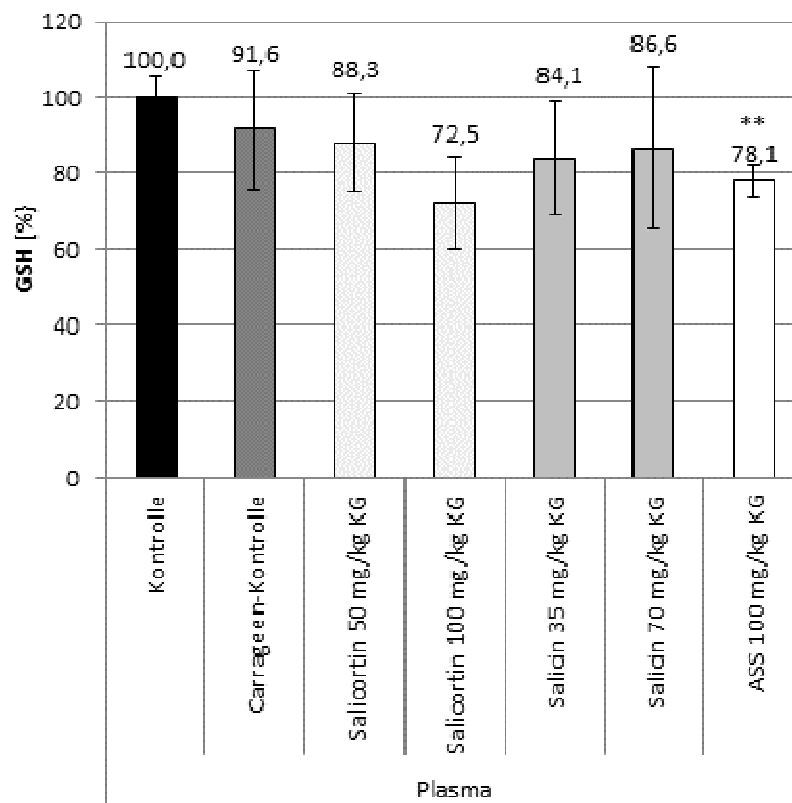
**Abb. 6.2.1.3:** Prozentualer IL-6-Spiegel im Exsudat und Plasma von Wistar-Ratten in der Carrageen-induzierten Entzündung im „air pouch Modell“ nach oraler Gabe zweier verschiedener Dosierungen von Salicortin und Salicin sowie von 100 mg/kg KG ASS. Die Carrageen-Kontrollgruppe (keine Testsubstanzgabe, aber Carrageen-Injektion) diente der Ermittlung von 100% IL-6-Expression; n = 5-9; Mittelwert ± StabW; \*\*\* p < 0,001, \*\* p < 0,01, \* p < 0,05 vs. Carrageen-Kontrolle.

Im Exsudat zeigten alle Testsubstanzen mehr oder weniger hoch signifikante Unterschiede zur Carrageen-Kontrolle (s. Abb. 6.2.1.3). Eine dosisabhängige Wirkung konnte bei Salicortin ( $p < 0,05$ ), nicht jedoch bei Salicin festgestellt werden. In der höheren Dosierung zeigte Salicortin Überlegenheit gegenüber Salicin ( $p < 0,01$ ), in der niedrigeren Dosierung unterschieden sich die beiden Substanzen nicht. ASS war ebenso aktiv wie Salicortin in 100 mg/kg KG, beide Gruppen unterschieden sich nicht. ASS zeigte hingegen Überlegenheit gegenüber 70 mg/kg KG Salicin ( $p < 0,001$ ) und 50 mg/kg KG Salicortin ( $p < 0,01$ ).

## 6.2.2 Marker des oxidativen Stresses im Plasma und / oder im Exsudat

### 6.2.2.1 GSH

Die Konzentration von Glutathion wurde im Plasma der Tiere gemessen, im Exsudat konnten keine messbaren Konzentrationen von GSH gefunden werden. Bei einer Entzündungsreaktion ist aufgrund des erhöhten oxidativen Stresses und damit erhöhten Verbrauchs von Glutathion eine erniedrigte GSH-Konzentration zu erwarten (s. 6.1.3.2.1). Dies traf auf das vorliegende *in vivo* Modell nicht zu. Es konnte in der Carrageen-Kontrolle keine signifikante Reduktion von GSH im Plasma der Tiere im Vergleich zu den Kontrolltieren detektiert werden. Die Reduktion von GSH im Plasma der Versuchstiere war somit ein ungeeigneter Entzündungsparameter.



**Abb. 6.2.2.1:** Prozentualer GSH-Spiegel im Plasma von Wistar-Ratten in der Carrageen-induzierten Entzündung im „air pouch Modell“ nach oraler Gabe zweier verschiedener Dosierungen von Salicortin und Salicin sowie von 100 mg/kg KG ASS. Die Kontrollgruppe (keine Testsubstanzgabe, nur Injektion einer isotonischen Kochsalzlösung in das „air pouch“) diente der Ermittlung von 100% GSH-Expression; n = 5-9; Mittelwert  $\pm$  StabW; \*\* p < 0,01 vs. Carrageen-Kontrolle.

Die Abbildung 6.2.2.1 zeigt, dass zwischen allen getesteten Gruppen und der Carrageen-Kontrolle kein signifikanter Unterschied festzustellen war, außer zur ASS-Gruppe. Allerdings

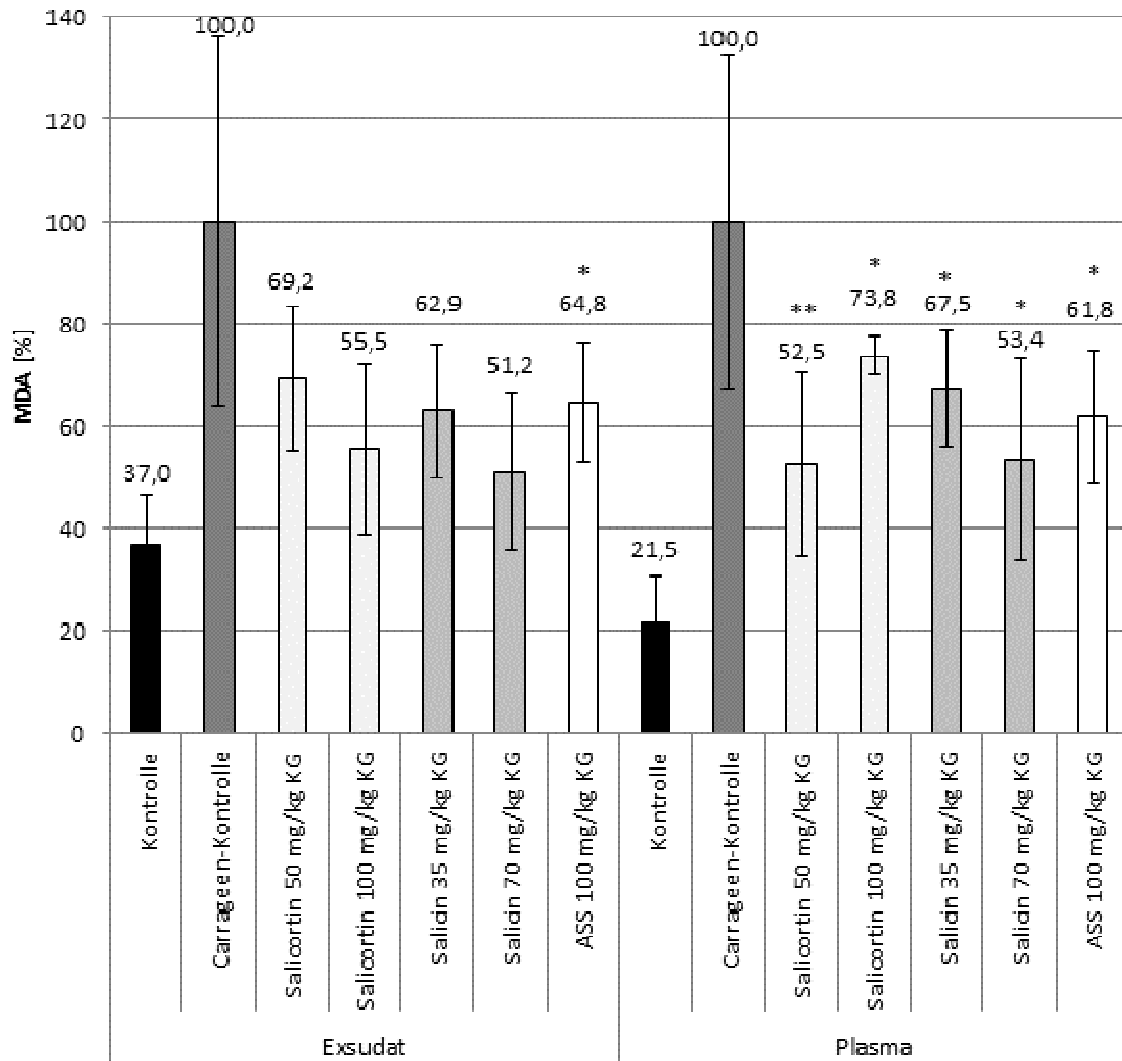
würde die hier gezeigte Erniedrigung der GSH-Konzentration eher auf eine proinflammatorische statt auf eine antiinflammatorische Eigenschaft von Acetylsalicylsäure hinweisen. Dies trifft natürlich nicht zu [154] und unterstreicht zusätzlich die Unzulänglichkeit von GSH für die vorliegende Untersuchung.

#### 6.2.2.2 MDA

Malondialdehyd war als Entzündungsmarker und Marker des oxidativen Stresses in der Carrageen-induzierten Entzündung im „Six day old air pouch Modell“ wesentlich geeigneter als Glutathion. Im Exsudat wurde in der Carrageen-Kontrollgruppe und damit in der Entzündungsgruppe die Expression ungefähr um ein Dreifaches und im Plasma um mehr als ein Vierfaches gesteigert.

Im Exsudat war trotz der erkennbaren Tendenz zu niedrigeren MDA-Konzentrationen in den Salicortin- und Salicingruppen keine statistische Signifikanz zu der Carrageen-Kontrollgruppe auszumachen. Es schien dennoch so, dass sowohl Salicortin als auch Salicin dosisabhängig dazu in der Lage waren, den oxidativen Stress teilweise abzufangen. Um eine statistisch signifikante Aussage hierüber treffen zu können, müssten die Versuche mit mehr Tieren wiederholt werden. Die Gruppe, welche Acetylsalicylsäure als Testsubstanz und Positivkontrolle vor Carrageen-Injektion bekam, zeigte eine statistisch signifikante Erniedrigung von MDA im Exsudat sowie im Plasma ( $p < 0,05$ ). Dies bestätigte wiederum den getesteten Parameter MDA in seiner Bedeutung für das verwendete *in vivo* Entzündungsmodell.

In den Plasmaproben der Tiere war bei allen Testsubstanzen eine signifikante Reduktion von MDA gegenüber der Carrageen-Kontrolle festzustellen. Hierbei war kein dosisabhängiger Effekt bei Salicin zu beobachten, wohl aber bei Salicortin. Interessanterweise zeigte hier die niedrigere Dosierung von Salicortin höhere Aktivität ( $p < 0,01$ ). Aufgrund der starken Schwankung bei den Werten in der niedriger dosierten Salicortingruppe kann es sich hier um Einzelfälle handeln, welche aufgrund der individuellen Unterschiede zwischen den Tieren auftreten können. Dieses Phänomen müsste durch größere Versuchsansätze weiter untersucht werden.



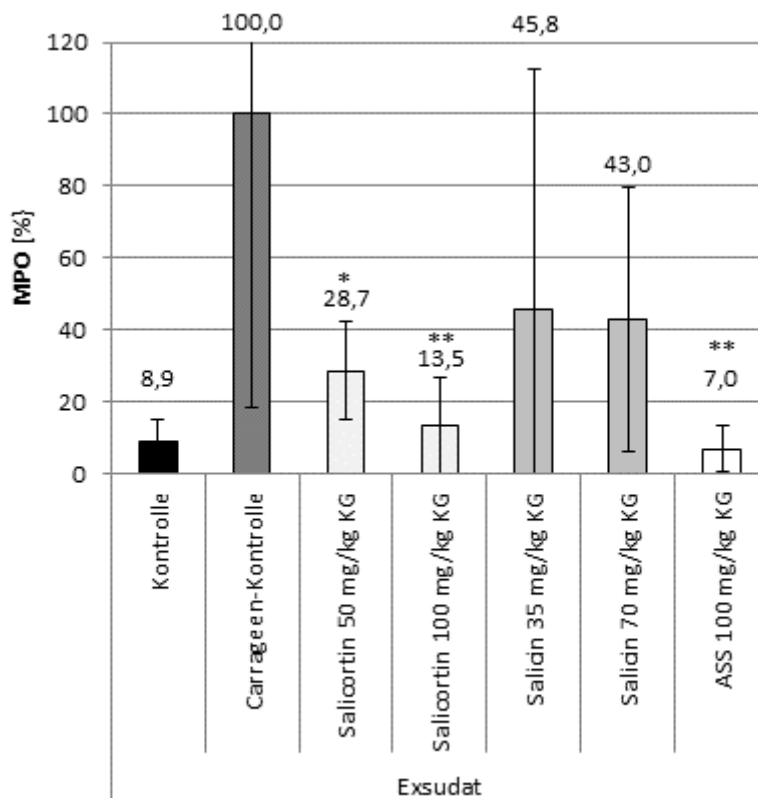
**Abb. 6.2.2.2:** Prozentualer MDA-Spiegel im Exsudat und Plasma von Wistar-Ratten in der Carrageen-induzierten Entzündung im „air pouch Modell“ nach oraler Gabe zweier verschiedener Dosierungen von Salicortin und Salicin sowie von 100 mg/kg KG ASS. Die Carrageen-Kontrollgruppe (keine Testsubstanzgabe, aber Carrageen-Injektion) diente der Ermittlung von 100% MDA-Expression; n = 3-9; Mittelwert  $\pm$  StabW; \*\* p < 0,01, \* p < 0,05 vs. Carrageen-Kontrolle.

### 6.2.2.3 MPO

Die Aktivität der Myeloperoxidase wurde nur im Exsudat der Tiere bestimmt. Das Ausmaß ihrer Aktivität zeigte starke Korrelation mit der Entzündungsreaktion, da sie in der Carrageen-Kontrollgruppe um das Zehnfache gegenüber der Kontrollgruppe anstieg, wobei starke individuelle Unterschiede zu beobachten waren. Salicortin vermochte die MPO-Aktivität im Exsudat gegenüber der Carrageen-Kontrollgruppe signifikant zu erniedrigen, Salicin jedoch nicht. Salicortin zeigte dabei eine dosisabhängige Wirkung. Die höhere Dosierung hemmte die MPO-Expression signifikant stärker als die niedrigere (p < 0,05). ASS war ebenfalls aktiv,



zeigte aber keine Überlegenheit gegenüber 100 mg/kg KG Salicortin ( $p > 0,19$ ). Somit war eine hohe und dosisabhängige Aktivität von Salicortin nach peroraler Aufnahme in der MPO-Expressionshemmung zu beobachten. Diese kann nicht nur mit der Entstehung von Salicylsäure als Metabolit erklärt werden, da Salicin keine signifikante Reduktion der MPO-Expression bewirkte und gleich viel Salicylsäure wie Salicortin als Metabolit in dieser äquimolaren Dosierung liefern konnte. Vielmehr ist die hemmende Wirkung von Salicortin auf den oxidativen Stress vermutlich mit der Entstehung von Catechol als Metabolit und potentes Antioxidans zu erklären, welches Redoxzyklen unterliegt (s. 6.2.3).



**Abb. 6.2.2.3:** Prozentualer MPO-Spiegel im Exsudat von Wistar-Ratten in der Carrageen-induzierten Entzündung im „air pouch Modell“ nach oraler Gabe zweier verschiedener Dosierungen von Salicortin und Salicin sowie von 100 mg/kg KG ASS. Die Carrageen-Kontrollgruppe (keine Testsubstanzgabe, aber Carrageen-Injektion) diente der Ermittlung von 100% MPO-Expression;  $n = 4-10$ ; Mittelwert  $\pm$  StabW; \*\*  $p < 0,01$ , \*  $p < 0,05$  vs. Carrageen-Kontrolle.

### 6.2.3 Zusammenfassung und Ausblick

Die Auswirkungen von peroral gegebenem Salicortin und Salicin auf die Expression der Entzündungsparameter im Exsudat und Plasma der Tiere in der Carrageen-induzierten Entzündung im „Six-day-old air pouch Modell“ variierten. Prinzipiell sollte eine eventuelle Überlegenheit von Salicortin gegenüber äquimolar dosiertem Salicin untersucht werden, um eine

zusätzlich zur Salicylsäure antientzündliche Wirkung von Catechol als Metabolit von Salicortin zu untersuchen. Die Konzentrationen der proinflammatorischen Zytokine im Exsudat und Plasma wurden allerdings von beiden Substanzen fast gleich stark beeinflusst. Bei IL-6 im Exsudat konnte bei der höheren Dosierung von Salicortin ein Vorteil gegenüber Salicin festgestellt werden. Bei TNF- $\alpha$  lag der Vorteil bei Salicin in den jeweils höheren Dosierungen und beiden Matrices. Bei den Markermolekülen des oxidativen Stresses zeigte sich hingegen ein deutlicher Vorteil von Salicortin gegenüber Salicin bezüglich der Aktivitätsverminderung der Myeloperoxidase im Exsudat der Tiere in beiden untersuchten Konzentrationen. Auf die Malondialdehyd-Konzentrationen im Plasma und Exsudat wirkten sich beide Substanzen ohne Salicortinvorteil positiv aus. Demgegenüber stellte sich Glutathion als ungeeigneter Messparameter der Entzündung heraus, da keine erwartete Erniedrigung der GSH-Konzentrationen im Plasma oder Exsudat in der Carrageen-Kontrollgruppe zu verzeichnen war.

Bei vielen der untersuchten Entzündungsfaktoren waren große Standardabweichungen und häufig keine dosisabhängige Aktivität von Salicortin und Salicin zu beobachten. Größere Versuchsansätze mit mehr Tieren in dem gleichen *in vivo* Modell könnten eindeutiger Ergebnisse mit eventuell weniger großen Standardabweichungen liefern. *In vivo* Studien sind natürlich aufgrund der individuellen Unterschiede der Tiere grundsätzlich mit höheren Schwankungen als andere Versuchsregime behaftet. Der Einsatz eines größeren Kollektivs könnte aber repräsentativere Mittelwerte und damit eindeutiger Ergebnisse erzielen. Möglich ist auch, dass bei den untersuchten Mengen der Testsubstanzen diese eine Art pharmakologischen Schwellenwert erreicht haben. Das würde bedeuten, dass ab einer gewissen eingesetzten Menge des Wirkstoffs keine stärkere Wirkung mehr eintritt trotz höherer Dosierung. Dies würde das Ausbleiben einer dosisabhängigen Wirkung erklären. Zukünftige Untersuchungen könnten dieses Phänomen mit einem größeren Kollektiv und mehreren eingesetzten Dosierungen klären. Ferner könnten die Leukozyten sowie die Entzündungsparameter Leukotrien B<sub>4</sub> (LTB<sub>4</sub>) und Prostaglandin E<sub>2</sub> im Exsudat zusätzlich quantifiziert werden, um mehr Erkenntnisse über den Einfluss auf ablaufende Entzündungsprozesse zu erhalten.

Dass besonders ein Markermolekül des oxidativen Stresses von Salicortin stärker gehemmt wurde als von Salicin, verwundert nicht. Mit der Entstehung von Catechol aus Salicortin entsteht ein potenter antioxidativer Metabolit, welcher besonders in Redoxprozesse eingreifen, reaktive Sauerstoffspezies abfangen und Lipidperoxidation stoppen kann [155]. Für polyphenolische Antioxidantien wie Catechol wurden mehrfach entzündungshemmende Eigenschaften beschrieben. Einen Versuch, hierbei ihren Mechanismus zu erklären, beschreiben Ma et al. [156]:

Phenolische Antioxidantien wie Catechol blockieren die LPS-induzierte NF- $\kappa$ B Aktivierung in Makrophagen. Hierbei wurde zwar eine Hemmung der Bindung von NF- $\kappa$ B an die DNA, aber keine direkte Wechselwirkung der Antioxidantien mit NF- $\kappa$ B beobachtet. Es wurden zwei Interaktionsmöglichkeiten zur NF- $\kappa$ B-Blockade postuliert. Hierbei wurde ein redoxsensitiver Faktor Ref-1 beschrieben, welcher mit NF- $\kappa$ B interagiert und dadurch dessen DNA-Bindung durch Redoxreaktionen verstärkt. Die Bindung phenolischer Antioxidantien an Ref-1 und gleichzeitige Inhibierung der Redoxreaktionen von Ref-1 soll die DNA-Bindung von NF- $\kappa$ B und damit Transkriptionsprozesse proinflammatorischer Zytokine abschwächen, bzw. unterbinden können. Somit lässt sich zum einen ein redoxsensitiver Faktor, welcher für die DNA-Bindung von NF- $\kappa$ B wichtig ist, als molekulares Target dieser phenolischen Antioxidantien vermuten. Zum anderen wurde der Komplex aus Keap1/Nrf2 als Target diskutiert. Der Transkriptionsfaktor Nrf2 (Nuclear factor-erythroid 2-related factor 2) spielt eine wichtige Rolle im Zellschutz bei Entzündungen. Durch Bindung der Antioxidantien an eine Thiolstruktur seines Repressors Keap 1 (Kelch-like ECH-associated Protein 1), wird Nrf2 aktiviert und dissoziiert in den Zellkern. Dort bindet er an die DNA und initiiert die Transkription von antioxidativen und Phase-II-Enzymen. Des Weiteren wird die Existenz eines Nrf2-ähnlichen Faktors diskutiert, welcher nach Bindung der phenolischen Antioxidantien an eine Thiolstruktur aktiviert werden und die Funktionen von NF- $\kappa$ B wie die Transkription von TNF- $\alpha$  hemmen kann [156-158].

Es wurde *in vitro* gezeigt, dass besonders solche phenolische Antioxidantien die LPS induzierte TNF- $\alpha$  Transkription hemmen, welche reversible Redoxreaktionen, sogenannte Redoxzyklen, eingehen können. Catechol und Hydrochinon sind Beispiele hierfür [156, 159]. Aus Salicortin entstehendes Catechol greift demnach vermutlich über die Fähigkeit, Redoxzyklen eingehen zu können [155], über redoxensitive Faktoren regulierend in Entzündungsgeschehen ein. Leider konnte dies in der vorliegenden *in vivo* Studie nur für den Entzündungsmarker MPO und das Zytokin IL-6 gezeigt werden.

### 6.3 Experimenteller Teil

Mit Ausnahme der Isolierung von Salicortin (s. Kapitel 2), wurden die gesamten *in vivo* Untersuchungen am Institut für Pharmakologie der Pharmazeutischen Fakultät der Universität Kairo in Kairo (Ägypten) unter der Leitung von Prof. Dr. Mohamed T. Khayyal durchgeführt. Sie wurden nach der europäischen Richtlinie 86/609/EEC und nach vorheriger Genehmigung der Ethikkommission für Tierversuche der Pharmazeutischen Fakultät in Kairo durchgeführt. Bezüglich der eingesetzten Tiere und Ihrer Haltung wurden alle Angaben bereits in Kapitel 4 unter dem Punkt 4.3.1.1 gemacht.

#### 6.3.1 „Six-day-old air pouch Modell“

##### 6.3.1.1 Carrageen induzierte Entzündung im „Six-day-old air pouch Modell“

Das „air pouch“ ( $\approx$  Lufttasche oder Luftkissen) wurde folgendermaßen erzeugt: am ersten Tag wurden 20 ml Luft subkutan in den Rücken jedes Tieres injiziert. Zwei Tage später erfolgte eine erneute Injektion von 10 ml Luft in das „air pouch“. Fünf Tage nach der ersten Injektion wurden erneut 10 ml Luft in dieselbe Stelle injiziert.

Entzündungsinduktion: Insgesamt 6 Tage nach der ersten und damit 24 Stunden nach der letzten Luftinjektion wurde den Tieren 2 ml einer wässrigen Carrageenlösung (1%) in das „air pouch“ injiziert. In der Kontrollgruppe wurde statt Carrageen 2 ml einer isotonischen Kochsalzlösung injiziert.

Alle Injektionen wurden unter leichter Ether-Anästhesie durchgeführt.

##### 6.3.1.2 Applikation der Testsubstanzen

Die Tiere wurden in sieben Gruppen bestehend aus je drei bis zehn Tieren eingeteilt. Die sieben Gruppen bestanden aus einer Kontrollgruppe, einer Carrageen-Kontrollgruppe, zwei Salicortingruppen, zwei Salicingruppen und einer ASS-Gruppe.

Eine Stunde vor Carrageen-Injektion (s. 6.3.1.1) bekamen die Wistar-Ratten oral über eine Schlundsonde die Testsubstanzen in wässriger Lösung appliziert. Salicortin wurde in 50 mg/kg Körpergewicht (KG) und 100 mg/kg KG, Salicin in 35 mg/kg KG sowie in 70 mg/kg KG

und Acetylsalicylsäure (ASS) in 100 mg/kg KG dosiert. Die Carrageen-Kontrollgruppe erhielt keine Testsubstanz, hier wurde nur Carrageen in das „air pouch“ injiziert. Diese Gruppe diente der Ermittlung einer Entzündungsreaktion von 100%. Die Kontrollgruppe sollte normale Umstände im Tier ohne Entzündungsreaktion widerspiegeln. Hier wurde ebenfalls keine Testsubstanz gegeben und auch kein Carrageen, sondern nur eine isotonische Kochsalzlösung injiziert.

#### 6.3.1.3 Exsudat- und Plasmagewinnung

Exsudat: Sechs Stunden nach der Carrageeninjektion bzw. der Injektion der isotonischen Lösung wurden die Wistar-Ratten mit Ether anästhesiert und 2 ml einer heparinisierten Natriumchloridlösung in die „air-pouches“ injiziert. Die „air pouches“ wurden 30 Sekunden lang leicht massiert und der Inhalt daraufhin durch Pasteurpipetten abgesogen und in skalierte, eisgekühlte Plastikröhrchen überführt. Das Volumen des Exsudats wurde abgelesen und bis zur weiteren Verwendung bei -20 °C aufbewahrt.

Plasma: Nach Absaugen des Exsudats wurden die Tiere getötet, Blutproben entnommen und diese in EDTA-Röhrchen überführt. Nach fünfzehnminütiger Zentrifugation bei 3000 U/min (K2015 multi-micro Zentrifuge, Centurion Scientific Ltd, Großbritannien) wurde das Plasma abdekantiert und bei -20 °C bis zur weiteren Verwendung aufbewahrt.

#### 6.3.2 Quantifizierung der Entzündungsmarker

Die genauen Versuchsabläufe sind bei Prof. Dr. Mohamed Khayyal am Institut für Pharmakologie der Pharmazeutischen Fakultät der Universität Kairo in Kairo (Ägypten) hinterlegt. Im Folgenden wird nur auf das Messprinzip eingegangen.

##### 6.3.2.1 Zytokine

Für die Quantifizierung von IL-1  $\beta$ , IL-6 und TNF- $\alpha$  im Exsudat und Plasma wurden ELISA Kits speziell für Ratten von der Firma R & D Systems GmbH, Wiesbaden, Deutschland verwendet.

### 6.3.2.2 Marker des oxidativen Stresses

#### 6.3.2.2.1 Glutathion

Glutathion wurde nach Probenaufarbeitung kolorimetrisch quantifiziert. Thiole wie Glutathion reagieren mit Ellman's-Reagenz, der 5,5'-Dithiobis(2-nitrobenzoesäure) unter Farbentwicklung. Dabei reagieren Thiole mit der Disulfidbrücke des Ellman's-Reagenz und ein Molekül 5-Thio-2-nitrobenzoesäure wird aus dem Disulfid freigegeben. Dieses Molekül hat als Anion im neutralen bis leicht basischem Milieu eine gelbe Farbe [160].

Aus dem Exsudat oder Plasma wurden die Proteine zunächst gefällt und durch Zentrifugation abgetrennt. Der Überstand wurde mit einer Dinatriumhydrogenphosphatlösung verdünnt und mit Ellman's-Reagenz versetzt. Nach fünfminütiger Farbentwicklung wurde das Ausmaß der Gelbfärbung UV-photometrisch (UV-Meter: Shimadzu UV-150-02, Shimadzu Tokio, Japan) bei 421 nm bestimmt.

#### 6.3.2.2.2 Malondialdehyd

Auch Malondialdehyd wurde nach Probenaufarbeitung mit Thiobarbitursäure photometrisch bestimmt. Malondialdehyd agiert als Quervernetzungsreagenz für zwei Moleküle Thiobarbitursäure [161]. Dieses Addukt wird nachfolgend bei 535 nm vermessen.

Zunächst wurde MDA durch Versetzen der Proben mit Trichloressigsäure aus den Lipoperoxiden hydrolysiert. MDA repräsentierte damit die Lipidperoxidation. Der Ansatz wurde daraufhin mit Thiobarbitursäure versetzt und eine halbe Stunde in ein kochendes Wasserbad für die Umsetzung zum oben genannten Addukt gestellt. Nach schnellem Abkühlen und Versetzen des Reaktionsansatzes mit n-Butylalkohol, wurde das Addukt in die organische Phase unter Abtrennung der Proteine extrahiert und die Absorption bei 535 nm UV-photometrisch (Photometer s.o.) bestimmt.

#### 6.3.2.2.3 Myeloperoxidase

Die Aktivität der MPO wurde ebenfalls kolorimetrisch bestimmt. MPO ist lokalisiert in den primären Granula neutrophiler Granulozyten [162]. Die MPO wurde durch Zerstörung der Granulozyten mittels Einfrieren und Auftauen und nachfolgender Ultraschallbehandlung in einem Detergenzien-haltigen Phosphatpuffer extrahiert. Nach Extraktion der MPO wurde ihre Aktivität durch ihre Katalysatorwirkung auf die Wasserstoffperoxid vermittelte Oxidation von *o*-Dianisidin bestimmt. Durch die Oxidation von *o*-Dianisidin entwickelte sich ein roter Farbstoff, dessen Absorption bei 460 nm photometrisch vermessen wurde. Die Änderung der Absorption bei 460 nm wurde in einminütigen Intervallen im Verlauf von vier Minuten bestimmt (Doppelstrahlphotometer von Thermo Electron Corporation, Cambridge, Großbritannien). Mithilfe einer Standardverdünnungsreihe von MPO wurde die Aktivität in U/ml bestimmt, wobei eine Unit MPO als die Fähigkeit definiert wurde, 1 µmol Wasserstoffperoxid in Wasser innerhalb einer Minute bei 25°C umzuwandeln [163].

#### 6.3.3 Auswertung

Zunächst wurde die Konzentration der jeweiligen Entzündungsmarker im Exsudat bzw. im Plasma bestimmt. Aufgrund der klebrigen Eigenschaften des Exsudats konnte eine Reproduzierbarkeit des abgezogenen Exsudatvolumens nicht gewährleistet werden. Häufig war nicht einmal das injizierte Volumen der zur Verdünnung verwendeten Salzlösung (s. 6.3.1.3) wieder herauszubekommen. Daher wurden die Konzentrationen noch einmal durch das abgezogene Volumen geteilt. Erfahrungswerte hatten gezeigt, dass dies reproduzierbarere Ergebnisse liefert. Diese Werte wurden daraufhin in prozentuale Werte umgerechnet, indem sie auf den Mittelwert der Carrageen-Kontrollgruppe, bzw der Kontrollgruppe (bei GSH) als Referenz für 100% bezogen wurden.

Für die statistische Auswertung wurde IBM SPSS Statistics 20 von IBM Deutschland GmbH (Ehningen, Deutschland) verwendet. Es wurde auf Mittelwertgleichheit im t-Test zweier unabhängiger Stichproben getestet.

#### 6.3.4 Reagenzien

Salicortin wurde wie in Kapitel 1 beschrieben isoliert und in einer Reinheit von 96,2% verwendet. Acetylsalicylsäure wurde von der Chemical Industries Development Company in Kairo, Ägypten, Trichloressigsäure von Mallinckrodt, Griesheim, Deutschland und n-Butanol von der Firma Merck in Darmstadt, Deutschland erworben. Salicin in einer Reinheit von 99% und alle weiteren Chemikalien wurden von der Firma Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland bezogen.



## **7. Pharmakokinetische Studie: Identifizierung phenolischer Metabolite im Serum gesunder Probanden nach Einnahme eines Weidenrindenextraktes**

### **7.1 Hintergrund**

#### 7.1.1 Hintergrund der pharmakokinetischen Studie

Auf der Suche nach den Inhaltsstoffen, die an der antiphlogistischen, analgetischen und antipyretischen Wirksamkeit beteiligt sind, sind in verschiedenen Studien Salicylsäure sowie deren Derivate wie Gentsinsäure und Salicylursäure als Hauptmetabolit der in Weidenrinde vorkommenden Salicylalkoholderivate im Serum und Urin detektiert worden [53, 54]. Dabei konnte allerdings auch gezeigt werden, dass nicht ausreichend viel Salicylsäure nach Einnahme der maximalen Tagesdosis des Weidenrindenextraktes bioverfügbar ist, um das Ausmaß der pharmakologischen Wirkung des Weidenrindenextraktes zu erklären [53]. Es müssen also noch weitere Inhaltsstoffe oder deren Metabolite für die Wirksamkeit des Extraktes mit verantwortlich sein. Diesbezüglich sind bereits die Polyphenole, insbesondere die Flavonoide als wirksamkeitsmitbestimmende Inhaltstoffgruppe diskutiert worden [37].

In der vorliegenden pharmakokinetischen Studie sollte nach Metaboliten der Salicylalkoholderivate Salicortin und Tremulacin sowie anderer Verbindungen mit einer 1-Hydroxy-6-oxo-2-cyclohexencarbonsäureester-Partialstruktur nach Einnahme eines Weidenrindenextraktes von gesunden Probanden gesucht werden. Salicortin, Tremulacin oder auch Acetylsalicortin könnten durch ihre strukturelle Voraussetzung der Veresterung eines Salicylalkohols mit einem Molekül 1-Hydroxy-6-oxo-2-cyclohexencarbonsäure sowohl zu Salicylsäure als auch zu Catechol metabolisiert werden (s. Kapitel 3 unter 3.1).

In Kapitel 3 konnte bereits gezeigt werden, dass Catechol als Abbauprodukt des Salicylalkoholderivats Salicortin im unteren mikromolaren Bereich die TNF- $\alpha$  induzierte ICAM-1-Expression an Endothelzellen hemmt. Auch in der Literatur ist für Catechol und Catecholderivate gezeigt worden, dass sie im unteren mikromolaren Bereich auf verschiedene Arten hemmend in physiologische Entzündungsmechanismen eingreifen können [93, 94] (s. Kapitel 4 unter 4.1). Ferner zeigten die Ergebnisse aus Kapitel 4, dass Catechol *in vivo* im Tiermodell mit Wistar-Ratten nach oraler Aufnahme von Salicortin ein Metabolit von Salicor-

tin ist. In Kapitel 6 konnten bestimmte entzündungshemmende Eigenschaften von Salicortin im Tiermodell beobachtet werden, welche nur auf die Metabolisierung zu Catechol und nicht auf den Metabolismus zur Salicylsäure zurückzuführen waren (s. Kapitel 6, 6.2.3).

Damit ist nun von Interesse, ob nach Einnahme eines Weidenrindenextraktes Catechol neben Salicylsäure auch im menschlichen Serum bei gesunden Probanden zu detektieren ist und somit zur Aufklärung des Wirkprinzips von Weidenrinde beitragen könnte.

### 7.1.2 Rechtliche Grundlagen der pharmakokinetischen Studie als klinische Prüfung und gesetzliche Vorgaben für ihre Durchführung

In § 4 Abs. 23 definiert das Arzneimittelgesetz (AMG) eine klinische Prüfung als „jede am Menschen durchgeführte Untersuchung, die dazu bestimmt ist, klinische oder pharmakologische Wirkungen von Arzneimitteln zu erforschen oder nachzuweisen oder Nebenwirkungen festzustellen oder die Resorption, die Verteilung, den Stoffwechsel oder die Ausscheidung zu untersuchen, mit dem Ziel, sich von der Unbedenklichkeit oder Wirksamkeit der Arzneimittel zu überzeugen.“ Im Fall der hier vorgestellten Studie, sollte ein bereits zugelassenes Arzneimittel (ein Weidenrindenextrakt-Präparat) auf bisher noch nicht identifizierte Stoffwechselprodukte untersucht werden. Es sollten neue Erkenntnisse zum Wirkprinzip gewonnen werden, wohingegen die Wirksamkeit der Droge vorher schon mehrfach belegt worden ist [40, 41, 43]. Die vorliegende Studie ist demnach laut Definition des AMG keine klinische Prüfung. Dennoch gelten hier alle Richtlinien des AMG zu klinischen Prüfungen, denn das AMG legt in § 40 Abs. 1 Satz 1 fest, dass bei der Durchführung einer klinischen Studie die sich aus § 1 Abs. 3 der Richtlinie 2001/20/EG ergebenden Grundsätze der guten klinischen Praxis einhalten (GCP-Verordnung, GCP-V) werden müssen. Laut § 2 der GCP-Verordnung fallen alle Bioverfügbarkeitsstudien in ihren Anwendungsbereich. Damit musste auch diese Studie nach der GCP-V durchgeführt werden, welche letztendlich alle Punkte aus dem Arzneimittelgesetz in die Praxis umsetzt. Insofern handelt es hier sehr wohl um eine klinische Prüfung.

Nach § 40 Abs.1 Satz 1 AMG muss die Durchführung einer klinischen Prüfung am Menschen zuvor bei der zuständigen Bundesoberbehörde, in diesem Fall das Bundesinstitut für Arzneimittel und Medizinprodukte (BfArM), genehmigt und von der zuständigen Ethikkommission, in diesem Fall die Ethikkommission der bayerischen Landesärztekammer, positiv bewertet werden. Die GCP-V gibt in § 7 alle Vorschriften zur Antragstellung beim BfArM und bei der Ethikkommission vor. Wesentlich bei der Antragstellung ist das Verfassen eines Prüfplans. Dieser ist „die Beschreibung der Zielsetzung, Planung, Methodik, statistischer Erwägungen und Organisation einer klinischen Prüfung“ (§ 3, Abs. 2, GCP-V). Die Fragestel-

lung der Studie sowie die gesamte Studienplanung sollten sich demnach hier wiederfinden. Unter anderem ist an dieser Stelle auch die Angabe einer EudraCT-Nummer erforderlich. Diese muss vorher unter <https://eudract.ema.europa.eu> bei der European Union Drug Regulating Authorities Clinical Trials (EudraCT) zusammen mit einem Studiencode beantragt werden. Die EudraCT gehört der europäischen Arzneimittelbehörde (European Medicines Agency (EMA)) an.

Nachdem die vorliegende klinische Studie mit der EudraCT-Nr. 2011-001829-24 und dem Studiencode „WBCat-1“ eine zustimmenden Bewertung der Ethikkommission der bayerischen Landesärztekammer und eine Genehmigung des BfArM erhielt, konnte sie an der anerkannten Prüfstelle am Lehrstuhl für Pharmakologie der Universität Regensburg durchgeführt werden.

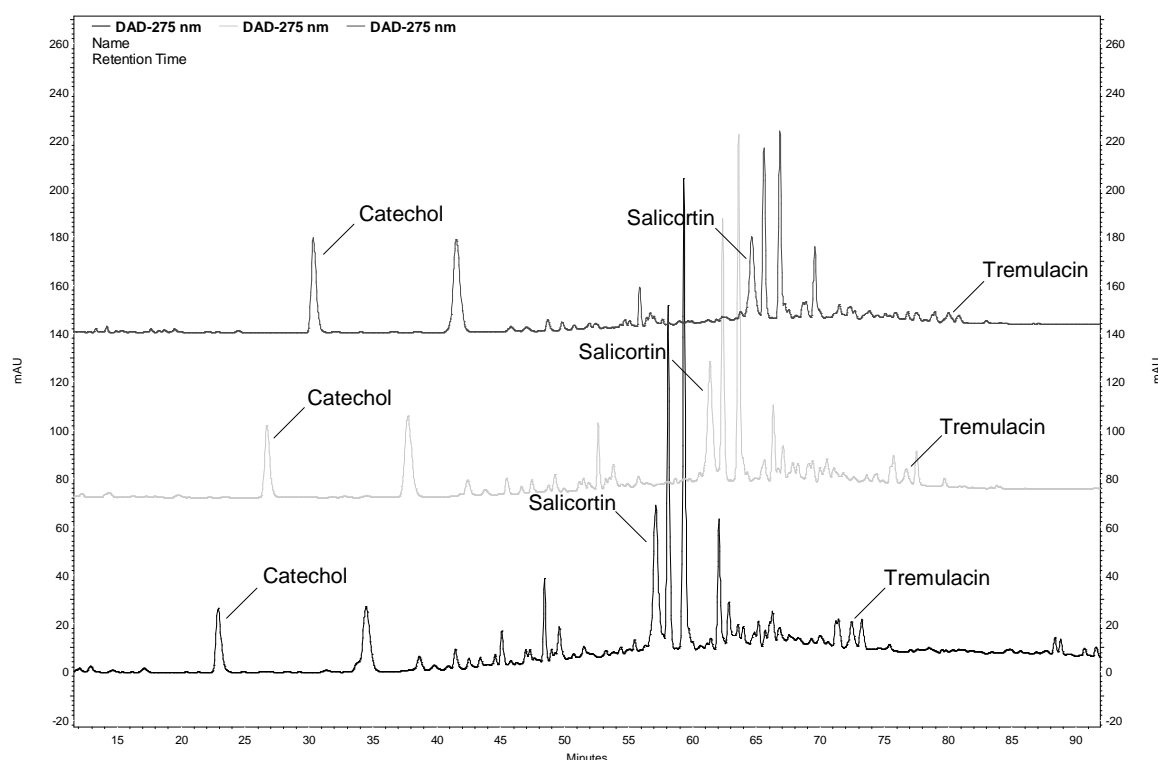
#### 7.1.3 Festlegung der Prüfmedikation durch Catechol-, Salicortin- und Tremulacingehaltsbestimmung in Assalix<sup>®</sup>, Optovit Actiflex<sup>®</sup> und Proaktiv<sup>®</sup>

Mit der Durchführung der klinischen Studie WBCat-1 sollte erstmals im Menschen untersucht werden, ob Catechol ein Metabolit der in der Weidenrinde vorkommenden Verbindungen mit einer 1-Hydroxy-6-oxo-2-cyclohexencarbonsäureester-Partialstruktur wie etwa Salicortin oder Tremulacin ist. Für diese Untersuchungen wurde ein Weidenrindenextraktpräparat mit möglichst geringer genuiner Catecholkonzentration bei möglichst hoher Salicortin- und Tremulacinkonzentration gesucht. Assalix<sup>®</sup> (Bionorica SE), Optovit Actiflex<sup>®</sup> (Hermes Arzneimittel) und Proaktiv<sup>®</sup> (Steigerwald) sind drei in deutschen Apotheken häufig vorkommende Weidenrindenextraktpräparate und wurden zu diesem Zweck untersucht.

## 7.2 Ergebnisse und Diskussion

### 7.2.1 Catechol-, Salicortin- und Tremulacingehalt in Assalix<sup>®</sup>, Optovit Actiflex<sup>®</sup> und Proaktiv<sup>®</sup>

In Abbildung 7.2.1-1 wurden drei Beispielchromatogramme von Assalix<sup>®</sup>, Optovit Actiflex<sup>®</sup> und Proaktiv<sup>®</sup> des optimierten HPLC-Laufs zusammengefasst, mit dem gleichzeitig die Quantifizierung von Catechol, Salicortin und Tremulacin in einer Arzneiform möglich war.



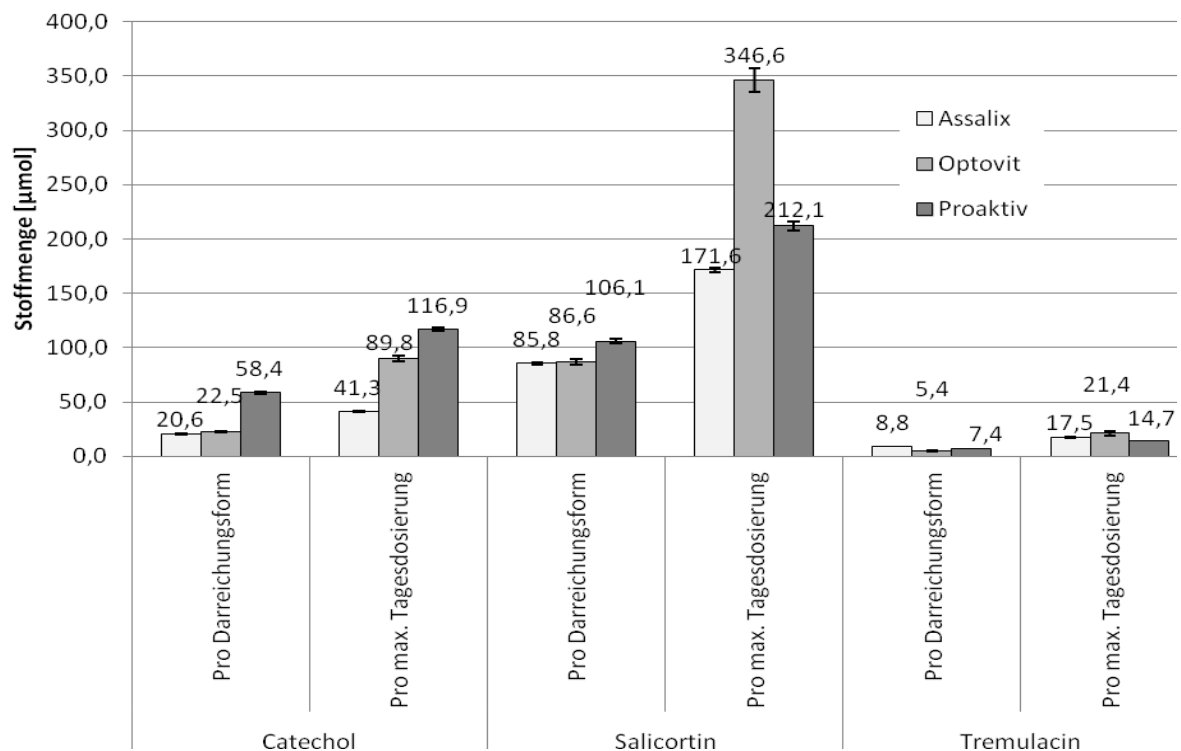
**Abb. 7.2.1-1:** Ausschnitt der HPLC-Chromatogramme von Assalix<sup>®</sup> (unten), Optovit Actiflex<sup>®</sup> (Mitte) und Proaktiv<sup>®</sup> (oben) mit den markierten Catechol-, Salicortin- und Tremulacinpeaks bei 275 nm (DAD).

Die Analyse von Assalix<sup>®</sup>, Optovit Actiflex<sup>®</sup> und Proaktiv<sup>®</sup> ergab, dass prinzipiell Assalix<sup>®</sup> das für die Zwecke der klinischen Studie WBCat-1 beste Inhaltsstoffspektrum aufwies (s. Abb. 7.2.1-2). Hier war 4,2-mal mehr Salicortin und 0,4-mal mehr Tremulacin enthalten als Catechol. Ähnlich verhielt es sich bei Optovit Actiflex<sup>®</sup>. Hier lag das Salicortin-Catechol-Verhältnis bei 3,9:1 und das Tremulacin-Catechol-Verhältnis bei 0,24:1.

Bei Proaktiv<sup>®</sup> war das Verhältnis von Salicortin zu Catechol mit 1,8:1 und von Tremulacin zu Catechol mit 0,1:1 deutlich schlechter. Proaktiv<sup>®</sup> schied daher als Prüfmedikation aus.

Trotz seiner guten Eignung kam allerdings auch Assalix<sup>®</sup> als Prüfmedikation nicht in Frage, da die Zulassung dieses Arzneimittels auf eine Tagesmaximaldosierung von 120 mg Gesamtsalicin beschränkt war. Bei Optovit Actiflex<sup>®</sup> hingegen wurde die Zulassung an die aktuelle HMPC- und ESCOP-Monographie [16, 17] mit einer Tagesmaximaldosierung von 240

mg Gesamtsalicin angepasst. Bei der Tagesmaximaldosierung von Optovit Actiflex<sup>®</sup> mit vier Tabletten werden 346,6  $\mu\text{mol}$  Salicortin, 21,4  $\mu\text{mol}$  Tremulacin und 89,8  $\mu\text{mol}$  Catechol, hingegen bei der maximal zulässigen Gabe von zwei Tabletten Assalix<sup>®</sup> nur 171,6  $\mu\text{mol}$  Salicortin, 17,5  $\mu\text{mol}$  Tremulacin und 41,3  $\mu\text{mol}$  Catechol appliziert. Wegen der Befürchtung, dass die Serumkonzentrationen der Metabolite sehr gering sein könnten, sollte die Dosierung der Prüfmedikation so hoch wie möglich gewählt werden. Dies sollte gewährleisten, dass die Analytkonzentrationen oberhalb des Detektionslimits des Dioden-Array-Detektors (DAD) liegen. Demzufolge wurde Optovit Actiflex<sup>®</sup> als Prüfmedikation ausgewählt.



**Abb. 7.2.1-2:** Darstellung des Catechol-, Salicortin- und Tremulacingehalts in Assalix<sup>®</sup>, Optovit Actiflex<sup>®</sup> und Proaktiv<sup>®</sup> pro Darreichungsform und maximaler Tagesdosierung; n = 3; Mittelwert  $\pm$  StabW.

## 7.2.2 Serumprobenanalytik

### 7.2.2.1 Validierung

Tabelle 7.2.2.1 gibt die Ergebnisse der ermittelten Validierungsparameter der Gehaltsbestimmungsmethode von Catechol und Salicylsäure aus aufgearbeiteten menschlichen Seren wieder. Beide Kalibriergeraden zeigten hohe Linearität mit Korrelationskoeffizienten  $> 0,99$ . Da Catechol nur ein kleines Chromophor aufweist, lag hier die Quantifizierungsgrenze bei  $0,75 \mu\text{M}$ , bei Salicylsäure mit ihrem größeren Chromophor bei  $0,25 \mu\text{M}$ . Sicherlich ist der DAD nicht der geeignetste Detektor für eine Catecholquantifizierung, da die Empfindlichkeit gegenüber eines beispielsweise elektrochemischen Detektors deutlich geringer ist. Allerdings hat der DAD den Vorteil, dass Catechol und Salicylsäure zusammen in einem HPLC-Lauf detektiert werden können. Ferner liegt bei dieser Detektionsmethode ein Vorteil bei der gleichzeitig möglichen Identifizierung der Analyten über ihr UV-Spektrum. Des Weiteren stellten sich die detektierten Konzentrationen des Catechols in den Serumproben als so hoch heraus, dass diese mit einer Optimierung des Fließmittelsystems gut mittels DAD bestimmbar waren.

**Tab. 7.2.2.1:** Validierungsparameter der Catechol- und Salicylsäure-Gehaltsbestimmungsmethode in menschlichen Seren nach Aufarbeitung.

Kalibrierung in Matrix, n = 6	Geradengleichung	R <sup>2</sup>
Catechol/Methylcatechol	$y = 0,1341x - 0,0172$	0,9986
Salicylsäure/Methylcatechol	$y = 0,1872x - 0,0963$	0,9966
LOD/LOQ, n = 6	LOQ	LOD
Catechol	$0,75 \mu\text{M}$	$0,5 \mu\text{M}$
Salicylsäure	$0,25 \mu\text{M}$	$0,1 \mu\text{M}$
Präzision, n = 5	StabW [%] intra-day	StabW [%] inter-day
Catechol $4 \mu\text{M}$ /Methylcatechol $9 \mu\text{M}$	1,52	2,52
Wiederfindung, n = 5	Mittelwert [%]	StabW [%]
Catechol $2 \mu\text{M}$	99,09	8,92
Catechol $8 \mu\text{M}$	93,33	10,27
Catechol $16 \mu\text{M}$	83,4	8,62
Catechol $20 \mu\text{M}$	79,32	2,79
Methylcatechol $18 \mu\text{M}$	88,70	2,76
Salicylsäure $2 \mu\text{M}$	85,34	6,10
Salicylsäure $10 \mu\text{M}$	76,91	4,78
Salicylsäure $20 \mu\text{M}$	80,38	6,23

Die Präzisionsversuche ergaben mit einer intra-day Standardabweichung von 1,52% und einer inter-day Standardabweichung von 2,52% sehr zufriedenstellende Ergebnisse. Die FDA gibt vor, dass die Standardabweichungen vom Mittelwert bei biologischen Proben < 15% sein sollten [164].

Auch die Wiederfindungsversuche zeigten recht gute Ergebnisse. Bis auf zwei Ausnahmen lagen alle Wiederfindungsversuche über 80%, wobei die Wiederfindung von Catechol in den niedrigeren Konzentrationen deutlich höher lag als in den höheren. Die Standardabweichung vom Mittelwert war im Durchschnitt etwas hoch, wurde aber akzeptiert.

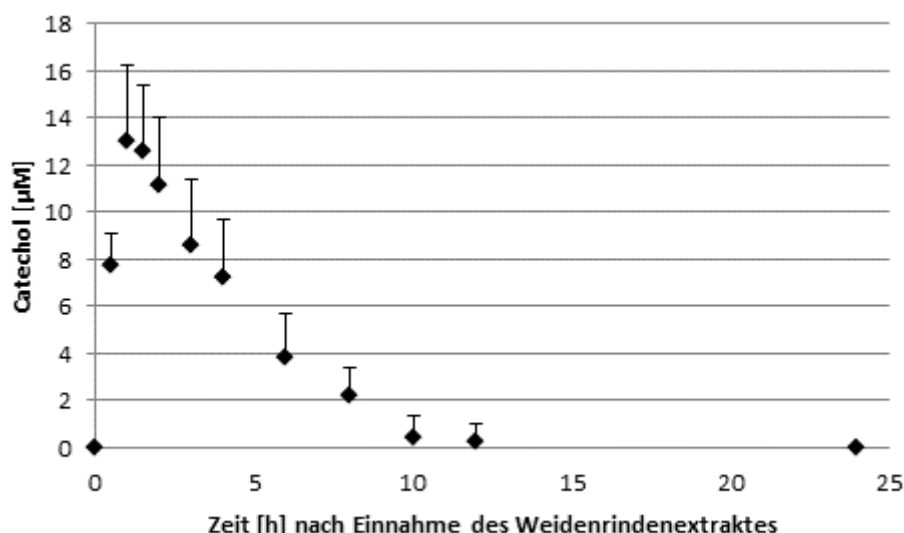
Auf die Selektivität der Methode wird in Kapitel 4 unter 4.2.1.1.1 genauer eingegangen.

#### 7.2.2.2 Catechol- und Salicylsäurekonzentration im Serum gesunder Probanden nach Einnahme eines Weidenrindenextraktes und enzymatischer Aufarbeitung der Serumproben

In Kapitel 4 konnte bereits gezeigt werden, dass Catechol ein Abbauprodukt von Salicortin *in vivo* ist. In Kapitel 7 sollte nun untersucht werden, ob Catechol auch nach oraler Aufnahme eines Weidenrindenextraktes im menschlichen Serum nach enzymatischer Aufarbeitung mit Sulfatase und  $\beta$ -Glucuronidase zu finden ist. Abbildung 7.2.2.2-1 zeigt, dass dies tatsächlich der Fall war.

Für die pharmakokinetische Studie standen mit vier Männern und vier Frauen acht gesunde Probanden zur Verfügung, die das Verum (=Weidenrindenextrakt) erhielten. Die freiwilligen Probanden waren zwischen 21 und 28 Jahre alt, zwischen 156 und 193 cm groß, wogen zwischen 49 und 80 kg und hatten einen BMI zwischen 20,1 und 24,8 kg/m<sup>2</sup>.

Es wurde ein schnelles Anfluten von Catechol im Blut der Probanden nach Weidenrindenextrakteinnahme beobachtet. Die maximal erreichte Konzentration ( $c_{\max}$ ) von Catechol nach enzymatischer Aufarbeitung wurde 1,2 h (=  $t_{\max}$ ) nach Optovit Actiflex®-Einnahme mit  $13,3 \mu\text{M} \pm 3,2 \mu\text{M}$  ermittelt. Die Eliminationshalbwertszeit wurde mit 2,5 h und die  $\text{AUC}_{0-\infty}$  mit 60,8  $\mu\text{M}\cdot\text{h}$  bestimmt (s. Tab. 7.2.2.2). Nach 10 Stunden konnte nur noch bei einem Probanden Catechol detektiert werden.

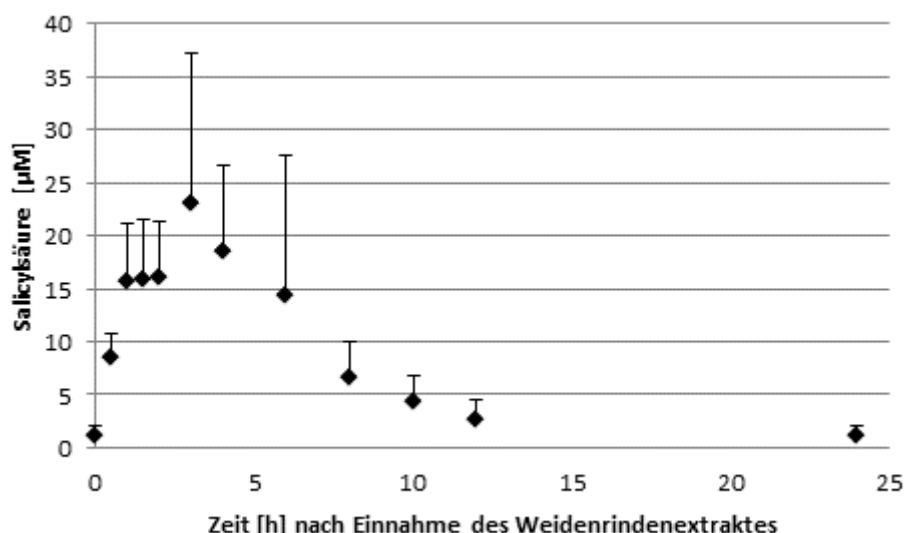


**Abb. 7.2.2.2-1:** Catecholkonzentration in enzymatisch aufgearbeiteten Seren gesunder Probanden nach Weidenrindenextrakteinnahme; n = 8; Mittelwert + StabW.

Salicylsäure ist als Metabolit verschiedener Salicylalkoholderivate nach Einnahme von Weidenrindenextrakten bereits beschrieben worden [52, 53]. Auch in der vorliegenden Studie konnte Salicylsäure in den Probandenserum nachgewiesen werden (s. Abb. 7.2.2.2-1). Wie schon Catechol war auch Salicylsäure bereits nach 30 Minuten in den Seren zu finden, wobei deren Maximalkonzentration erst nach 2,7 h erreicht wurde, sehr ähnlich wie schon Pentz et al. [52] zeigten. Allerdings lag die maximale Serumkonzentration in der vorliegenden Studie mit durchschnittlich 24,5 µM (entspr. 3,4 mg/l) deutlich höher als bei Pentz et al. [52] und bei Schmid et al. [53]. Bei Pentz et al. ist eine Maximalkonzentration von 0,13 mg/l nach Einnahme eines Extraktes mit 55 mg Gesamtsalicin erreicht worden. In der vorliegenden Studie wurde 4,4-mal mehr Salicin appliziert und ein 5,6-fach höherer Serumspiegel mit Einberechnung dieses Faktors als bei Pentz et al. gemessen. Dies könnte eventuell daran liegen, dass bei Pentz et al. ein Weidenrinden-Colasamenextrakt-Kombinationspräparat untersucht wurde und hier die Matrixeffekte eine Rolle spielten. Schmid et al. detektierten eine Maximalkonzentration von 1,2 mg/l Salicylsäure in den Probandenserum bei einer Einnahme eines Weidenrindenextraktes, der einer Menge von 240 mg Gesamtsalicin entsprach. Die Maximalkonzentration der Salicylsäure in der vorliegenden Studie war demnach 2,7-fach höher als bei Schmid et al. bei gleich hoher Gesamtsalicingabe. Allerdings wurde bei Schmidt et al. die Dosis auf zwei Gaben innerhalb von drei Stunden verteilt, was den Unterschied erklären könnte. Die errechnete AUC in der vorliegenden Studie lag mit 127,8 µM·h ebenfalls höher als die von Schmid et al. (99,0 µM·h). Beide AUCs liegen aber im vergleichbaren Bereich. Die Bioverfügbarkeit von Salicylsäure aus einem Weidenrindenextrakt ist somit gut vergleichbar zwischen den beiden Studien.

Salicylsäure flutete außerdem nicht so schnell ab wie Catechol. Mit der Ausnahme eines Probanden war nach 12 Stunden noch in allen Probandenserum Salicylsäure zu finden.





**Abb. 7.2.2.2-2:** Salicylsäurekonzentration in enzymatisch aufgearbeiteten Seren gesunder Probanden nach Weidenrindenextrakteinnahme; n = 8; Mittelwert + StabW.

Schmid et al. zeigten, dass Salicylsäure außerdem durch weitere Metabolisierung mit Glycin zu Salicylursäure konjugiert oder zu Gentisinsäure oxidiert werden kann. Diese Metabolite kommen nur zu einem sehr geringen Teil im Serum vor, Salicylursäure findet sich aber in größeren Mengen im Urin.

Weder Gentisinsäure noch Salicylursäure konnten in den Probandenserum der Studie WBCat-1 detektiert werden.

**Tab. 7.2.2.2:** Pharmakokinetische Parameter von Catechol und Salicylsäure nach einmaliger Einnahme eines Weidenrindenextraktes in Form von 4 Tabletten Optovit Acitflex® (entsprechen 240 mg Gesamtsalicin), n = 8.

<b>Catechol</b>	<b>c<sub>max</sub> [µM]</b>	<b>t<sub>max</sub> [h]</b>	<b>t<sub>1/2</sub> [h]</b>	<b>AUC<sub>0-∞</sub> [µM·h]</b>
Mittelwert	13,28	1,19	2,47	60,8
SD	3,20	0,37	0,53	21,5
<b>Salicylsäure</b>	<b>c<sub>max</sub> [µM]</b>	<b>t<sub>max</sub> [h]</b>	<b>t<sub>1/2</sub> [h]</b>	<b>AUC<sub>0-∞</sub> [µM·h]</b>
Mittelwert	24,49	2,69	2,42	127,8
SD	11,92	0,96	0,80	61,6

### 7.2.2.3 Catechol- und Salicylsäurekonzentration in nicht enzymatisch aufgearbeiteten Seren gesunder Probanden nach Einnahme eines Weidenrindenextraktes

Wie schon in Kapitel 4 (s. 4.2.3) bei den Rattenserum durchgeföhrt, wurden auch hier die drei Serumproben, welche den höchsten Catecholgehalt nach enzymatischer Aufarbeitung aufwiesen, nicht mit Sulfatase und  $\beta$ -Glucuronidase versetzt. Nach HPLC-DAD-Analyse konnte

auch hier in keiner der Proben ein Catecholsignal detektiert werden. Dieses Ergebnis zeigt, dass Catechol sowohl in Rattenserum als auch in menschlichen Serum nur konjugiert (als Sulfat oder Glucuronid) vorlag, bzw. dass die Menge des freien Catechols unter dem Detektionslimit des DAD lag.

Diese Proben wurden genauso wie in 4.2.3 beschrieben massenspektrometrisch untersucht. Hierbei konnte die Molekülmasse des Catecholsulfats leicht gefunden werden ( $m/z$  188,9859 [M]<sup>+</sup>, gemessen gegenüber  $m/z$  188,9863 [M]<sup>+</sup> laut Berechnung). Die Molekülmasse des Catecholglucuronids trat in der Peakliste des Massenspektrometers nicht auf, es konnte aber händisch ein sehr kleines Signal gefunden werden ( $m/z$  285,0616 [M]<sup>+</sup>), wobei dieses Signal noch deutlich kleiner war als bei den Rattenserum (ca. ein Drittel der Höhe des Signals in den Rattenserum).

Salicylsäure hingegen lag genauso wie im Tierversuch im menschlichen Serum frei vor, da die Flächen der Salicylsäurepeaks ohne enzymatische Aufarbeitung denen nach enzymatischer Aufarbeitung entsprachen. Schmid et al. [53] kamen ebenfalls zu diesem Ergebnis.

#### 7.2.2.4 Catecholkonzentration in Serum gesunder Probanden nach Einnahme eines Weidenrindenextraktes und nur partieller enzymatischer Aufarbeitung der Serumproben

Ein Teil der Serumproben wurde wie bereits mit Rattenserum in Kapitel 4.2.4 verfahren entweder nur mit Sulfatase oder nur mit  $\beta$ -Glucuronidase versetzt. Wie in 7.2.2.3 wurden die drei Serumproben bearbeitet, welche den höchsten Catecholgehalt nach enzymatischer Aufarbeitung aufwiesen.

Nach Aufarbeitung nur mit  $\beta$ -Glucuronidase konnte hier kein Catechol per HPLC-DAD detektiert werden, beim Versetzen nur mit Sulfatase hingegen schon. Zusammen mit den Ergebnissen aus 7.2.2.3 zeigt dies, dass Catechol nur zu einem geringen Teil im Phase-II-Metabolismus mit Glucuronsäure und zum größten Teil mit Sulfat konjugiert wurde. Der Anteil an Catecholglucuronid war hierbei so gering, dass die Konzentration an Catechol nach alleiniger Aufarbeitung der Serum mit  $\beta$ -Glucuronidase unter dem Detektionslimit des DAD lag. Des Weiteren wurde in Kapitel 5 die Synthese eines Catecholglucuronids beschrieben, welche damit eine Referenzsubstanz dieses Metabolits lieferte. Im Chromatogramm (DAD) der nicht enzymatisch aufgearbeiteten Serum konnte kein Catecholglucuronid mit Hilfe der Referenzsubstanz gefunden werden.

### 7.2.3 Zusammenfassung und Schlussfolgerung

Durch die klinische Prüfung WBCat-1 konnte erstmalig gezeigt werden, dass Catechol als Metabolit bestimmter 1-Hydroxy-6-oxo-2-cyclohexencarbonsäureester-haltiger Strukturen aus Weidenrinde im menschlichen Serum auftritt. Catechol liegt hierbei nicht als freies Molekül, sondern hauptsächlich als Sulfat konjugiert vor.

Bei einem durchschnittlichen Blutvolumen eines Menschen von 65 ml/kg KG [165] und einem mittleren Probandengewicht von 68,4 kg ergibt sich ein mittleres Probandenblutvolumen von ca. 4,45 L. Mit der Prüfmedikation wurden insgesamt 89,8  $\mu\text{mol}$  Catechol appliziert, woraus sich durch Division durch das mittlere Probandenblutvolumen eine Konzentration von 20,18  $\mu\text{M}$  ergibt. Die tatsächlich gemessene Maximalkonzentration von  $13,02 \mu\text{M} \pm 3,24 \mu\text{M}$  Catechol lag unter diesem Wert. Es kann also nicht ausgeschlossen werden, dass das im Serum gefundene Catechol nur aus dem schon im Extrakt enthaltenen Catechol stammte. Allerdings kann zusammen mit den tierexperimentellen Ergebnissen aus Kapitel 4 angenommen werden, dass das im Blut erscheinende Catechol sowohl aus dem schon genuin im Extrakt enthaltenen Catechol stammt, als auch ein Produkt aus der Metabolisierung von Salicortin, Tremulacin und anderen Verbindungen mit einer 1-Hydroxy-6-oxo-2-cyclohexencarbonsäureester-Partialstruktur darstellt.

Die entzündungshemmende Wirkung von Catechol ist wie in 7.1.1 erläutert schon mehrfach in der Literatur beschrieben worden. Die allgemeine Lehre lautet, dass Phase-II-Metabolite wie Glucuronide oder Sulfate sehr polar sind, daher renal oder biliär ausgeschieden werden und in der Regel nicht mehr pharmakologisch aktiv sind [100, 166]. Neuere Untersuchungen zeigen jedoch, dass gerade in entzündeten Geweben die Aktivität dekonjugierender Enzyme wie  $\beta$ -Glucuronidase gesteigert werden kann [112] und somit das eigentlich entzündungshemmende Molekül wieder frei im entzündeten Gewebe vorliegen und wirken kann. Auch konnte beispielsweise gezeigt werden, dass intravenös verabreichte Quercetinglucuronide in einem Tiermodell mit Ratten den Blutdruck der hypertensiven Tiere senken konnte, dieser Effekt aber bei gezielter Hemmung der  $\beta$ -Glucuronidase nicht auftrat. Gleiches beobachtete man bei der oralen Gabe von Quercetin [113]. Es wird diskutiert, dass die Phase-II-Konjugate die Transportformen der Wirkformen darstellen, welche von Enzymen aktivierter, bzw. entzündeter Gewebe wieder freigesetzt werden können [100].

#### 7.2.4 Ausblick

Um bezüglich Catechol genauere pharmakokinetische Aussagen treffen zu können, müssten hierzu Bioverfügbarkeitsstudien durchgeführt werden. Die Division der applizierten Stoffmenge Catechol durch das mittlere Probandenvolumen (s. 7.2.3) ist nur eine Näherung. Verteilungsvorgänge, die Geschwindigkeit der Resorption und die Bioverfügbarkeit der Substanz werden hierbei nicht berücksichtigt. Es müsste die Reinsubstanz Catechol sowohl oral als auch intravenös appliziert und die jeweilige AUC bestimmt werden. So erhielte man genauere Aussagen über seine Gewebsverteilung und Bioverfügbarkeit und damit auch genauere Erkenntnisse über die Quelle des Catechols in der vorliegenden Studie WBCat-1. Allerdings ist fraglich, ob so eine Studie vom BfArM und von der Ethikkommission bewilligt werden würde, da Catechol als Reinsubstanz als potentiell kanzerogen eingestuft wurde (s.u.). *In vivo* Versuche im Tier könnten schnellere Ergebnisse liefern, wobei diese nicht zwangsläufig auf den Menschen übertragbar sind [167].

Die Abwesenheit freien Catechols im menschlichen Blut bedeutet nicht unbedingt, dass es nicht wirken kann, sondern dass die Catecholkonjugate in entzündeten Geweben eventuell wieder dekonjugiert werden und die antiinflammatorische Wirkung des freien Catechols so zum Tragen kommen kann (s. 7.2.3). Um dies zu untersuchen, müssten weitere *in vivo* Versuche durchgeführt werden. Ähnlich wie bei Galindo et al. [113] könnten Catecholsulfat und Catecholglucuronid i.v. oder Catechol p.o. verabreicht und das Ausmaß eines pharmakologischen Effekts mit und ohne gleichzeitiger Applikation von Sulfatase- und Glucuronidasehemmstoffen beobachtet werden (vgl. Kapitel 5, 5.2.3). Es müsste dabei ein Entzündungsmodell gewählt werden, in welchem Entzündungsparameter wie beispielsweise die TNF- $\alpha$ -, IL-1  $\beta$ - oder auch die MPO-Expression bestimmt werden können (vgl. Kapitel 6 unter 6.1.2).

Neben den oben und in Kapitel 6 genannten positiven entzündungshemmenden Eigenschaften, sind für Catechol auch mögliche karzinogene Eigenschaften beschrieben worden. Aufgrund seiner Fähigkeit, Redoxzyklen eingehen zu können, wurde die Produktion von ROS (reaktive Sauerstoffspezies) durch Catechol und eine damit einhergehende Schädigung der DNA diskutiert. Makromoleküle wie die DNA könnten auch durch Adduktbildungen mit Catechol geschädigt werden [155]. Eine DNA-Schädigung ist beispielsweise für Catechol als natürlicher Bestandteil im Zigarettenrauch *in vitro* gezeigt worden. Hierbei sind allerdings Konzentrationen  $\geq 50 \mu\text{M}$  getestet worden [168]. In der hier diskutierten pharmakokinetischen Studie sind Konzentrationen lediglich um  $13 \mu\text{M}$  des konjugierten Catechols bestimmt worden. Ferner wurde in der vorliegenden Studie die Tagesdosis auf einmal verabreicht, welche normalerweise in zwei Einzelgaben aufgeteilt wird. Dies bedeutet folglich eine noch niedrigere Serumkonzentration als  $13 \mu\text{M}$  von Catechol unter therapeutischen Bedingungen. Die

IARC (international agency for research on cancer) klassifizierte Catechol als mögliches Karzinogen im Menschen (Gruppe 2 B), wobei beim Menschen keine Daten und beim Tier widersprüchliche Daten zur karzinogenen Wirkung vorliegen [169]. Ähnliches ist auch von Quercetin berichtet worden, einer der am meisten untersuchten Substanzen. Quercetin ist ein Flavonoid, das häufig in Obst und Gemüse vorkommt [170]. Es wurden karzinogene Eigenschaften von Quercetin aufgrund einer oxidativen Schädigung der DNA gezeigt [171]. Andererseits wirkt aber eine Flavonoid- und damit Quercetinreiche Diät in Form reichlicher Mengen Obst und Gemüse chemopräventiv, also krebsvorbeugend [172]. Damit ist auch die mutmaßlich karzinogene Wirkung von Catechol als fragwürdig zu betrachten. Darüber hinaus ist es sicherlich ein Unterschied, ob die Substanz in größeren Mengen isoliert in Zellkultur- oder in *in vivo*-Studien betrachtet wird oder als entstehender Metabolit aus Salicortin (s. Kapitel 4), bzw. Weidenrindenextrakt-Präparaten. Grundsätzlich scheint es problematisch, *in vitro* Ergebnisse auf *in vivo* Situationen zu übertragen. Ferner lag Catechol im Blut nicht frei, sondern in Form seiner Konjugate vor und kann so prinzipiell keine Redoxzyklen mehr eingehen. Eine allgemeine karzinogene Gefahr kann auf diese Weise vom Catechol vermutlich nicht mehr ausgehen. Des Weiteren ist Catechol als Bestandteil von Lebensmitteln des täglichen Bedarfs ermittelt worden. Catechol kommt in größeren Mengen in Röstkaffee, Brotkrusten, Kakaopulver und geröstetem Malz, in geringeren Mengen in Bier (vor allem dunkles) sowie in Kartoffelchips und sehr wenig in Früchten wie Äpfeln und Mangos vor [173, 174]. Im Rahmen der diskutierten Langzeit-Toxizität von Catechol, müssten bisher fehlende Langzeitstudien durchgeführt werden. Sie könnten Aufschluss über das tatsächlich kanzerogene Potential von Catechol aus Weidenrindenextrakt-Präparaten liefern.

## 7.3 Experimenteller Teil

### 7.3.1 Catechol-, Salicortin- und Tremulacingehaltsbestimmung in Assalix<sup>®</sup>, Optovit Actiflex<sup>®</sup> und Proaktiv<sup>®</sup>

#### 7.3.1.1 Herstellung der Untersuchungslösungen

Der Inhalt von je einer Proaktiv<sup>®</sup> Hartkapsel (n = 3) wurde in einen 200 ml Messkolben überführt, mit Methanol 5% aufgefüllt und gelöst. Bei Assalix<sup>®</sup> und Optovit Actiflex<sup>®</sup> wurde je eine überzogene Tablette (n = 3) nach vorheriger Zerkleinerung im Mörser und quantitativer Über-

führung in einen 100 ml Messkolben mit 100 ml Methanol 5% versetzt und fünf Minuten in ein Ultraschallbad gestellt. Nach Umschütteln konnte jedem Messkolben je ca. 1 ml Probe entnommen, über Spritzenvorsatzfilter filtriert und nachfolgend per analytischer HPLC untersucht werden.

**Tab 7.3.1.1:** Herstellerangaben zu den untersuchten Arzneimitteln in 7.3.1.1.

Arzneimittel	Assalix®	Proaktiv®	Optovit Actiflex®
Darreichungsform	überzogene Tabletten	Kapseln	überzogene Tabletten
Extraktionsmittel	Ethanol 70%	Wasser	Ethanol 70%
DEV	8-14:1	16-23:1	8-14:1
Trockenextrakt/ Darreichungsform	393,24 mg	480 mg	393 mg
Entspricht Salicin/ Darreichungsform	60 mg	120 mg	60 mg
Maximal zugelassene Tagesdosierung	2 Tabletten	2 Kapseln	4 Tabletten
Chargenbezeichnung	0000058935	041034	0113911
Hersteller	Bionorica SE, Neumarkt, Deutschland	Steigerwald Arzneimittelwerk GmbH, Darmstadt, Deutsch- land	Hermes Arzneimittel GmbH, Großhesselohe, Deutschland

### 7.3.1.2 Kalibrierung

Die 5-Punkt-Kalibriergeraden für Catechol, Salicortin und Tremulacin errechneten sich je aus den Mittelwerten einer Dreifachbestimmung. Für jede Substanz ergaben drei verschiedene Einwaagen drei Stammlösungen in Methanol, welche mit Methanol auf die gewünschten Konzentrationen verdünnt wurden. Es wurden je fünf Konzentrationen bestimmt, bei Catechol 100, 250, 500, 750 und 1000 µM, bei Salicortin 250, 500, 750, 1000 und 1250 µM, bei Tremulacin 12, 25, 40, 80 und 100 µM. Aus den Kalibriergeraden ergaben sich folgende Geradengleichungen: Catechol:  $y = 16367x - 388595$ ;  $R^2 = 0,9991$ ; Salicortin:  $y = 8150,8x - 220200$ ;  $R^2 = 0,9995$  und Tremulacin:  $y = 11032x - 66353$ ;  $R^2=0,9999$ .

### 7.3.1.3 HPLC-Analytik

Die Analytik der Untersuchungs- sowie der Kalibrierlösungen erfolgte mittels analytischer HPLC. Der Trennung auf einer 25 cm langen RP18-Säule in einem sauren, wässrig-methanolischen Fließmittelsystem schloss sich die Detektion mittels eines Dioden-Array-Detektors an. Die Retentionszeiten lagen bei 23,0 min für Catechol, bei 20,9 min für Salicortin und bei 36,3 min für Tremulacin.

**Tab. 7.3.1.3:** HPLC-Bedingungen und HPLC-System der Catechol-, Tremulacin- und Salicortin-gehaltsbestimmung in Assalix<sup>®</sup>, Optovit Actiflex<sup>®</sup> und Proaktiv<sup>®</sup> (Geräte und Software siehe Kap.2, Tab. 2.3.2.3).

<b>Fließmittel</b>	
Fließmittel A	H <sub>2</sub> O (Millipore <sup>®</sup> ) mit 0,1% TFA (p.A., ≥ 95%, Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland)
Fließmittel B	Methanol (Lichrosolv <sup>®</sup> , Merck, Darmstadt, Deutschland)
<b>Gradient</b>	
Min	Fließmittelzusammensetzung [%B in A]
0 – 30	5% → 8%
30 – 31	8% → 10%
31 – 84	10% → 80%
84 – 94	80%
94 – 96	80% → 5%
96 – 102	5%
<b>Einstellungen</b>	
Temperatur Autosampler	4 °C
Temperatur Säulenofen	30 °C
Fließgeschwindigkeit	0,8 ml/min
Injektionsvolumen	20 µl
Detektionswellenlänge Catechol	275 nm
Detektionswellenlänge Salicortin	270 nm
Detektionswellenlänge Tremulacin	271 nm
<b>Trennsäule</b>	
Hibar <sup>®</sup> 250-4 mm Kartusche mit Purospher Star <sup>®</sup> RP18-e (5 µm) und Vorsäule, Merck, Darmstadt, Deutschland	

#### 7.3.1.4 Berechnung des Catechol-, Salicortin- und Tremulacingehalts in Assalix<sup>®</sup>, Optovit Actiflex<sup>®</sup> und Proaktiv<sup>®</sup>

Durch die Bestimmung der Peakflächen von Catechol, Salicortin und Tremulacin in den Chromatogrammen der Untersuchungslösungen konnte mit Hilfe der jeweiligen Kalibriergeraden die Konzentration des Analyten in der Untersuchungslösung berechnet werden. Für die Ermittlung der Stoffmenge des Analyten in einer Darreichungsform wurde die Konzentration mit dem Volumen der Untersuchungslösung multipliziert.

#### 7.3.1.5 Verwendete Geräte, Chemikalien und Verbrauchsmaterialien in Kapitel 7.3.1

**Tab 7.3.1.5-1:** Verwendete Geräte in Kapitel 7.3.1:

<b>Funktion</b>	<b>Name</b>	<b>Hersteller</b>
<b>Messkolben 100 ml, 200 ml</b>	<i>Duran Messkolben</i>	Duran Group GmbH, Wertheim/Rhein, Deutschland
<b>Ultraschallbad</b>	<i>VWR Ultrasonic cleaner, USC 1700<sup>TH</sup></i>	VWR international GmbH, Darmstadt, Deutschland
<b>Millipore<sup>®</sup>-Anlage</b>	<i>Astacus Membra Pure</i>	Membra Pure GmbH, Hennigsdorf, Deutschland

**Tab. 7.3.1.5-2:** Verwendete Chemikalien/Verbrauchsmaterialien in Kapitel 7.3.1.

Name	Qualität	Hersteller
Catechol	≥ 99%	Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland
Salicortin	96,2%	Isolat, siehe Kapitel 2.2.5
Tremulacin	85,7%	Isolat, siehe Kapitel 2.2.5
Methanol Lichrosolv®	HPLC-Qualität	Merck, Darmstadt, Deutschland
Spritzenvorsatzfilter und Einmalspritzen siehe Tab. 2.3.3.1-2 (Kapitel 2)		

## 7.3.2 Ablauf der klinischen Prüfung

### 7.3.2.1 Probandenrekrutierung

Auf die Studie wurde durch einen Aushang und mündlich in den Unterrichtsveranstaltungen innerhalb der Fakultät aufmerksam gemacht. Sie stand jedem offen, der die Einschlusskriterien erfüllte, bzw. die Ausschlusskriterien nicht erfüllte:

Einschlusskriterien waren:

- 18 bis 45 Jahre
- gesund, d.h. Erfüllung der Einschlusskriterien wie beim Screening festgestellt (medizinische Anamnese, körperliche Untersuchung, EKG, Blut-/Urinanalyse)
- schriftliche Einverständniserklärung der Probanden
- Bodymassindex innerhalb des vorgegebenen Bereichs (BMI 18-27.5 kg/m<sup>2</sup>)
- Sichere Methode der Kontrazeption (Versagerquote < 1%)

Ausschlusskriterien waren:

- Teilnahme an klinischen Studien innerhalb eines Zeitraumes von 4 Wochen vor Verabreichung der Studienmedikation
- Blutspende oder ähnlicher Blutverlust innerhalb von 2 Monaten vor Studienbeginn
- Anamnestisch bekannte Überempfindlichkeit gegen das Prüfpräparat oder Arzneistoffe mit ähnlicher chemischer Struktur, z.B. Acetylsalicylsäure oder Salicylsäure, bzw. gegen einen der sonstigen Bestandteile des Prüfpräparats
- Bekannte Überempfindlichkeit gegen andere Antirheumatika / Entzündungshemmer
- Neigung zu Allergien
- Vorliegendem Asthma-Bronchiale und spastischen Bronchitiden
- Akuter gastrointestinaler Ulkus
- Probanden, die in den letzten 2 Wochen vor Beginn der Studie regelmäßig Medikamente eingenommen haben
- gleichzeitige Einnahme jeglicher Medikation (ausgenommen orale Kontrazeptiva)
- Probanden mit klinisch relevant von der Norm abweichenden Laborwerten
- Probanden, bei denen durch gastrointestinale Störungen die Resorption beeinträchtigt sein könnte
- Schwangerschaft und Stillzeit
- Probanden mit spezieller Diät (z.B. Veganer)
- Hepatitis oder HIV-Infektion
- Medikamenten-, Drogen- oder Alkoholmissbrauch in der Vorgeschichte



- Nikotin- oder Alkoholabusus
- Probanden, denen die Möglichkeit fehlt, in ständigem Kontakt mit dem Prüfarzt zu stehen
- unzureichende Kooperation mit dem klinischen Prüfer (z.B. Verdacht auf Non-Compliance)
- Vorliegen eines geistigen Zustandes, der es dem Betreffenden nicht möglich macht, das Wesen der Prüfung, deren Tragweite und möglichen Folgen zu verstehen

Die medizinische Anamnese, körperliche Untersuchung, Blutabnahmen und EKG führten die zwei Prüfarzte der Studie durch, die Urinanalyse fand am Prüfzentrum, die Blutanalyse am Institut für Klinische Chemie des Universitätsklinikums Regensburg statt.

Schwangere Frauen waren von der Studienteilnahme ausgeschlossen, was durch einen unmittelbar vorher durchgeführten Schwangerschaftstest gewährleistet wurde. Die Probanden wurden hinsichtlich des Ablaufs und des Risikos der klinischen Studie aufgeklärt (Probandeninformation in mündlicher und schriftlicher Form).

Fünf Männer zwischen 21 und 28 Jahren (BMI 21,5 - 23,8) sowie fünf Frauen zwischen 22 und 24 Jahren (BMI 20,1 - 24,8) nahmen an der Studie teil. Davon bekamen insgesamt vier Frauen und vier Männer die Prüfmedikation. Je ein männlicher und ein weiblicher Proband nahmen keine Prüfmedikation ein, aber an den standardisierten Mahlzeiten und den Blutabnahmen teil.

Sponsor der klinischen Prüfung war Dr. Georg Mair (Neurologische Reha Intensiv, Bezirksklinikum Regensburg). Die anerkannte Prüfstelle am Lehrstuhl für Pharmakologie der Universität Regensburg unter der Leitung von Prof. Dr. Frieder Kees wurde als Prüfzentrum gewählt. Prof. Dr. Frank Schweda (Institut für Physiologie der Universität Regensburg) und Dr. Georg Mair waren die beiden verantwortlichen Prüfarzte.

#### 7.3.2.2 Kinetiktag

Die Studie wurde innerhalb eines Tages (Kinetiktag) durchgeführt. Die Probanden erschienen am Morgen des Kinetiktags nüchtern am Prüfzentrum. Alle Probanden bekamen eine Venenverweilkanüle in eine Armvene gelegt und ca. 7 ml Blut entnommen (Blutprobe 0). Daraufhin erfolgte die Applikation der Prüfmedikation (4 Tabletten Optovit Actiflex®) mit 250 ml Wasser. Die nächsten Blutabnahmen schlossen sich nach 0,5; 1; 1,5; 2; 3; 4; 6; 8; 10 und 12 Stunden an. Die Verweilkanüle wurde entfernt und eine zusätzliche Blutabnahme am nächsten Morgen durch Venenpunktion durchgeführt (24 h-Wert).

### 7.3.2.3 Diätplan

Um störende Flavonoide, Catechol [173] und Catecholderivate (wie Hydroxytyrosol [175]) aus der Nahrung auszuschließen, erforderte die Studie einen strengen Diätplan. Dieser sah vor, ab Mittag des Vortages auf Obst und Gemüse jeglicher Art (auch Säfte), Schokolade, Vollkornprodukte, Nüsse, Sprossen, Kräuter, Kaffee, schwarzen Tee, Rotwein, Bier, Cola und Olivenöl zu verzichten. Des Weiteren wurden die Probanden gebeten, ab 22 Uhr des Vorabends vollständig auf Nahrung, Alkohol und Koffein zu verzichten.

Die Mahlzeiten am Kinetiktag waren standardisiert und für alle Teilnehmer gleich. Zwei Stunden nach Studienstart fand das Frühstück statt. Dieses bestand aus Weißmehlhörnchen mit wahlweise Butter oder Rahmfrischkäse. Das standardisierte Mittagessen schloss sich 4,5 Stunden nach Studienbeginn an und bestand aus hellen Nudeln mit einer Sahnesauce. Nach insgesamt 10 Stunden gab es Abendessen, welches aus Baguette mit Butter oder Rahmfrischkäse bestand. Die Probanden wurden gebeten, bis zur Abnahme des 24 h-Werts nichts mehr zu essen und falls doch, auf trockenes Weißmehlbrot zurückzugreifen.

Während der gesamten Studie stand den Probanden jederzeit Wasser nach Belieben zur Verfügung.

### 7.3.2.4 Blutentnahme und Serumgewinnung

Am Kinetiktag bekam jeder Proband eine Venenverweilkanüle gelegt (Vasofix<sup>®</sup> Braunüle<sup>®</sup>, B. Braun Melsungen AG, Melsungen, Deutschland). Hieraus wurden die ersten elf Blutabnahmen vorgenommen und zwischen den Abnahmen die Verweilkanüle mit einem Mandrin (Vasofix<sup>®</sup> Mandrin, B. Braun Melsungen AG, Melsungen, Deutschland) verschlossen. Nach Abnahme des 12-Stunden-Wertes wurde die Verweilkanüle wieder entfernt und der 24-Stunden-Wert nur durch einmalige Venenpunktion entnommen. Der Blutabnahme von je ca. 7 ml in S-Monovetten 7,5 ml (Sarstedt AG u. Co., Nümbrecht, Deutschland) folgte direkt eine 20-minütige Zentrifugation (Heraeus Megafuge 1.0 R Sepatech, Thermo scientific, Langenselbold, Deutschland) bei 4000 U/Min des Vollblutes. Danach konnte das Serum abdekantiert und bei -80 °C bis zur weiteren Verwendung aufbewahrt werden.

### 7.3.3 Analytik der Serumproben

#### 7.3.3.1 Aufarbeitung und Extraktion

Vor jeder weiteren Verwendung wurden die Serumproben nach dem Auftauen noch einmal kurz zentrifugiert (4000 U/min, 5 Min).

##### 7.3.3.1.1 Enzymatische Aufarbeitung und Extraktion der Serumproben

1. Versetzen mit Enzymen:

90 Teile jeder Serumprobe wurden in ein 1,5 ml Eppendorf-Gefäß gegeben und mit 100 U Sulfatase (1 U/μl insgesamt) und 10 Teilen 2 M Na-Acetatpuffer pH 4,7 (exakte pH-Einstellung des Puffers mit Eisessig) versetzt. Direkt vor der Zugabe zum Serum wurden dem Puffer 10 mg/ml L-Ascorbinsäure und 100 U/μl β-Glucuronidase (10 U/μl insgesamt) zugefügt.

2. Inkubation:

Nach kurzem Zentrifugieren und Vortexen wurde dieses Gemisch eine Stunde bei 37 °C und 5% CO<sub>2</sub> inkubiert.

3. Fällung der Proteine und Extraktion:

Nach Inkubation wurden die Proben 1:1 mit eiskalter interner-Standard-Lösung (18 μM Methylcatechollösung in Methanol) versetzt, 5 Minuten bei der Einstellung 4,5 (Vortexer mit Aufsatz für Eppendorf-Gefäße) geschüttelt, daraufhin 30 Minuten bei 14000 U/min (4 °C) zentrifugiert und der Überstand 60 Minuten über Nanosep-Filter filtriert. Dieses Filtrat wurde mittels HPLC-DAD vermessen.

##### 7.3.3.1.2 Nicht-enzymatische Aufarbeitung und Extraktion der Serumproben

Ein kleiner Teil der Serumproben wurde außerdem ohne Enzyme aufgearbeitet. Diese Aufarbeitung lief prinzipiell wie bei der enzymatischen ab, allerdings wurden die Proben nur mit dem L-Ascorbinsäure-haltigem Puffer ohne Enzyme versetzt und dann weiter wie in 7.3.3.1.1

beschrieben verfahren. Diese Proben wurden ebenso mit einem hochauflösenden Massendetektor massenspektrometrisch untersucht (Detektor s. Tab. 7.3.3.6-1).

#### 7.3.3.1.3 Partielle enzymatische Aufarbeitung und Extraktion der Serumproben

Ein kleiner Teil der Serumproben wurde jeweils nur mit Sulfatase oder nur mit  $\beta$ -Glucuronidase versetzt. Diese Aufarbeitung lief prinzipiell wie bei der vollenzymatischen ab, allerdings wurden die 90 Teile Serumprobe entweder mit 10 U/ $\mu$ l  $\beta$ -Glucuronidasen in 10 Teilen L-Ascorbinsäure-haltigem Puffer gelöst oder mit 1 U/ $\mu$ l Sulfatasen zusammen mit 10 Teilen L-Ascorbinsäure-haltigem Puffer versetzt. Daraufhin wurde wie in 7.3.3.1.1 beschrieben weiter verfahren.

#### 7.3.3.2 HPLC-Analytik der aufgearbeiteten Serumproben

Der Serumaufarbeitung folgte die Analytik der erhaltenen Proben mittels analytischer HPLC. Die Bestandteile der Serumproben wurden zunächst auf einer 25 cm langen RP18-Säule mit einem sauren, wässrigen-methanolisch Fließmittelsystem getrennt und nachfolgend das abgetrennte Catechol bei 275 nm, bzw. Salicylsäure bei 301 nm mit einem Dioden-Array-Detektor detektiert. Durch Injektion von Referenzsubstanzen (gelöst in Matrix) wie das in Kapitel 5 synthetisierte Catecholglucuronid sowie Salicylursäure und Gentisinsäure wurde das Auftreten dieser Verbindungen in den Serumproben durch Analyse der erhaltenen Chromatogramme geprüft.

**Tab. 7.3.3.2:** HPLC-Bedingungen der Serumprobenanalytik (HPLC-System siehe Kap.2 unter Tab. 2.3.2.3).

<b>Fließmittel</b>	
Fließmittel A	H <sub>2</sub> O (Millipore) mit 0,1% H <sub>3</sub> PO <sub>4</sub> (p.A., 85%, Merck, Darmstadt, Deutschland)
Fließmittel B	Methanol (Lichrosolv <sup>®</sup> , Merck, Darmstadt, Deutschland)
<b>Gradient</b>	
<b>Min</b>	<b>Fließmittelzusammensetzung [%B in A]</b>
0 – 18	5% → 6,8%
18 – 40	6,8% → 20%
40 – 50	20% → 60%
50 – 55	60%
55 – 65	60% → 5%
65 – 70	5%
<b>Einstellungen</b>	
Temperatur Autosampler	4 °C
Temperatur Säulenofen	40 °C
Fließgeschwindigkeit	1 ml/min
Injektionsvolumen	20 µl
Detektionswellenlänge Catechol	275 nm
Detektionswellenlänge Salicylsäure	301 nm
<b>Trennsäule</b>	
Lichrocart <sup>®</sup> 250-4 mm Kartusche mit Purospher Star <sup>®</sup> RP18-e (5 µm) und Vorsäule, Merck, Darmstadt, Deutschland	

### 7.3.3.3 Gehaltsbestimmungsmethode

In den analysierten Serumproben wurden Catechol und Salicylsäure mit Hilfe eines internen Standards (IS, Methylcatechol) quantifiziert. Zwei vorher in Matrix aufgenommene Kalibriergeraden (n = 6) von Catechol (7 Punkt-Kalibrierung) und Salicylsäure (8 Punkt-Kalibrierung) inklusive des internen Standards lieferten zwei Geradengleichungen. Die Quantifizierung in den aufgearbeiteten Serumproben erfolgte durch das Dividieren der Fläche des Catechol-, bzw. des Salicylsäurepeaks durch den Peak des zugesetzten Methylcatechols (IS) und nachfolgender Berechnung anhand der Geradengleichung aus der Kalibrierung. Da die Serumproben während der Aufarbeitung 1:2,222 verdünnt worden sind, wurden die ermittelten Konzentrationen mit diesem Faktor nachher noch multipliziert, um die tatsächlichen Serumkonzentrationen zu bestimmen.

#### 7.3.3.3.1 Matrixherstellung für die Kalibrierung

90 Teile eines Blank-Serums wurden mit 10 Teilen 2 M Na-Acetatpuffer pH 4,7 versetzt, der 10 mg/ml L-Ascorbinsäure enthielt. Durchführung der Proteinfällung mit reinem eiskaltem Methanol und Aufarbeitung siehe 7.3.3.1.1 unter Punkt 3.

#### 7.3.3.3.2 Herstellung der Kalibrierlösungen

Zu 90 Teilen der Matrix wurden 10 Teile einer entsprechenden Catechol/Salicylsäure/Methylcatechol-Verdünnung (in Methanol) gegeben. Die Endkonzentration des internen Standards betrug immer 9  $\mu\text{M}$ , indem die Verdünnungsreihen von Catechol und Salicylsäure mit einer 90  $\mu\text{M}$  Methylcatechollösung als Lösungsmittel durchgeführt und zuletzt 1:10 mit der Matrix verdünnt wurden. Die Kalibriergeraden bestanden bei Catechol aus 7 Punkten zwischen 0,75 und 10  $\mu\text{M}$ , bei Salicylsäure aus 8 Punkten zwischen 0,25 und 20  $\mu\text{M}$ . Jede Kalibrierung wurde sechsmal aus jeweils unterschiedlichen Einwaagen durchgeführt. Die Kalibriergeraden mit den zugehörigen Geradengleichungen stellen somit den Mittelwert aus sechs Geraden dar.

#### 7.3.3.4 Validierung der Gehaltsbestimmungsmethode

##### 7.3.3.4.1 Kalibrierung

Für Catechol und Salicylsäure wurden jeweils 6 Kalibriergeraden mit 7, bzw. 8 Punkten aufgenommen. Die endgültigen Kalibriergeraden ergaben sich aus den Mittelwerten der 6 Geraden. Durchführung siehe 7.3.3.3.2.

##### 7.3.3.4.2 Wiederfindungsversuche

Es wurden 10 Teile einer methanolischen Catechol/Salicylsäurelösung und 10 Teile eines L-Ascorbinsäure-haltigen Puffers (siehe 7.3.3.1.1 Punkt 1) zu 80 Teilen eines Blank-Serums (Serum, das ohne vorherige Prüfmedikationseinnahme gewonnen wurde) gegeben und eine Stunde inkubiert (37 °C, 5%  $\text{CO}_2$ ). Für die Proteinfällung wurde eiskalte IS-Lösung (18  $\mu\text{M}$ ) verwendet, die Aufarbeitung verlief wie in 7.3.3.1.1 unter Punkt 3 beschrieben.

Durch die Bestimmung der Peakflächen mittels HPLC-DAD von Catechol und Salicylsäure und die Berechnung mit Hilfe der Kalibriergeraden ohne Betrachtung des internen Standards, konnten die Konzentrationen bestimmt werden. Diese wurden zu der theoretischen Konzentration ins Verhältnis gesetzt und somit die prozentuale Wiederfindung bestimmt.

Im Fall von Methylcatechol wurde die in den Wiederfindungsversuchen ermittelte Peakfläche im Vergleich zu den Mittelwerten der Peakfläche aus den Kalibriergeraden betrachtet und daraus die prozentuale Wiederfindung berechnet.

Die Wiederfindungsversuche erfolgten bei Catechol in den Konzentrationen 2, 8, 16 und 20  $\mu\text{M}$ , bei Salicylsäure in 2, 10 und 20  $\mu\text{M}$  und bei Methylcatechol in 9  $\mu\text{M}$ , jeweils  $n = 5$ .

#### 7.3.3.4.3 Detektions- und Quantifizierungsgrenze

Für die Ermittlung des jeweiligen Detektions- (LOD) und Quantifizierungslimits (LOQ) wurden Catechol- und Salicylsäurelösungen in Matrix soweit verdünnt, dass nur noch ein Signal-Rausch-Verhältnis von 3:1 für die Bestimmung des LOD, bzw. ein Signal-Rausch-Verhältnis von 10:1 für die Bestimmung des LOQ erreicht wurde. Dies wurde für jeden Analyten sechsmal durchgeführt ( $n = 6$ ).

#### 7.3.3.4.4 Präzision

Die Präzision des HPLC-Gerätes innerhalb eines Tages („intra-day precision“) wurde durch fünfmalige Injektion derselben Catechol/Methylcatechol-Lösung (4  $\mu\text{M}$ / 9  $\mu\text{M}$ ) in Matrix an einem Tag, die Präzision des Gerätes an unterschiedlichen Tagen („inter-day precision“) durch jeweils einmalige Injektion an fünf unterschiedlichen Tagen ermittelt. Sie errechnet sich aus der prozentualen Standardabweichung der einzelnen ermittelten Catecholkonzentrationen zum Mittelwert dieser.

#### 7.3.3.4.5 Selektivität

Die Selektivität der in 7.3.3.2 vorgestellten HPLC-Methode wurde durch Analyse des DAD-Chromatogramms bei 275 nm für Catechol und 301 nm für Salicylsäure beurteilt. In den Bereichen des Catecholsignals (16,8 min) und des Salicylsäuresignals (52,1 min) sollten keine Störsignale auftreten.

### 7.3.3.5 Pharmakokinetische Parameter

Für die nicht-kompartimentelle Berechnung der pharmakokinetischen Parameter wurde das Programm WinNonlin 6.3 der Firma Pharsight, St. Louis, USA verwendet.  $C_{\max}$  und  $t_{\max}$  wurden direkt aus den Serum-Konzentrations-Kurven entnommen. Die Eliminationskonstante  $\lambda_z$  wurde aus dem abfallenden Teil der Serum-Konzentrations-Kurven durch log-lineare Regression ermittelt. Die terminale Eliminationshalbwertszeit errechnete sich nach  $t_{1/2} = \ln 2 \cdot \lambda_z^{-1}$ . Die Fläche unter der Konzentrations-Zeit-Kurve (AUC) bis zum letzten bestimmten Zeitpunkt ( $AUC_{0-t}$ ) wurde nach der Trapezregel berechnet. AUC von Null bis unendlich wurde nach der Formel  $AUC_{0-\infty} = AUC_{0-t} + C_{\text{last}} \cdot \lambda_z^{-1}$  bestimmt.

Die Berechnung der pharmakokinetischen Parameter erfolgte durch Dr. Martin Kees, Klinik für Anästhesiologie und operative Intensivmedizin der Charité, Berlin.

### 7.3.3.6 Verwendete Geräte, Chemikalien und Verbrauchsmaterialien in Kapitel 7.3.3

Tab 7.3.3.6.-1: Verwendete Geräte in Kapitel 7.3.3.

Funktion	Name	Hersteller
Schüttler	Ika Vortex Genius 3	Ika-Werke GmbH und Co. KG, Staufen, Deutschland
Tischzentrifuge	Spectrafuge Mini	Labnet international, Edison, USA
Inkubator		New Brunswick Scientific, Edison, USA
Zentrifuge	BR4i multifunction	Jouan industries SAS, St. Nazaire, Frankreich
pH-Meter	InoLab pH Level 1	WTW Wissenschaftlich-Technische Werkstätten GmbH, Weilheim, Deutschland
Massenspektrometrischer Detektor	Agilent Q-TOF 6540 UHD mit Masshunter B.05.00 - Software	Agilent Technologies, Waldbronn, Deutschland

Tab. 7.3.3.6-2: Verwendete Chemikalien/Verbrauchsmaterialien in Kapitel 7.3.3.

Name	Qualität	Hersteller
L-Ascorbinsäure	99%	Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland
Essigsäure p.A. (Eisessig)	p.A.	Merck, Darmstadt, Deutschland
Na-Acetat	p.A.	Merck, Darmstadt, Deutschland
Sulfatase from <i>Helix pomatia</i> Type H-1	22400 U/g	Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland
$\beta$ -Glucuronidase from bovine liver Type B-10	10100 U/mg	Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland
4-Methylcatechol	$\geq 95\%$	Fluka, Buchs, Schweiz
Catechol	$\geq 99\%$	Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland
Salicylsäure	$\geq 99\%$	Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland
Gentisinsäure	$\geq 98\%$	Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland
Salicylursäure	$\geq 96\%$	Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland
Methanol Lichrosolv®	HPLC-Qualität	Merck, Darmstadt, Deutschland
Nanosep-Filter	30 kDa Ausschlussgröße	Pall GmbH, Dreieich, Deutschland
Eppendorf-Gefäße Eppendorf Safe-Lock 1,5 ml		Eppendorf AG, Wesseling-Berzdorf, Deutschland



## 8. Zusammenfassung und Ausblick

In klinischen Studien sowie in verschiedenen Tiermodellen wurde die analgetische Wirksamkeit und die entzündungshemmende Wirkung von Weidenrindenextrakten gezeigt. Pharmakokinetische Studien belegten allerdings, dass für diese Wirkung nicht allein die aus den Salicylalkoholderivaten entstehende Salicylsäure verantwortlich gemacht werden kann. In dieser Arbeit sollten die Wirkungen der Salicylalkoholderivate in der Weidenrinde in Abgrenzung zur Salicylsäure genauer untersucht werden, um gegebenenfalls neue Wirkprinzipien der Droge zu entdecken.

Eine bioaktivitätsgeleitete Fraktionierung eines 70% ethanolschen Weidenrindenextraktes mit dem ICAM-1 Assay als anti-inflammatorisches Zellmodell, führte zu der Isolierung der zwei Salicylalkoholderivate Salicortin und Tremulacin. Die Strukturaufklärung erfolgte mittels zweidimensionaler NMR-Experimente. Bei diesen beiden Salicinderivaten handelte es sich um Strukturen mit einer 1-Hydroxy-6-oxo-2-cyclohexencarbonsäureester-Partialstruktur. Sie zeigten im ICAM-1 Assay eine dosisabhängige Hemmung der TNF- $\alpha$  induzierten ICAM-1-Expression. Damit wirkten sie *in vitro* entzündungshemmend. Allerdings ließ sich durch Stabilitätsuntersuchungen unter Assay-Bedingungen nachweisen, dass diese Wirkung nicht auf die Substanzen selbst, sondern auf ihr Abbauprodukt Catechol zurückzuführen war. Sowohl Salicortin als auch Tremulacin wurden unter Assay-Bedingungen fast vollständig abgebaut. Catechol wurde als Abbauprodukt dieser Substanzen mit einer 1-Hydroxy-6-oxo-2-cyclohexencarbonsäureester-Partialstruktur, welche Grundvoraussetzung für die Bildung von Catechol ist, quantifiziert. Das Ausmaß der Aktivität im Assay und damit der entzündungshemmenden Wirkung korrelierte mit dem Abbau zu Catechol. Zukünftig könnten noch weitere Strukturen mit einer 1-Hydroxy-6-oxo-2-cyclohexencarbonsäureester-Partialstruktur wie Acetylsalicortin aus dem Weidenrindenextrakt isoliert sowie ihre pharmakologische Aktivität und ihre Stabilität untersucht werden.

Im Rahmen der bioaktivitätsgeleiteten Fraktionierung wurde außerdem eine schnelle und einfache Methode zur Quantifizierung der Flavonoide in dem untersuchten Weidenrindenextrakt und seinen Fraktionen per HPLC-DAD entwickelt.

Die *in vivo* Relevanz des *in vitro* Abbaus von Salicylalkoholderivaten mit einer 1-Hydroxy-6-oxo-2-cyclohexencarbonsäureester-Partialstruktur zu Catechol wurde daraufhin mit Salicortin als Modellsubstanz überprüft. Nach oraler Gabe von 100 mg/kg KG Salicortin in Wistar-Ratten wurden sowohl Salicylsäure ( $t_{\max} = 4,0$  h;  $c_{\max} = 10,9$   $\mu\text{M}$ ;  $\text{AUC}_{0-8\text{h}} = 54,4$   $\mu\text{M}\cdot\text{h}$ ) als auch Catechol ( $t_{\max} = 0,5$  h;  $c_{\max} = 13,0$   $\mu\text{M}$ ;  $\text{AUC}_{0-8\text{h}} = 35,4$   $\mu\text{M}\cdot\text{h}$ ) als Metabolite von Salicortin in den enzymatisch aufgearbeiteten Seren der Tiere über einen Zeitraum von acht Stunden

detektiert. Catechol wurde im Messbereich der HPLC-DAD nicht als freies Molekül gefunden. Es zeigte sich, dass Catechol nur in konjugierter Form als Phase-II-Metabolit im Serum der Tiere zu finden war. Hierbei lag es hauptsächlich als Sulfat und nur zu einem sehr geringen Teil als Glucuronid vor. Weitere *in vivo* Studien zur Pharmakokinetik von Salicortin, bzw. Catechol mit mehr Tieren (bzw. mit Tieren, bei denen eine Verweilkanüle gelegt werden kann) und über einen längeren Zeitraum könnten noch eindeutigere pharmakokinetische Parameter zu Catechol liefern.

Es wurde außerdem eine pharmakokinetischen Studie beim BfArM und der zuständigen Ethikkommission beantragt. Nach Genehmigung und zustimmender Bewertung der Institutionen, wurde in der Studie über 24 Stunden untersucht, ob Catechol nach Einnahme eines standardisierten Weidenrindenextraktes (entsprach 240 mg Gesamtsalicin) von gesunden Freiwilligen im Serum dieser Probanden zu finden war. Eine enzymatische Aufarbeitungs- und Quantifizierungsmethode für die HPLC-DAD von Catechol und Salicylsäure aus menschlichem Serum wurde entwickelt und validiert. Diese Methode wurde ebenfalls für die Auswertung der oben genannten Rattenserum übernommen, da die Selektivität und die Wiederfindung aus beiden Matrices sehr gut vergleichbar waren. Catechol ( $t_{\max} = 1,2 \text{ h}$ ;  $c_{\max} = 13,3 \text{ } \mu\text{M}$ ;  $t_{1/2} = 2,5 \text{ h}$ ;  $\text{AUC}_{0-\infty} = 60,8 \text{ } \mu\text{M}\cdot\text{h}$ ) und Salicylsäure ( $t_{\max} = 2,7 \text{ h}$ ;  $c_{\max} = 24,5 \text{ } \mu\text{M}$ ;  $t_{1/2} = 2,4 \text{ h}$ ;  $\text{AUC}_{0-\infty} = 127,8 \text{ } \mu\text{M}\cdot\text{h}$ ) wurden in den enzymatisch aufgearbeiteten Seren der Probanden quantifiziert. Auch hier wurde Catechol nur als Konjugat, hauptsächlich als Sulfat und nur in äußerst geringen Mengen als Glucuronid detektiert.

Beide *in vivo* Studien zeigten erstmalig, dass Catechol sowohl im Tier als auch im Mensch ein Abbauprodukt und Metabolit von Salicylalkoholderivaten mit einer 1-Hydroxy-6-oxo-2-cyclohexencarbonsäureester-Partialstruktur ist. Für Catechol wurden in verschiedenen *in vitro* Modellen entzündungshemmende Eigenschaften beschrieben. Damit kann Catechol als ein neues Wirkprinzip der Weidenrinde angesehen werden.

Der entzündungshemmende Einfluss von Catechol gegenüber Salicylsäure als Metabolit von Salicortin wurde in Ratten durch die perorale Gabe von Salicortin im Vergleich zu äquimolaren Mengen Salicin untersucht. Der Einfluss auf die Expression verschiedener proinflammatorischer Zytokine sowie Marker des oxidativen Stresses wurde in der Carrageen-induzierten Entzündung im „Six-day old air pouch Modell“ untersucht. Der zusätzliche Effekt von Catechol zur Salicylsäure war am deutlichsten bei der Hemmung der Myeloperoxidase-Aktivität im Exsudat, ein Marker des oxidativen Stresses. Außerdem wurde die Expression des Zytokins Interleukin 6 im Exsudat durch die Applikation von Salicortin stärker gehemmt als durch Salicin. Bei allen weiteren quantifizierten Entzündungsmediatoren konnte keine Überlegenheit von Catechol festgestellt werden. Salicin konnte stärker als Salicortin die Expression von TNF- $\alpha$  sowohl im Exsudat als auch im Plasma reduzieren. Weitere Untersuchungen mit mehr Tieren pro Gruppe und zusätzliche Quantifizierung anderer Entzündungsparameter wie die

Leukozyten im Exsudat könnten im gleichen Versuchsregime mehr Aufschluss über die Wirkungen von Catechol in Abgrenzung zur Salicylsäure liefern.

Ein Phase-II-Metabolit von Catechol, das Catecholglucuronid, wurde synthetisiert und *in vitro* im ICAM-1 Assay auf seine potentiell entzündungshemmenden Eigenschaften getestet. Er zeigte keine Aktivität. In zukünftigen Studien müsste der eigentliche Haupt-Phase-II-Metabolit, das Catecholsulfat, synthetisiert und auf seine antiinflammatorischen Eigenschaften getestet werden. Ferner könnte der Einfluss von peripher wirksamen dekonjugierenden Enzymen auf die pharmakologische Wirkung der Phase-II-Metabolite untersucht werden.

Die vorliegende Arbeit zeigt, dass Catechol als Metabolit bestimmter Salicylalkoholderivate ein zusätzliches entzündungshemmendes Prinzip der Weidenrinde darstellt. Der Kern dieser Ergebnisfindung lag in der Stabilitätskontrolle des Salicortins unter ICAM-1-Assay-Bedingungen. Ohne diese Stabilitätsuntersuchung wäre Salicortin und nicht sein Abbauprodukt Catechol als die aktive Substanz im untersuchten Entzündungsmodell identifiziert worden. Sie führte zudem zu der Frage, ob dieser *in vitro* Befund auch *in vivo* eine Relevanz hat und lieferte letztendlich das Ergebnis, dass Catechol ein Metabolit der beschriebenen Salicynderivate in der Weidenrinde ist. Damit leistete die vorliegende Arbeit einen Beitrag zur Aufklärung des Wirkprinzips der Weidenrinde.



## 9. Abkürzungsverzeichnis

Abb	Abbildung
AMG	Arzneimittelgesetz
ASS	Acetylsalicylsäure
AUC	Area under the curve (Fläche unter der Serum-Konzentrations-Kurve)
BfArM	Bundesinstitut für Arzneimittel und Medizinprodukte
BMI	Body Mass Index (Körpergewicht [kg]/(Körpergröße [m]) <sup>2</sup> )
bzw	beziehungsweise
C <sub>max</sub>	höchste erreichte Wirkstoffkonzentration im Serum
COSY	Correlated Spectroscopy
COX	Cyclooxygenase
DAD	Dioden-Array-Detektor
DC	Dünnschichtchromatogramm, Dünnschichtchromatographie
DEV	Droge-Extrakt-Verhältnis
DMARD	Disease Modifying Antirheumatic Drugs
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
ECGM	Endothelial Cell Growth Medium
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EKG	Elektrokardiogramm
EMA	European Medicines Agency = Europäische Arzneimittelagentur
ESCAP	European Scientific Cooperative on Phytotherapy
ESI	Elektrosprayionisierung
EtOAc	Ethylacetat
EudraCT	European Union Drug Regulating Authorities Clinical Trials
FACS	Durchflussscytometer (fluorescence activated cell sorting)
FDA	Food and Drug Administration (Arzneimittelzulassungsbehörde USA)
FITC	Fluorescein-Isothiocyanat
FSC	Vorwärtsstreulicht
GCP-V	Verordnung über die Anwendung der guten klinischen Praxis bei der Durchführung von klinischen Prüfungen mit Arzneimitteln zur Anwendung am Menschen
GSH	Glutathion
HMBC	Heteronuclear Multiple Bond Correlation

HMEC-1	humane mikrovaskuläre Endothelzelllinie 1
HMPC	Committee on Herbal Medicinal Products
HPLC	Hochleistungsflüssigkeitschromatographie
HSQC	Heteronuclear Single Quantum Coherence
HUVEC	human umbilical vein endothelial cells (menschliche Nabelschnur-endothelzellen)
IARC	International Agency for Research on Cancer
ICAM	Interzelluläres Adhäsionsmolekül
I $\kappa$ B	Inhibitor of kappa B
IL	Interleukin
IS	interner Standard
Keap	Kelch like ECH associated Protein
KG	Körpergewicht
LD <sub>50</sub>	Letale Dosis für 50% der Versuchstiere
LOD	Limit of Detection (Detektionsgrenze)
LOQ	Limit of Quantification (Quantifizierungsgrenze)
LOX	Lipoxygenase
LPS	Lipopolysaccharid
LTB <sub>4</sub>	Leukotrien B <sub>4</sub>
MDA	Malondialdehyd
MPO	Myeloperoxidase
MS	massenspektrometrischer Detektor, Massenspektrometrie
MTT	3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazoliumbromid
MTX	Methotrexat
NAD(P)H	reduzierte Form von Nicotinamidadenindinukleotid(phosphat)
NF- $\kappa$ B	nukleärer Faktor kappa B
NMR	Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy (Kernspinresonanzspektroskopie)
NOESY	Nuclear Overhauser Enhancement Spectroscopy
Nrf2	Nuclear factor-erythroid 2-related factor 2
NSAR	nichtsteroidale Antirheumatika
PBS	Phosphatpuffer
PGE <sub>2</sub>	Prostaglandin E <sub>2</sub>
Ph. Eur.	Europäisches Arzneibuch
RA	rheumatoide Arthritis
REF	Redox Effector Factor
RNA	Ribonukleinsäure

## Abkürzungen

ROS	reaktive Sauerstoffspezies
RP18	Reversed Phase (Kieselgel mit Seitenketten aus 18 Kohlenstoffatomen)
SDS	Natriumdodecylsulfat
SSC	Seitwärtsstreulicht
StabW	Standardabweichung
$t_{1/2}$	Halbwertszeit
TFA	Trifluoressigsäure
THF	Tetrahydrofuran
$t_{\max}$	Zeitpunkt der höchsten Wirkstoffkonzentration im Serum
TNF- $\alpha$	Tumornekrosefaktor alpha
VCAM	vaskuläres Zelladhäsionsmolekül
V/V	Volumenanteil
WHO	Weltgesundheitsorganisation
WRE	Weidenrindenextrakt





## 10. Literaturverzeichnis

1. Bresinsky A, Jarosch B, Körner C. Strasburger - Lehrbuch der Botanik. 36. Ed. Heidelberg: Spektrum Akademischer Verlag; 2008.
2. Zander M. Untersuchung zur Identifizierung ausgewählter Vertreter der Gattung *Salix* L. im NO-deutschen Tiefland, unter besonderer Berücksichtigung des *Salix-repens*-Komplexes. In: Mitteilung zur floristischen Kartierung in Sachsen-Anhalt (Halle 2000): 3–137.
3. Gebhardt K. Neuzüchtung und Erprobung bisher nicht registrierter Weidenklone und -sorten. *Argrarholz*. 2010; 1–14.
4. Wichtl M. Teedrogen und Phytopharmaka. 5. Ed. Stuttgart: Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft; 2009.
5. Meier B, Meier-Liebi M. Monographie *Salix*. In: Hagers Enzyklopädie der Arzneistoffe und Drogen. 6 Ed. Stuttgart: Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft; 2007.
6. Schmeil O, Fitschen J, Senghas K. Flora von Deutschland und angrenzender Länder: Ein Buch zum Bestimmen der wildwachsenden und häufig kultivierten Gefäßpflanzen. 91. Ed. Wiebelsheim: Quelle & Meyer; 2000.
7. Mahdi JG, Mahdi AJ, Bowen ID. The historical analysis of aspirin discovery, its relation to the willow tree and antiproliferative and anticancer potential. *Cell Proliferation*. 2006; 39: 147–55.
8. Dombrowski K, Alferhmann AW. Salicylsäure — Das Universalpharmakon der Human- und Phytomedizin? Neue Erkenntnisse zur physiologischen Funktion der Salicylsäure bei Pflanzen. *Pharmazie in unserer Zeit*. 1993; 22: 275–85.
9. Hedner T, Everts B. The early clinical history of salicylates in rheumatology and pain. *Clinical Rheumatology*. 1998; 17: 17–25.
10. Buchner A. Über die Heilkräfte des Salicins. *Repertorium für die Pharmacie*. 1831; 39: 433–55.
11. MacLagan T. The treatment of rheumatism by salicin and salicylic acid. *British Medical Journal*. 1876; 1: 627.
12. Kolbe H. Über eine neue Darstellungsmethode und einige bemerkenswerte Eigenschaften der Salicylsäure. *Journal für Praktische Chemie*. 1874; 10: 89–112.
13. Wagner I, Biegert C, Heide L. Phytoanalgetika. Aktuelle Forschungsergebnisse zur Weidenrinde. *Pharmazeutische Zeitung*. 2003; 148: 1153–64.
14. März RW, Kemper F. Weidenrindenextrakt - Wirkungen und Wirksamkeit. Erkenntnisstand zu Pharmakologie, Toxikologie und Klinik. *Wiener Medizinische Wochenschrift* 2002; 152: 354–59.
15. Lardos A, Schmidlin C.B., Fischer M, Ferlas-Chlodny E, Loniewski I, Samochowiec L. Wirksamkeit und Verträglichkeit eines wässrig ausgezogenen Weidenrindenextraktes bei Patienten mit Hüft- und Kniearthrosen. *Zeitschrift für Phytotherapie*. 2004; 25: 275–81.

16. E/S/C/O/P monographs: The scientific foundation for herbal medicinal products. 2. Ed. Exeter, U.K, Stuttgart, Germany, New York: European Scientific Cooperative on Phytotherapy; Thieme; 2003.
17. HMPC. Committee on Herbal Medicinal Products. Community Herbal Monographs on Salix. [http://www.emea.europa.eu/docs/en\\_GB/document\\_library/Herbal\\_Community\\_herbal\\_monograph/2009/12/WC500018254.pdf](http://www.emea.europa.eu/docs/en_GB/document_library/Herbal_Community_herbal_monograph/2009/12/WC500018254.pdf). London 2007.
18. WHO monographs on selected medicinal plants. Genf: World Health Organization; 1999-2009.
19. Europäisches Arzneibuch 6. Ausgabe: 1. Nachtrag. Stuttgart: Deutscher Apotheker Verlag; 2009.
20. Meier B, Sticher O, Bettschart A. Weinrinden-Qualität: Gesamtsalicinbestimmung in Weidenrinden und Weidenpräparaten mit HPLC. Deutsche Apotheker Zeitung. 1985; 125: 341–47.
21. Meier B, Lehmann D, Sticher O, Bettschart A. Identifikation und Bestimmung von je acht Phenolglykosiden in *Salix purpurea* und *Salix daphnoides* mit moderner HPLC. Pharmaceutica Acta Helvetica. 1985; 60: 269–75.
22. Thieme H. Isolierung eines neuen Phenolglucosids aus *Salix purpurea* L. Die Pharmazie. 1964: 725.
23. Thieme H. Die Phenolglykoside der Salicaceen: 4. Mitteilung. Die Pharmazie. 1965: 436–39.
24. Pearl IA., Darling SF. The structures of salicortin and tremulacin. Phytochemistry. 1971: 3161–66.
25. Pobłocka-Olech L, van Nederkassel A, van der Heyden Y, Krauze-Baranowska M, Glód D, Baczek T. Chromatographic analysis of salicylic compounds in different species of the genus *Salix*. Journal of Separation Science. 2007; 30: 2958–66.
26. Freischmidt A, Jürgenliemk G, Kraus B, Okpanyi SN, Müller J, Kelber O, Weiser D, Heilmann J. Contribution of flavonoids and catechol to the reduction of ICAM-1 expression in endothelial cells by a standardised Willow bark extract. Phytomedicine. 2012; 19: 245–52.
27. Babst BA, Harding SA, Tsai C. Biosynthesis of phenolic glycosides from phenylpropanoid and benzenoid precursors in populus. Journal of Chemical Ecology. 2010; 36: 286–97.
28. Julkunen-Tiitto R, Meier B. The enzymatic decomposition of salicin and its derivatives obtained from salicaceae species. Journal of Natural Products. 1992; 55: 1204–12.
29. Ruuhola T, Julkunen-Tiitto R, Vainiotalo P. In vitro degradation of willow salicylates. Journal of Chemical Ecology. 2003; 29: 1083–97.
30. Clausen TP, Reichardt PB, Bryant JP, Werner RA, Post K, Frisby K. Chemical model for short-term induction in quaking aspen (*Populus tremuloides*) foliage against herbivores. Journal of Chemical Ecology. 1989; 15: 2335–46.
31. Ruuhola T, Tikkanen OP, Tahvanainen J. Differences in host use efficiency of larvae of a generalist moth, *Operophtera brumata* on three chemically divergent *Salix* species. Journal of Chemical Ecology. 2001; 27: 1595–615.

32. Freischmidt A. Phytochemische, analytische und pharmakologische in vitro Untersuchungen zu den phenolischen Inhaltsstoffen eines standardisierten Weidenrindenextraktes. Dissertation. Regensburg; 2011.
33. Jürgenliemk G, Petereit F, Nahrstedt A. Flavan-3-ols and procyanidins from the bark of *Salix purpurea* L. Pharmazie. 2007; 62: 231–34.
34. Pobłocka-Olech L, Krauze-Baranowska M, Głód D, Kawiak A, Łojkowska E. Chromatographic analysis of simple phenols in some species from the genus *Salix*. Phytochemical Analysis. 2010; 21: 463–69.
35. Glinko A. Pharmacological properties of a standardized extract from willow bark (cortex salicis). Dissertation. Stettin; 1998.
36. Khayyal MT, El-Ghazaly MA, Abdallah DM, Okpanyi SN, Kelber O, Weiser D. Mechanisms involved in the anti-inflammatory effect of a standardized willow bark extract. Arzneimittelforschung. 2005; 55: 677–87.
37. Nahrstedt A, Schmidt M, Jäggi R, Metz J, Khayyal MT. Willow bark extract: the contribution of polyphenols to the overall effect. Wiener Medizinische Wochenschrift. 2007; 157: 348–51.
38. Ulrich-Merzenich G, Kelber O, Koptina A, Freischmidt A, Heilmann J, Müller J. Novel neurological and immunological targets for salicylate-based phytopharmaceuticals and for the anti-depressant imipramine. Phytomedicine. 2012; 19: 930–39.
39. Gagnier JJ, van Tulder M, Berman B, Bombardier C. Herbal medicine for low back pain. Cochrane Database Syst Rev. 2006, 2, Artikelnummer: CD004504.
40. Chrubasik S, Eisenberg E, Balan E, Weinberger T, Luzzati R, Conradt C. Treatment of low back pain exacerbations with willow bark extract: a randomized double-blind study. The American Journal of Medicine. 2000; 109: 9–14.
41. Chrubasik S, Künzel O, Black A, Conradt C, Kerschbaumer F. Potential economic impact of using a proprietary willow bark extract in outpatient treatment of low back pain: an open non-randomized study. Phytomedicine. 2001; 8: 241–51.
42. Krivoy N, Pavlotzky E, Chrubasik S, Eisenberg E, Brook G. Effect of salicis cortex extract on human platelet aggregation. Planta Medica. 2001; 67: 209–12.
43. Schmid B, Lüdtke R, Selbmann H, Kötter I, Tschirdewahn B, Schaffner W, Heide L. Wirksamkeit und Verträglichkeit eines standardisierten Weidenrindenextraktes bei Arthrose-Patienten: Randomisierte, placebokontrollierte Doppelblindstudie. Zeitschrift für Rheumatologie. 2000; 59: 314–20.
44. Schmid B, Lüdtke R, Selbmann HK, Kötter I, Tschirdewahn B, Schaffner W, Heide L. Efficacy and tolerability of a standardized willow bark extract in patients with osteoarthritis: randomized placebo-controlled, double blind clinical trial. Phytotherapy Research. 2001; 15: 344–50.
45. Biegert C. Eine randomisierte, kontrollierte klinische Studie zur Wirksamkeit und Verträglichkeit eines standardisierten Weidenrindenextraktes in der Behandlung von Cox- und Gonarthrosen. Dissertation. Tübingen; 2003.
46. Biegert C, Wagner I, Lüdtke R, Kötter I, Lohmüller C, Günaydin I, Taxis K, Heide L. Efficacy and safety of willow bark extract in the treatment of osteoarthritis and rheumatoid arthritis: results of 2 randomized double-blind controlled trials. The Journal of Rheumatology. 2004; 31: 2121–30.

47. Beer A, Wegener T. Willow bark extract (salicis cortex) for gonarthrosis and coxarthrosis - results of a cohort study with a control group. *Phytomedicine*. 2008; 15: 907–13.
48. Wagner I. Pharmakologische und klinische Untersuchungen zur Wirksamkeit eines standardisierten Weidenrindenextraktes. Dissertation. Tübingen; 2003.
49. Wegener T. Zur Studienlage von Weidenrindenextrakten. *Zeitschrift für Phytotherapie*. 2009; 30: 232–37.
50. Vlachojannis JE, Cameron M, Chrubasik S. A systematic review on the effectiveness of willow bark for musculoskeletal pain. *Phytotherapy Research*. 2009; 23: 897–900.
51. Akao T, Yoshino T, Kobashi K, Hattori M. Evaluation of salicin as an antipyretic prodrug that does not cause gastric injury. *Planta Medica*. 2002; 68: 714–18.
52. Pentz R, Busse HG, König R, Siegers C. Bioverfügbarkeit von Salicylsäure und Coffein aus einem phytoanalgetischen Kombinationspräparat. *Deutsche Apotheker Zeitung*. 1989; 129: 277–79.
53. Schmid B, Kötter I, Heide L. Pharmacokinetics of salicin after oral administration of a standardised willow bark extract. *European Journal of Clinical Pharmacology*. 2001; 57: 387–391.
54. Steinegger E, Hövel H. Analytische und biologische Untersuchungen an Salicaceen-Wirkstoffen, insbesondere an Salicin. *Pharmaceutica Acta Helvetica*. 1972, 47: 222–34.
55. Amann R, Peskar BA. Anti-inflammatory effects of aspirin and sodium salicylate. *European Journal of Pharmacology*. 2002; 447: 1–9.
56. Fürst R, Blumenthal SB, Kierner AK, Zahler S, Vollmar AM. Nuclear factor-kappa B-independent anti-inflammatory action of salicylate in human endothelial cells: induction of heme oxygenase-1 by the c-jun N-terminal kinase/activator protein-1 pathway. *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*. 2006; 318: 389–94.
57. Fiebich BL, Chrubasik S. Effects of an ethanolic salix extract on the release of selected inflammatory mediators *in vitro*. *Phytomedicine*. 2004; 11: 135–38.
58. Bonaterra G, Heinrich E, Kelber O, Weiser D, Metz J, Kinscherf R. Anti-inflammatory effects of the willow bark extract STW 33-I (Proaktiv®) in LPS-activated human monocytes and differentiated macrophages. *Phytomedicine*. 2010; 17: 1106–13.
59. Ulrich-Merzenich G, Jobst D, Hartbrod F, Zeitler H, Vetter H. Comparison of gene- and protein expression profiles of a standardized willow bark extract with quercetin and non-steroidal antiinflammatory drugs in human chondrocytes. *Planta Medica*. 2008; 74. Kongressbeitrag.
60. Hostanska K, Jürgenliemk G, Abel G, Nahrstedt A, Saller R. Willow bark extract (BNO1455) and its fractions suppress growth and induce apoptosis in human colon and lung cancer cells. *Cancer Detection and Prevention*. 2007; 31: 129–39.
61. Ishikado A, Sono Y, Matsumoto M, Robida-Stubbs S, Okuno A, Goto M, King GL, Blackwell K, Makino T. Willow bark extract increases antioxidant enzymes and reduces oxidative stress through activation of Nrf2 in vascular endothelial cells and *caenorhabditis elegans*. *Free Radical Biology and Medicine*. 2012. doi: 10.1016/j.freeradbiomed.2012.12.006 [elektronische Veröffentlichung vor dem Druck].

62. Yang H, Lee SH, Sung SH, Kim J, Kim YC. Neuroprotective compounds from *Salix pseudo-lasiogyne* twigs and their anti-amnesic effects on scopolamine-induced memory deficit in mice. *Planta Medica*. 2013; 79: 78–82.
63. Arzneimittelkommission der deutschen Ärzteschaft. Therapieempfehlungen der Arzneimittelkommission der deutschen Ärzteschaft: Degenerative Gelenkerkrankungen. 3. Ed. Köln; 2008.
64. Bundesärztekammer (BÄK), kassenärztliche Bundesvereinigung (KBV), Arbeitsgemeinschaft der wissenschaftlichen medizinischen Fachgesellschaften (AMWF). Nationale Versorgungsleitlinie-Langfassung. Version 1.2 2010. Verfügbar von: <http://www.versorgungsleitlinien.de/themen/kreuzschmerz>.
65. Gabriel SE, Michaud K. Epidemiological studies in incidence, prevalence, mortality, and comorbidity of the rheumatic diseases. *Arthritis Research and Therapy*. 2009; 11: 229–45.
66. Vitetta L, Coulson S, Schloss R, Beck S, Allen R, Sali A. Dietary recommendations for patients with rheumatoid arthritis: a review. *Nutrition and Dietary Supplements*. 2012; 4: 1–15.
67. Deutsche Gesellschaft für Rheumatologie. S1 Leitlinien: medikamentöse Therapie der rheumatoiden Arthritis: Handlungsempfehlungen der DGR zur sequentiellen medikamentösen Therapie der rheumatoiden Arthritis 2012: adaptierte EULAR Empfehlungen und aktualisierter Therapiealgorithmus. Verfügbar von: <http://dgrh.de/rheumagesellschaft.html>.
68. Heilmann J. Wirkstoffe auf Basis biologisch aktiver Naturstoffe. *Chemie in unserer Zeit*. 2007; 41: 376–89.
69. Bley F. Design, Synthese und Untersuchung von o-Nitrobenzylsystemen mit gesteigerter Bathochromie und Hydrophilie. Dissertation. Düsseldorf; 2005.
70. Rücker G, Neugebauer MWG. Instrumentelle pharmazeutische Analytik. 3. Ed. Stuttgart: Wissenschaftliche Verlags-Gesellschaft; 2001.
71. Streuli CA. The interaction of aromatic compounds in alcohol solution with sephadex LH-20 dextran. *Journal of Chromatography A*. 1971; 56: 219–23.
72. Wilk M, Rochlitz J, Bende H. Säulenchromatographie von polycyclischen aromatischen Kohlenwasserstoffen an lipophilem Sephadex LH-20. *Journal of Chromatography A*. 1966; 24: 414–16.
73. Still WC, Kahn M, Mitra A. Rapid chromatographic technique for preparative separations with moderate resolution. *The Journal of Organic Chemistry*. 1978; 43: 2923–25.
74. Glasl H. Zur Photometrie in der Drogenstandardisierung: 3. Gehaltsbestimmung der Gerbstoffdrogen. *Deutsche Apotheker Zeitung*. 1983; 123: 1979–87.
75. Koerner TAW, Prestegard JH, Demou PC, Yu RK. High-resolution proton NMR studies of gangliosides. 1. Use of homonuclear two-dimensional spin-echo J-correlated spectroscopy for determination of residue composition and anomeric configurations. *Biochemistry*. 1983; 22: 2676–87.
76. Silverstein RM, LaLonde RT. Chemical shift equivalence and magnetic equivalence in conformationally mobile molecules. *Journal of Chemical Education*. 1980; 57: 343.
77. Europäisches Arzneibuch 6. Ausgabe: Grundwerk. Stuttgart: Deutscher Apotheker Verlag; 2008.

78. Tak PP, Firestein GS. NF- $\kappa$ B: a key role in inflammatory diseases. *Journal of Clinical Investigation*. 2001; 107: 7–11.
79. Cronstein BN, Weissmann G. The adhesion molecules of inflammation. *Arthritis and Rheumatism*. 1993; 36: 147–57.
80. Chavakis E, Choi EY, Chavakis T. Novel aspects in the regulation of the leukocyte adhesion cascade. *Thrombosis and Haemostasis*. 2009, 2:191-97.
81. Ley K, Laudanna C, Cybulsky MI, Nourshargh S. Getting to the site of inflammation: the leukocyte adhesion cascade updated. *Nature Reviews Immunology*. 2007; 7: 678–89.
82. Davies ME, Sharma H, Pigott R. ICAM-1 expression on chondrocytes in rheumatoid arthritis: induction by synovial cytokines. *Mediators of Inflammation*. 1992; 1: 71–74.
83. Brennan FM, Maini RN, Feldmann M. TNF alpha-a pivotal role in rheumatoid arthritis? *British Journal of Rheumatology*. 1992; 31: 293–98.
84. Scott ML, Fujita T, Liou HC, Nolan GP, Baltimore D. The p65 subunit of NF-kappa B regulates I kappa B by two distinct mechanisms. *Genes & Development*. 1993; 7: 1266–76.
85. Williams R, Feldmann M, Maini R. Anti-tumor necrosis factor ameliorates joint disease in murine collagen-induced arthritis. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 1992; 20: 9784–88.
86. Lucignani, G. Rubor, calor, tumor, dolor, functio laesa... or molecular imaging. *European Journal of Nuclear Medicine and Molecular Imaging*. 2007; 34: 2135–2141.
87. Dirsch VM, Keiss H, Vollmar AM. Garlic metabolites fail to inhibit the activation of the transcription factor NF-kappaB and subsequent expression of the adhesion molecule E-selectin in human endothelial cells. *European Journal of Nutrition*. 2004; 43: 55–59.
88. Caliş I, Barbic M, Jürgenliemk G. Bioactive cycloartane-type triterpene glycosides from *Astragalus elongatus*. *Zeitschrift für Naturforschung*. 2008; 63: 813–20.
89. Ades EW, Candal FJ, Swerlick RA, George VG, Summers S, Bosse DC, Lawley TJ. HMEC-1: establishment of an immortalized human microvascular endothelial cell line. *The Journal of Investigative Dermatology*. 1992; 99: 683–90.
90. Hehner SP, Hofmann TG, Dröge W, Schmitz ML. The antiinflammatory sesquiterpene lactone parthenolide inhibits NF-kappa B by targeting the I kappa B kinase complex. *Journal of Immunology*. 1999; 163: 5617–23.
91. Mosmann T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *Journal of Immunology. Methods*. 1983; 65: 55–63.
92. Berridge MV, Tan AS, McCoy KD, Wang R. The biochemical and cellular basis of cell proliferation assays that use tetrazolium salts. *Biochemia*. 1996; 4: 14–19.
93. Ma Q, Kinneer K. Chemoprotection by phenolic antioxidants. Inhibition of tumor necrosis factor alpha induction in macrophages. *The Journal of Biological Chemistry*. 2002; 277: 2477–84.
94. Zheng LT, Ryu G, Kwon B, Lee W, Suk K. Anti-inflammatory effects of catechols in lipopolysaccharide-stimulated microglia cells: inhibition of microglial neurotoxicity. *European Journal of Pharmacology*. 2008; 588: 106–13.

95. He W, Ma Z, Yong T, Teo WE, Ramakrishna S. Fabrication of collagen-coated biodegradable polymer nanofiber mesh and its potential for endothelial cells growth. *Biomaterials*. 2005; 26: 7606–15.
96. Richard N, Arnold S, Hoeller U, Kilpert C, Wertz K, Schwager J. Hydroxytyrosol is the major anti-inflammatory compound in aqueous olive extracts and impairs cytokine and chemokine production in macrophages. *Planta Medica*. 2011; 77: 1890–97.
97. Buß T. Studie über die Einnahme von Weidenrinden-Extrakt, Salicin und Salicortin sowie Synthesen von Salicylsäure-Glycosiden und Salicin-Analoga. Dissertation. Marburg; 2005.
98. Schweigert N, Hunziker RW, Escher BI, Eggen RIL. Acute toxicity of (chloro-)catechols and (chloro-)catechol-copper combinations in *Escherichia coli* corresponds to their membrane toxicity in vitro. *Environmental Toxicology and Chemistry*. 2001; 20: 239–47.
99. Bailey PM, Dempsey DT, Crosby LO, Mullen JL, Buzby GP. A quantitative evaluation of stress associated with indwelling superior vena cava cannulae in rats. *Journal of Surgical Research*. 1985; 38: 530–36.
100. Perez-Vizcaino F, Duarte J, Santos-Buelga C. The flavonoid paradox: conjugation and deconjugation as key steps for the biological activity of flavonoids. *Journal of the Science of Food and Agriculture*. 2012; 92: 1822–25.
101. Day AJ, Mellon F, Barron D, Sarrazin G, Morgan MR, Williamson G. Human metabolism of dietary flavonoids: Identification of plasma metabolites of quercetin. *Free Radical Research*. 2001; 35: 941–52.
102. Kroon PA, Clifford MN, Crozier A, Day AJ, Donovan JL, Manach C, Williamson G. How should we assess the effects of exposure to dietary polyphenols in vitro? *The American Journal of Clinical Nutrition*. 2004; 80: 15–21.
103. La Torre R de. Bioavailability of olive oil phenolic compounds in humans. *Inflammopharmacology*. 2008; 16: 245–47.
104. Koenigs W, Knorr E. Ueber einige Derivate des Traubenzuckers und der Galactose. *Berichte der deutschen chemischen Gesellschaft*. 1901; 34: 957–81.
105. Wulff G, Röhle G. Untersuchungen zur Glykosidsynthese, VI. Kinetische Untersuchungen zum Mechanismus der Koenigs-Knorr-Reaktion. *Chemische Berichte*. 1972; 105: 1122–32.
106. Needs PW, Kroon PA. Convenient syntheses of metabolically important quercetin glucuronides and sulfates. *Tetrahedron*. 2006; 62: 6862–68.
107. Lucas R, Alcantara D, Morales JC. A concise synthesis of glucuronide metabolites of urolithin-B, resveratrol, and hydroxytyrosol. *Carbohydrate Research*. 2009; 344: 1340–46.
108. González-Manzano S, González-Paramás A, Santos-Buelga C, Dueñas M. Preparation and characterization of catechin sulfates, glucuronides, and methylethers with metabolic interest. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*. 2009; 57: 1231–38.
109. Maloney DJ, Hecht SM. Synthesis of a potent and selective inhibitor of p90 rsk. *Organic Letters*. 2005; 7: 1097–99.

110. Boer VCJ de, Dihal AA, van der Woude H, Arts ICW, Wolffram S, Alink GM, Rietjens IMCM; Keijer Jaap; Hollman PCH. Tissue distribution of quercetin in rats and pigs. *The Journal of Nutrition*. 2005; 135: 1718–25.
111. Menendez C, Dueñas M, Galindo P, González-Manzano S, Jimenez R, Moreno L, Zarzuelo MJ; Rodríguez-Gómez I; Duarte J; Santos-Buelga C; Perez-Vizcaino F. Vascular deconjugation of quercetin glucuronide: the flavonoid paradox revealed? *Molecular Nutrition and Food Res*. 2011; 55: 1780–90.
112. Shimoi K, Nakayama T. Glucuronidase deconjugation in inflammation. In: *Phase II conjugation enzymes and transport systems. Methods in Enzymology*. 2005; 400: 263–72.
113. Galindo P, Rodriguez-Gómez I, González-Manzano S, Dueñas M, Jiménez R, Menéndez C, Vargas F, Tamargo J, Santos-Buelga, C; Pérez-Vizcaíno F; Duarte J. Glucuronidated quercetin lowers blood pressure in spontaneously hypertensive rats via deconjugation. *PLoS ONE*. 2012; 7: e32673.
114. Purohit A, Williams GJ, Howarth NM, Potter BVL, Reed MJ. Inactivation of steroid sulfatase by an active site-directed inhibitor, estrone-3-O-sulfamate. *Biochemistry*. 1995; 34: 11508–14.
115. Li PK, Milano S, Kluth L, Rhodes ME. Synthesis and sulfatase inhibitory activities of non-steroidal estrone sulfatase inhibitors. *The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology*. 1996; 59: 41–48.
116. Stanway SJ, Purohit A, Woo LWL, Sufi S, Vigushin D, Ward R, Wilson RH; Stanczyk FZ.; Dobbs N; Kulinskaya E; Elliott M; Potter BVL.; Reed MJ; Coombes RC. Phase I study of STX 64 (667 Coumate) in breast cancer patients: the first study of a steroid sulfatase inhibitor. *Clinical Cancer Research*. 2006; 12: 1585–92.
117. Singh U, Tabibian J, Venugopal SK, Devaraj S, Jialal I. Development of an *in vitro* screening assay to test the antiinflammatory properties of dietary supplements and pharmacologic agents. *Clinical Chemistry*. 2005; 51: 2252–56.
118. Toledo F, Wahl GM. Regulating the p53 pathway: in vitro hypotheses, in vivo veritas. *Nature Reviews Cancer*. 2006; 6: 909–23.
119. Persson CG. In vivo veritas: the continuing importance of discoveries in complex biosystems. *Thorax*. 1996; 51: 441–43.
120. Aceves M, Dueñas A, Gómez C, San Vicente E, Crespo MS, García-Rodríguez C. A new pharmacological effect of salicylates: inhibition of NFAT-dependent transcription. *Journal of Immunology*. 2004; 173: 5721–29.
121. Edwards JCW, Sedgwick AD, Willoughby DA. The formation of a structure with the features of synovial lining by subcutaneous injection of air: An in vivo tissue culture system. *The Journal of Pathology*. 1981; 134: 147–56.
122. Romano M, Faggioni R, Sironi M, Sacco S, Echtenacher B, Di Santo E, Salmona M; Ghezzi P. Carrageenan-induced acute inflammation in the mouse air pouch synovial model. Role of tumour necrosis factor. *Mediators of Inflammation*. 1997; 6: 32–38.
123. Martin SW, Stevens AJ, Brennan BS, Davies D, Rowland M, Houston JB. The six-day-old rat air pouch model of inflammation: characterization of the inflammatory response to carrageenan. *Journal of Pharmacological and Toxicological Methods*. 1994; 32: 139–47.
124. Feldmann M, Brennan FM, Maini RN. Role of cytokines in rheumatoid arthritis. *Annual Review of Immunology*. 1996; 14: 397–440.



125. van den Berg WB. The role of cytokines and growth factors in cartilage destruction in osteoarthritis and rheumatoid arthritis. *Zeitschrift für Rheumatologie*. 1999; 58: 136–41.
126. Fong KY, Boey ML, Koh WH, Feng PH. Cytokine concentrations in the synovial fluid and plasma of rheumatoid arthritis patients: correlation with bony erosions. *Clinical and Experimental Rheumatology*. 1994; 12: 55–58.
127. Eastgate J, Wood N, Di Giovine F, Symons J, Grinlinton F, Duff G. Correlation of plasma interleukin 1 levels with disease activity in rheumatoid arthritis. *The Lancet*. 1988; 332: 706–09.
128. Dinarello CA. Proinflammatory cytokines. *Chest*. 2000;118 : 503–08.
129. Mengshol JA, Vincenti MP, Coon CI, Barchowsky A, Brinckerhoff CE. Interleukin-1 induction of collagenase 3 (matrix metalloproteinase 13) gene expression in chondrocytes requires p38, c-jun N-terminal kinase, and nuclear factor  $\kappa$ B: Differential regulation of collagenase 1 and collagenase 3. *Arthritis & Rheumatism*. 2000; 43: 801–11.
130. Cohen SB, Moreland LW, Cush JJ, Greenwald MW, Block S, Shergy WJ, Hanrahan PS; Kraishi MM; Patel A; Sun G, Bear MB. A multicentre, double blind, randomised, placebo controlled trial of anakinra (Kineret), a recombinant interleukin 1 receptor antagonist, in patients with rheumatoid arthritis treated with background methotrexate. *Annals of the Rheumatic Diseases*. 2004; 63: 1062–68.
131. Goldring MB. Osteoarthritis and cartilage: the role of cytokines. *Current Rheumatology Reports*. 2000; 2: 459–65.
132. Kay J, Calabrese L. The role of interleukin-1 in the pathogenesis of rheumatoid arthritis. *Rheumatology (Oxford)*. 2004; 43: iii2–iii9.
133. Brennan FM, Maini RN, Feldmann M. TNF $\alpha$ - a pivotal role in rheumatoid arthritis? *Rheumatology*. 1992; 31: 293–98.
134. Charles P, Elliott MJ, Davis D, Potter A, Kalden JR, Antoni C, Breedveld FC; Smolen JS; Eberl G; deWoody K; Feldmann M; Maini RN. Regulation of cytokines, cytokine inhibitors, and acute-phase proteins following anti-TNF-alpha therapy in rheumatoid arthritis. *Journal of Immunology*. 1999; 163: 1521–28.
135. MSD Sharp and Dohme GmbH. Fachinformation zu Remicade. Berlin: Rote Liste Service GmbH FachInfo-Service; 2012.
136. Maini R, St Clair EW, Breedveld F, Furst D, Kalden J, Weisman M, Smolen J; Emery P; Harriman G; Feldmann M; Lipsky P. Infliximab (chimeric anti-tumour necrosis factor alpha monoclonal antibody) versus placebo in rheumatoid arthritis patients receiving concomitant methotrexate: a randomised phase III trial. ATTRACT Study Group. *Lancet*. 1999; 354: 1932–39.
137. Weinblatt ME, Kremer JM, Bankhurst AD, Bulpitt KJ, Fleischmann RM, Fox RI, Jackson CG; Lange M; Burge DJ. A trial of etanercept, a recombinant tumor necrosis factor receptor:Fc fusion protein, in patients with rheumatoid arthritis receiving methotrexate. *The New England Journal of Medicine*. 1999; 340: 253–59.
138. Pfizer Pharma GmbH. Fachinformation zu Enbrel. Berlin: Rote Liste Service GmbH FachInfo-Service; 2012.
139. Nishimoto N. Interleukin-6 in rheumatoid arthritis. *Current Opinion in Rheumatology*. 2006; 18: 277–81.

140. Jones SA. Directing transition from innate to acquired immunity: defining a role for IL-6. *Journal of Immunology*. 2005; 175: 3463–68.
141. Alonzi T, Fattori E, Lazzaro D, Costa P, Probert L, Kollias G, de Benedetti F, Poli V, Ciliberto G. Interleukin 6 is required for the development of collagen-induced arthritis. *The Journal of Experimental Medicine*. 1998; 187: 461–68.
142. Roche Pharma AG. Fachinformation zu RoActemra. Berlin: Rote Liste Service GmbH FachInfo-Service; 2012.
143. Bedard K, Krause K. The NOX family of ROS-generating NADPH oxidases: physiology and pathophysiology. *Physiological Reviews*. 2007; 87: 245–313.
144. Ghezzi P. Role of glutathione in immunity and inflammation in the lung. *International Journal of General Medicine*. 2011; 4: 105-113
145. Jaswal S, Mehta HC, Sood AK, Kaur J. Antioxidant status in rheumatoid arthritis and role of antioxidant therapy. *Clinica Chimica Acta*. 2003; 338: 123–29.
146. Koster J F, Biemond P, Swaak A J. Intracellular and extracellular sulphydryl levels in rheumatoid arthritis. *Annals of the Rheumatic Diseases*. 1986; 45: 44–46..
147. Nielsen F, Mikkelsen BB, Nielsen JB, Andersen HR, Grandjean P. Plasma malondialdehyde as biomarker for oxidative stress: reference interval and effects of life-style factors. *Clinical Chemistry*. 1997; 43: 1209–14.
148. Malle E, Furtmüller PG, Sattler W, Obinger C. Myeloperoxidase: a target for new drug development? *British Journal of Pharmacology*. 2007; 152: 838–54.
149. Stamp LK, Khalilova I, Tarr JM, Senthilmohan R, Turner R, Haigh RC, Winyard PG, Kettle AJ. Myeloperoxidase and oxidative stress in rheumatoid arthritis. *Rheumatology (Oxford)*. 2012; 51: 1796–803.
150. Halliwell B, Wasil M, Grootveld M. Biologically significant scavenging of the myeloperoxidase-derived oxidant hypochlorous acid by ascorbic acid. Implications for antioxidant protection in the inflamed rheumatoid joint. *FEBS Letters*. 1987; 213: 15–17.
151. Wauters J, Pille F, Martens A, Franck T, Serteyn D, Gasthuys F, Meyer E. Equine myeloperoxidase: A novel biomarker in synovial fluid for the diagnosis of infection. *Equine Veterinary Journal*. 2013; 45: 278-83.
152. Bhagat K, Vallance P. Inflammatory cytokines impair endothelium-dependent dilatation in human veins in vivo. *Circulation*. 1997; 96: 3042–47.
153. Ikonomidis I, Andreotti F, Economou E, Stefanadis C, Toutouzas P, Nihoyannopoulos P. Increased proinflammatory cytokines in patients with chronic stable angina and their reduction by aspirin. *Circulation*. 1999; 100: 793–98.
154. Yin MJ, Yamamoto Y, Gaynor RB. The anti-inflammatory agents aspirin and salicylate inhibit the activity of I(kappa)B kinase-beta. *Nature*. 1998; 396: 77–80.
155. Schweigert N, Zehnder AJ, Eggen RI. Chemical properties of catechols and their molecular modes of toxic action in cells, from microorganisms to mammals. *Environmental Microbiology*. 2001; 3: 81–91.
156. Ma Q, Kinneer K, Ye J, Chen BJ. Inhibition of nuclear factor kappaB by phenolic antioxidants: interplay between antioxidant signaling and inflammatory cytokine expression. *Molecular Pharmacology*. 2003; 64: 211–19.

157. Khor T, Yu S, Kong A. Dietary cancer chemopreventive agents – targeting inflammation and Nrf2 signaling pathway. *Planta Medica*. 2008; 74: 1540–47.
158. Surh Y, Kundu JK, Na H. Nrf2 as a master redox switch in turning on the cellular signaling involved in the induction of cytoprotective genes by some chemopreventive phytochemicals. *Planta Medica*. 2008; 74: 1526–39.
159. Zenkov NK, Menshchikova EB, Tkachev VO. Keap1/Nrf2/ARE Redox-sensitive signaling system as a pharmacological target. *Biochemistry Moscow*. 2013; 78: 19–36.
160. Ellmann GL. Tissue sulfhydryl groups. *Archives of Biochemistry and Biophysics*. 1959; 82: 70–77.
161. Wong SH, Knight JA, Hopfer SM, Zaharia O, Leach CN, Sunderman FW. Lipoperoxides in plasma as measured by liquid-chromatographic separation of malondialdehyde-thiobarbituric acid adduct. *Clinical Chemistry*. 1987; 33: 214–20.
162. Krawitsz JE, Sharon P, Stenson WF. Quantitative assay for acute intestinal inflammation based on myeloperoxidase activity: assessment of inflammation in rat and hamster models. *Gastroenterology*. 1984; 87: 1344-1350.
163. Bradley PP, Priat DA, Chrstensen RD, Rothstein G. Measurement of cutaneous inflammation: estimation of neutrophil content with an enzyme marker. *Journal of Investigative Dermatology*. 1982; 78: 206-209.
164. Food and Drug Administration. Bioanalytical method validation, guidance for industry; 2001. Verfügbar unter: <http://www.fda.gov/downloads/Drugs/Guidances/ucm070107.pdf>.
165. Pschyrembel W, Bach M. Pschyrembel Klinisches Wörterbuch 2011. 262. Ed. Berlin: De Gruyter; 2010.
166. Aktories K, Forth W, Allgaier C. Allgemeine und spezielle Pharmakologie und Toxikologie. 10. Ed. München: Elsevier, Urban & Fischer; 2009.
167. Martignoni M, Groothuis GMM, de Kanter R. Species differences between mouse, rat, dog, monkey and human CYP-mediated drug metabolism, inhibition and induction. *Expert Opinion on Drug Metabolism & Toxicology*. 2006; 2: 875–94.
168. Leanderson P, Tagesson C. Cigarette smoke-induced DNA-damage: role of hydroquinone and catechol in the formation of the oxidative DNA-adduct, 8-hydroxydeoxyguanosine. *Chemico-Biological Interactions*. 1990; 75: 71–81.
169. WHO International Agency for research on cancer. IARC Monographs on the evaluation of the carcinogenic risks to humans: Re-evaluation of some organic chemicals, hydrazine and hydrogen peroxide, Band 71. Lyon: WHO; 1999.
170. Prior RL. Fruits and vegetables in the prevention of cellular oxidative damage. *The American Journal of Clinical Nutrition*. 2003; 78: 570-78.
171. Yamashita N, Tanemura H, Kawanishi S. Mechanism of oxidative DNA damage induced by quercetin in the presence of Cu(II). *Mutation Research*. 1999; 425: 107–15.
172. Gibellini L, Pinti M, Nasi M, Montagna JP, Biasi S de, Roat E, Bertoncelli L, Cooper EL; Cossarizza A. Quercetin and cancer chemoprevention. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*. 2011; 3: 1–15.
173. Lang R, Mueller C, Hofmann T. Development of a stable isotope dilution analysis with liquid chromatography–tandem mass spectrometry detection for the quantitative analy-

- sis of di- and trihydroxybenzenes in foods and model systems. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*. 2006; 54: 5755–62.
174. Fujioka K, Shibamoto T. Quantitation of volatiles and nonvolatile acids in an extract from coffee beverages: Correlation with antioxidant activity. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*. 2006; 54: 6054–58.
175. Papadopoulos G, Boskou D. Antioxidant effect of natural phenols on olive oil: *Journal of the American Oil Chemists Society*. 1991; 68: 669-671.