

**Phytochemische, pharmakologische und chemoökologische
Untersuchungen zu Sesquiterpenlactonen
aus Kamille, Schafgarbe und Arnika**



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

vorgelegt von

Marcel Flemming

aus Schneizlreuth

Die vorliegende Arbeit wurde im Zeitraum von Mai 2010 bis April 2014 am Lehrstuhl für Pharmazeutische Biologie der Universität Regensburg unter Anleitung von Herrn Prof. Dr. Jörg Heilmann angefertigt.

Promotionsgesuch eingereicht am: 11.08.2014
Datum der mündlichen Prüfung: 25.09.2014

Prüfungsausschuss:

Prof. Dr. Arnold Pfitzner (Vorsitzender)

Prof. Dr. Jörg Heilmann (Erstgutachter)

Prof. Dr. Christian Zidorn (Zweitgutachter)

Prof. Dr. Joachim Wegener (Drittprüfer)

Danksagung

Zuerst möchte ich mich an Herrn Prof. Dr. Jörg Heilmann richten. Lieber Jörg, vielen, lieben Dank für die große Freiheit, die du mir gelassen hast und für das damit verbundene, mir entgegengebrachte Vertrauen! Danke für dein gutes Händchen beim Zusammenstellen des Lehrstuhls, an dem man sich nur wohlfühlen und gute Freunde finden konnte und danke für dein Lenken hin zu spannenden Forschungsthemen. Und vor allem danke dafür, dass du immer mehr Freund warst als Chef.

Frau Dr. Birgit Kraus möchte ich danken für die Unterstützung bei den zellbiologischen Arbeiten, den fachlichen Anregungen und für die gute und freundschaftliche Zusammenarbeit beim Betreuen des Praktikums Pharmazeutische Biologie I. Und natürlich auch, liebe Birgit, für den Trost, wenn die Zellen nicht so wollten, wie man das von ihnen erwartete.

Herrn Dr. Guido Jürgenliemk möchte ich danken für viele fachliche Ratschläge im Bereich der Analytik. Außerdem, lieber Guido, vielen Dank für die vielen humorvollen Mensagänge und Kaffeepausen, Berg- und Bergausrüstungsgespräche und nicht zuletzt für eine rote Mammutjacke.

Danke auch an Frau Ohli, Frau Hirsch, Frau Bauer und Frau Nömeier, die mich erfolgreich durch den universitären Verwaltungsapparat führten.

Besonderer Dank gebührt dem guten Geist im Labor, Gabi Brunner. Liebe Gabi, ohne dich hätte ich nie etwas gefunden! Vielen Dank für die Beantwortung unzähliger Fragen, v.a. wo etwas ist und wie etwas geht und für die Unterstützung bei der Laborarbeit.

Vielen Dank auch an Anne Grashuber für die Hilfe im Praktikum und bei sämtlichen Laborbelangen.

Danke an die Mitarbeiter der zentralen Analytik, v.a. an Herrn Josef Kiermaier und Herrn Wolfgang Söllner für ihre Hilfe bei der Auswertung der Massenspektren.

Vielen Dank an Frau Simone Fuchs vom Lehrstuhl Pharmazeutische Biologie der Goethe-Universität Frankfurt am Main für das Durchführen des Luciferase-Assays.

Herzlichen Dank an Herrn Dr. Fred Eickmeyer, der mich mit seinem unschätzbar Wissen bei der Anzucht von Arnikapflanzen unterstützt hat und freundlicherweise die Aufzucht der Arnikaklone in seinem Gewächshaus übernommen hat.

Danke auch an Frau Dr. Heidi Heuberger, die mich mit vielen Informationen zur Kultivierung von Arnika versorgt hat und mich tatkräftig bei der Veröffentlichung des Beitrags zum Anbau von Arnika in Rumänien unterstützt hat.

Großer Dank gebührt meinen Freunden, den Parkmitarbeitern von Parcul Natural Munții Maramureșului Costel Bucur, Gabriel Covaza, Catalina Bogdan, Anton Brenner, Christina Pop und ihrem Vater Mr. Pop und allen Parkranger. Außerdem danke an Emil Pop für seine Unterstützung bei der Überzeugungsarbeit der Bauern und für seinen Zuspruch.

Vielen Dank auch an Dr. Dieter Gerard von der Firma FLAVEX in Rehlingen, der sich mit großem Pioniergeist, Vertrauen und Großzügigkeit bei der Finanzierung des Projekts zum nachhaltigen Anbau und Schutz von Arnika in Maramureş beteiligt hat.

Vielen Dank auch an Herrn Bert Schumann, der das Projekt zum nachhaltigen Anbau und Schutz von Arnika in Maramureş mit seinem Engagement stark unterstützt hat.

Ganz besonderer Dank gebührt meinen lieben Laborkollegen, die alle zusammen wie die Zutaten in einem guten Eintopf waren...jede anders an Charakter und Geschmack, doch zusammen sehr harmonisch. Es war sehr, sehr lustig mit euch!

Vielen Dank an:

Dr. Daniel Bücherl für die Hilfe im Labor und v.a.: Humor! Ich mag Sie! Eine Liste aller Zitate würde den Rahmen dieser Arbeit sprengen.

Dr. Katharina Zenger. Liebe Kathi, vielen Dank für die gute Zeit vom ersten Tag an. Für Berg und Bouldern, deinen guten Humor, und deine Loyalität.

Dr. Rosmarie Scherübel, für ihr Lachen, das einen jeden befällt und von Trübsinn befreit, v.a. beim Durchführen von Praktika.

Beata Kling, meine liebe Laborkollegin, mit der unzählige running gags geteilt wurden und die mich immer brav zum Bouldern begleitet hat.

Dr. Sebastian Schmidt für seine Unterstützung bei der Laborarbeit und v.a. für seine gute Laune und die vielen gemeinsamen, zumindest für uns guten Witze.

Monika Untergehrer für die wirklich sehr wertvolle Hilfe bei den Zell-Assays, die vielen guten Gespräche und Witze und die Verbindung ins ferne Oberbayern.

Petr Jirásek für seinen trockenen Humor, seine Sprachgewandtheit und seine schiere Körpergröße.

Außerdem möchte ich mich für die kollegiale und schöne Zusammenarbeit bedanken bei, Markus Löhr, Stefan Wiesneth, Eva Lotter, Edna Makule, Tri Hieu Nguyen, Ilya Volkov, Christian Zeh, Katharina Schiller, Sebastian Schwindl, Daniela Pemp, Dr. Sarah Sutor, Dr. Anne Freischmidt und Dr. Magdalena Motyl und Dr. Matej Barbič und bei meinen Praktikanten und Praktikantinnen für die wertvolle Mitarbeit.

Außerdem ganz besonders bei meinen Eltern, die mich immer unterstützt haben und bei Chrisi, Henri, Nico, Alex und Andi dafür, dass ihr immer zu mir gehalten habt und mir meine Freizeit verschönt habt.

Publikationen

Teile dieser Arbeit wurden bereits veröffentlicht:

Flemming, M.; Heilmann, J. (2014): Nachhaltiger Anbau und Schutz von *Arnica montana* L. in Maramures (Rumänien). In: Zeitschrift für Arznei- und Gewürzpflanzen 19(1), S. 52-53.

Poster:

Flemming, M.; Heilmann, J. (2013): Protection and Sustainable Cultivation of *Arnica montana* L. in Maramureş (Romania). In: Planta Medica 79, S. 1256.

61st International Congress and Annual Meeting of the GA, 1st-5st September, Münster, Germany.

Meinen lieben Eltern.



Wer einen Tag lang glücklich sein will
der betrinke sich.
Wer einen Monat lang glücklich sein will
der schlachte ein Schwein.
Wer ein Jahr lang glücklich sein will,
der heirate.
Wer aber ein Leben lang glücklich sein will,
der werde Gärtner.

Chinesisches Sprichwort

Inhalt

A Allgemeine Einleitung	1
B Phytochemische und pharmakologische Untersuchungen von Proazulenen aus Kamille und Schafgarbe.....	9
B.1 Einleitung.....	9
B.1.1 Artbeschreibung der Kamille	9
B.1.1.1 Botanik der Kamille	9
B.1.1.2 Phytochemie der Kamille	11
B.1.2 Artbeschreibung der Schafgarbe.....	15
B.1.2.1 Botanik der Schafgarbe	15
B.1.2.2 Phytochemie der Schafgarbe	18
B.1.3 Einführung zur Pharmakologie von Proazulenen aus Kamille und Schafgarbe .	31
.....	
B.1.4 Kurze Einführung zur Molekularbiologie von Entzündungsprozessen	36
B.1.4.1 Entzündungsprozesse und die Rolle des Adhäsionsmoleküls ICAM-1.....	36
B.1.4.2 Entzündungsprozesse und die Rolle der Translokation von NF-κB.....	39
B.1.4.3 Die Rolle von NO-Radikalen im Enzündungsgeschehen	42
B.1.5 Zielsetzung.....	45
B.2 Material und Methoden.....	46
B.2.1 Präparativ-analytischer Teil.....	46
B.2.1.1 Isolierung und Identifizierung von Matricin aus Kamillenblüten.....	46
B.2.1.1.1 Herstellung eines Kamillenblütenextrakts	46
B.2.1.1.2 Chromatographische Isolierung des Matricins	47
B.2.1.1.3 Identifizierung des Matricins.....	49
B.2.1.1.4 Reinheitsbestimmung des Matricins.....	51
B.2.1.2 Chamazulen	51
B.2.1.3 Aktivitätsgelitete Fraktionierung eines Schafgarbenblütenextrakts	52

B.2.1.3.1	Herstellung eines Schafgarbenblütenextrakts	52
B.2.1.3.2	Fraktionierung des Schafgarbenblütenextrakts.....	52
B.2.1.4	Isolierung von 8-Desacetyl-8-angeloyl-4-epi-matricin.....	53
B.2.1.4.1	Herstellung eines Schafgarbenkrautextrakts	53
B.2.1.4.2	Chromatographische Aufarbeitung des Schafgarbenkrautextrakts	54
B.2.1.4.3	Identifizierung von 8-Desacetyl-8-angeloyl-4-epi-matricin	55
B.2.2	Pharmakologischer Teil	56
B.2.2.1	Degradationskontrolle von Matricin in Zellkulturmedium	56
B.2.2.1.1	Wiederfindung von Matricin in Zellkulturmedium	56
B.2.2.1.2	Degradationskontrolle	57
B.2.2.2	Pharmakologische Tests mit HMEC-1	57
B.2.2.2.1	Allgemeines zu HMEC-1	57
B.2.2.2.2	Allgemeines zur Kultur von HMEC-1	58
B.2.2.2.3	Zellkultur von HMEC-1	58
B.2.2.2.4	ICAM-1-Assay	59
B.2.2.2.5	Zellviabilität (MTT-Assay)	63
B.2.2.2.6	Immunfluoresenzmikroskopische Untersuchung der Translokation von NF-κB	65
B.2.2.2.7	Reportergen-Assay (Luciferase-Assay) für NF-κB.....	68
B.2.2.3	Pharmakologische Tests mit RAW 264.7-Zellen.....	69
B.2.2.3.1	Allgemeines zu RAW 264.7.....	69
B.2.2.3.2	Zellkultur von RAW 264.7.....	69
B.2.2.3.3	Griess-Assay.....	70
B.2.2.3.4	Modifizierter Griess-Assay	72
B.2.2.3.5	Zellzahlbestimmung	72
B.2.2.4	SNP-Assay	74

B.2.2.4.1	Hintergrund	74
B.2.2.4.2	Praktische Durchführung.....	75
B.2.3	Statistik.....	75
B.3	Ergebnisse	76
B.3.1	Präparativ-analytischer Teil.....	76
B.3.1.1	Isolierung von Matricin	76
B.3.1.1.1	Isolierungsschema	76
B.3.1.1.2	Reinheitsbestimmung des isolierten Matricins mittels HPLC.....	78
B.3.1.1.3	Identifizierung des Matricins.....	79
B.3.1.1.4	Problematik der Matricinisolierung	82
B.3.1.2	Isolierung von 8-Desacetyl-8-angeloyl-4- <i>epi</i> -matricin	84
B.3.1.2.1	Chromatographische Isolierung von 8-Desacetyl-8-angeloyl-4- <i>epi</i> -matricin	84
B.3.1.2.2	Identifizierung von Fraktion B-KIV-AII-HPLC als 8-Desacetyl-8-angeloyl-4- <i>epi</i> -matricin	87
B.3.2	Pharmakologischer Teil	91
B.3.2.1	Pharmakologische Untersuchung des Matricins.....	91
B.3.2.1.1	Stabilität von Matricin in ECGM	91
B.3.2.1.2	Einfluss von Matricin auf die Zellviabilität von HMEC-1 (MTT-Assay)	92
B.3.2.1.3	Einfluss von Matricin auf die ICAM-1-Expression bei HMEC-1	94
B.3.2.1.4	Einfluss von Matricin auf die TNF- α induzierte NF- κ B-Translokation bei HMEC-1.....	98
B.3.2.1.5	Einfluss von Matricin auf die NF- κ B-Promotoraktivität (Reportergen-Assay).....	100
B.3.2.1.6	Einfluss von Matricin auf die Zellviabilität von RAW 264.7 Zellen...	
	101

B.3.2.1.7 Einfluss von Matricin auf die NO-Produktion bei RAW 264.7 Zellen (Griess-Assay)	102
B.3.2.2 Pharmakologische Untersuchung des Chamazulens	104
B.3.2.2.1 Einfluss von Chamazulen auf die Zellviabilität von HMEC-1 (MTT-Assay)	104
B.3.2.2.2 Einfluss von Chamazulen auf die ICAM-1-Expression bei HMEC-1..	104
B.3.2.2.3 Einfluss von Chamazulen auf die TNF- α induzierte NF- κ B-Translokation bei HMEC-1.....	105
B.3.2.2.4 Einfluss von Chamazulen auf die Zellviabilität von RAW 264.7 Zellen	106
B.3.2.2.5 Einfluss von Chamazulen auf die NO-Produktion bei RAW 264.7 Zellen	107
B.3.2.3 Direkt vergleichende Untersuchungen von Matricin und Chamazulen.....	109
B.3.2.3.1 Einfluss von Matricin und Chamazulen auf die NO-Konzentration im SNP-Assay	109
B.3.2.3.2 Modifizierter Griess-Assay, Matricin und Chamazulen im Vergleich	110
B.3.2.4 Aktivitätsgeleitete Fraktionierung eines Schafgarbenblütenextrakts	111
B.3.2.4.1 Fraktionierung des Extrakts.....	111
B.3.2.4.2 Einfluss des Extrakts und der Fraktionen auf die Zellviabilität von HMEC-1 (MTT-Assay).....	113
B.3.2.4.3 Einfluss des Extrakts und der Fraktionen auf die TNF- α induzierte ICAM-1-Expression bei HMEC-1	114
B.3.2.4.4 Einfluss des Extrakts und der Fraktionen auf die Zellviabilität von RAW 264.7 Zellen	115
B.3.2.4.5 Einfluss des Extrakts und der Fraktionen auf die NO-Produktion bei RAW 264.7 Zellen (Griess-Assay).....	116

B.4	Diskussion.....	118
B.4.1	Optimierung der Matricinisolierung aus Kamillenblüten	118
B.4.2	Isolierung von 8-Desacetyl-8-angeloyl-4- <i>epi</i> -matricin	118
B.4.3	Pharmakologische Untersuchungen von Matricin und Chamazulen.....	119
B.4.4	Bioaktivitätsgleitete Fraktionierung eines Schafgarbenblütenextrakts....	132
B.4.5	Ausblick	137
C	Chemoökologische Untersuchungen zu <i>Arnica montana</i> L.	139
C.1	Einleitung.....	139
C.1.1	Einführung in die Chemoökologie	139
C.1.2	Artbeschreibung von <i>Arnica montana</i> L.	142
C.1.2.1	Botanik von <i>Arnica montana</i> L.	142
C.1.2.2	Phytochemie von <i>Arnica montana</i> L.	145
C.1.3	Zielsetzung.....	149
C.2	Material und Methoden.....	150
C.2.1	Chemoökologische Untersuchungen von <i>Arnica montana</i> L. in Rumänien 150	
C.2.1.1	Untersuchungsgebiet und Standorte der Probenentnahme	150
C.2.1.2	Ermittlung der Standortfaktoren	153
C.2.1.3	Sammlung der Proben.....	154
C.2.2	Stressexperimente mit Arnika-Klonen	155
C.2.3	Analytik der Helenaline	157
C.2.3.1	Probenaufbereitung	157
C.2.3.2	Extraktions- und Anreicherungsverfahren.....	157
C.2.3.3	Gaschromatographische–Analyse (GC-Analyse).....	158
C.2.3.4	Auswertung	158
C.2.4	Statistik.....	159
C.3	Ergebnisse	160

C.3.1	Untersuchungen zu <i>Arnica montana</i> L. in Rumänien	160
C.3.1.1	Ergebnisse der Vegetationsaufnahmen	160
C.3.1.2	Analytik der Helenalin- und Dihydrohelenalinester.....	162
C.3.1.3	GC-Analyse der rumänischen Proben	164
C.3.1.3.1	Chemotyp und chemische Variation	164
C.3.1.3.2	Regressionsanalysen	167
C.3.1.4	Phänotypische Variation	168
C.3.2	Untersuchung der Arnika-Klone.....	170
C.3.2.1	Ergebnisse der Stressexperimente.....	170
C.3.2.2	Mittelwertvergleiche der SL-Gehalte der Arnika-Klone.....	171
C.4	Diskussion.....	174
C.5	Projekt zum nachhaltigen Anbau und zum Schutz von <i>Arnica montana</i> L. in Maramureş (Rumänien)	180
D	Zusammenfassung	181
D.1	Phytochemische und pharmakologische Untersuchungen von Proazulenen aus Kamille und Schafgarbe.....	181
D.2	Chemoökologische Untersuchungen zu <i>Arnica montana</i> L.	182
E	Summary	183
E.1	Phytochemical and pharmacological investigations of Chamomile and Yarrow	183
E.2	Chemo-ecological investigations of <i>Arnica montana</i> L.	185
F	Anhang	186
F.1	Abkürzungsverzeichnis.....	186
F.2	Geräte und Materialien.....	188
F.3	Chemikalienlisten	190
G	Literaturverzeichnis	193

A Allgemeine Einleitung

Noch im 19. Jahrhundert als „Nebenprodukte des Stoffwechsels“ bezeichnet, sind heute weit mehr als 200.000 sekundäre Pflanzenstoffe mit z.T. hoch interessanten physiologischen Eigenschaften bekannt, Tendenz steigend.¹ Sowohl ihre große Anzahl als auch ihre Variabilität sind eine Konsequenz des evolutionären Drucks, dem die Pflanzenwelt durch ihre meist sessile Lebensweise und ihre Stellung als Primärproduzenten am Anfang nahezu jeder Nahrungskette dieser Erde ausgesetzt ist.² Sekundäre Pflanzenstoffe oder Sekundärmetabolite sind, anders als die im Grundstoffwechsel vorkommenden Primärmetabolite wie Zucker, Lipide oder Aminosäuren, zwar nicht essentiell für das unmittelbare Überleben einer Pflanze nötig, leisten aber verschiedenste ökochemische Aufgaben für die Pflanze bei ihrer Interaktion mit der Umwelt, häufig als Abwehrstoffe gegen Fraßfeinde. Sekundärmetabolite entwickelten sich so in Coevolution mit Herbivoren und Pathogenen.^{3,4,5,6} Schätzungsweise codieren bis zu 25% der 20.000-60.000 Gene einer Pflanze für Enzyme, die am Sekundärstoffwechsel beteiligt sind.⁷ Die sich aus dem Primärstoffwechsel ableitenden Sekundärmetabolite sind aufgrund ihrer Abwehrfunktion häufig physiologisch hoch aktiv und werden, je nach Struktur, verschiedenen Stoffgruppen zugeordnet. Grob lassen sich drei große Gruppen von Sekundärstoffen unterscheiden: Zum einen die Phenylpropanoide und phenolische Verbindungen, deren ursprüngliche Vertreter Abkömmlinge des Shikimatwegs darstellen, wobei aber auch Kombinationen mit anderen Stoffwechselwegen, wie dem Acetat-Malonat-Weg oder dem Terpenoidstoffwechsel vorkommen. Zum anderen die Gruppe der Alkaloide, die sich biogenetisch von Aminosäuren ableitet und einige der physiologisch potentesten sekundären Pflanzenstoffe beinhaltet. Und schließlich die wohl größte Gruppe der Terpenoide, die sich alle von einem einzigen Baustein dem Isopren ableiten lassen und daher auch Isoprenoide genannt werden.^{8,9,10} Viele Vertreter dieser großen Stoffgruppen oder deren Untergruppen kommen nicht ubiquitär im Pflanzenreich vor, sondern lassen sich mit der Zugehörigkeit einer Spezies zu einem Taxon

¹ Hartmann 2007

² Hartmann 2004

³ Frohne und Jensen 1998

⁴ Buchanan et al. 2000

⁵ Wink 2003

⁶ Bresinsky et al. 2008

⁷ Pichersky und Gang 2000

⁸ Buchanan et al. 2000

⁹ Hänsel und Sticher 2007

¹⁰ Bresinsky et al. 2008

korrelieren, was auf die Evolution der Biosynthesewege hinweist. So besitzt jede Spezies ein charakteristisches Inhaltsstoffspektrum an sekundären Pflanzenstoffen, eine Tatsache, die zu chemotaxonomischen Untersuchungen benutzt wird, auch wenn das Inhaltsstoffspektrum als phänotypisches Merkmal, inkonsistent sein kann.¹¹ Im Verlauf der Evolution lassen sich bestimmte Trends im Inhaltsstoffspektrum beobachten. So kann man bei den Angiospermen eine Abnahme der Abkömmlinge des Shikimatwegs von ursprünglichen hin zu abgeleiteten Gruppen erkennen. In den basalen Gruppen der *Magnoliaceae*, *Annonaceae* und *Lauraceae* dominieren kondensierte Gerbstoffe, Lignine (auch als Fraßschutz bedeutend), Lignane und Benzylisochinolinalkaloide, deren Biosynthese auf die Shikimisäure zurückzuführen ist. Bei stärker abgeleiteten, „moderner“ Gruppen tritt der Shikimatweg zunehmend in den Hintergrund und es finden sich vermehrt Sekundärstoffe, die zumindest teilweise aus dem Terpenoidstoffwechsel stammen, wie z.B. Iridoide, Steroidalkaloide und –saponine und schließlich, bei den am höchsten entwickelten Angiospermen, den Apiales und Asterales, die Polypine und die Sesquiterpenlactone (SL).^{12,13}

Die Gruppe der Terpenoide ist mit über 40.000 bekannten Verbindungen die größte der Sekundärmetabolite. Zu ihnen zählen für die Pflanze essentielle Verbindungen wie die u.a. an der Photosynthese beteiligten Carotinoide und das Phytol, die Elektronencarrier Ubiquinon und Plastoquinon oder die Phytohormone Abscisinsäure oder die Gibbereline. Aber auch Lock- und Fraßschutzstoffe, Gifte und antibiotisch wirkende Verbindungen finden sich in dieser Gruppe. Zu den Terpenoiden zählen auch für uns Menschen bedeutsame Verbindungen, wie z.B. der Kautschuk, das gegen Malaria wirksame Artemisinin, die in ätherischen Ölen enthaltene Duftstoffe wie das Menthol oder das Limonen und das in der Krebstherapie eingesetzte Paclitaxel. Nicht nur bezüglich ihrer Anwendung oder physiologischen Wirkung sondern auch physiko-chemisch besitzen die Terpenoide eine große Bandbreite von Eigenschaften. So finden sich cyclische und acyclische, flüchtige und nicht-flüchtige, lipophile und hydrophile, chirale und achirale Vertreter.^{14,15,16}

Der Terpenoidstoffwechsel nimmt seinen Anfang in zwei isomeren C₅-Körpern dem Isopentenylpyrophosphat (IPP) und dem Dimethylallylpyrophosphat (DMAPP) (vgl. Abbildung 1). Beide Moleküle können in der Pflanze in zwei unterschiedlichen

¹¹ Wink 2003

¹² Frohne und Jensen 1998

¹³ Bresinsky et al. 2008

¹⁴ McGarvey und Croteau 1995

¹⁵ Bohlmann und Keeling 2008

¹⁶ Bresinsky et al. 2008

Stoffwechselwegen gebildet werden, zum einen über den cytoplasmatischen Acetat-Mevalonat-Weg (MVA-Weg), zum anderen über den plastidären 1-Desoxy-D-Xylose-Weg (DXP-Weg), auch Methylerythritol-Phosphat-Weg genannt. Beim MVA-Weg werden drei Äquivalente Acetyl-CoA, die aus dem Zuckerpool der Pflanze stammen, durch die 3-Hydroxy-3-methylglutaryl-CoA-Synthase (HMG-CoA-Synthase) zu 3-Hydroxy-3-methylglutaryl-CoA verknüpft, welches mittels NADPH/H⁺ und unter Abspaltung des Coenzms durch das Schlüsselenzym HMG-CoA-Reduktase (HMGR) zur Mevalonsäure reduziert wird. Diese wird durch weitere Enzyme unter ATP-Verbrauch und Decarboxylierung in IPP umgewandelt. IPP kann, katalysiert durch die IPP-DMAPP-Isomerase, zu DMAPP isomerisieren. Im plastidären DXP-Weg werden die beiden, ebenfalls aus dem Zuckerpool stammenden Moleküle Pyruvat und D-3-Phosphoglycerinaldehyd unter Decarboxylierung und Katalyse durch die 1-Desoxy-D-Xylose-5-phosphat-Synthase zum Zwischenprodukt 1-Desoxy-D-xylose-5-phosphat, welches anschließend unter Mitwirkung der 1-Desoxy-D-xylose-5-phosphat-Reduktase zum IPP umgewandelt wird. IPP bzw. DMAPP können nun entweder selbst zu Hemiterpenen (C₅) umgewandelt werden oder mit Hilfe von Prenyltransferasen und Anlagerung weiterer Isopreneinheiten zu Monoterpenen (C₁₀), Sesquiterpenen (C₁₅), Diterpenen (C₂₀), Triterpenen (C₃₀), Tetraterpenen (C₄₀) oder Polyterpenen (C_{n+5}) verknüpft werden. Vorerst bildet sich dabei durch sog. Kopf-an-Schwanz-Kondensation der C₁₀-Körper Geranylpyrophosphat (GPP), das Vorläuermolekül aller Monoterpenen, auf den dann ein IPP übertragen wird, wodurch sich der C₁₅-Körper Farnesylpyrophosphat (FPP) bildet.^{17,18,19,20,21,22} Abbildung 1 zeigt schematisch die Verknüpfung dreier C₅-Bausteine über GPP zu FPP, dem Ausgangsmolekül für die Bildung von Sesquiterpenen und Sesquiterpenlactonen, der Gruppe von Naturstoffen, mit der sich diese Arbeit vorrangig beschäftigt. Die Sesquiterpene wiederum sind eine Stoffgruppe, die sich ebenfalls in zahlreiche Untergruppen einteilen lässt, wovon hier aber nur einige wenige kurz angesprochen werden sollen.²³

¹⁷ Dubey et al. 2003

¹⁸ Cheng et al. 2007

¹⁹ Bresinsky et al. 2008

²⁰ Bohlmann und Keeling 2008

²¹ Kirby und Keasling 2009

²² Dudareva et al. 2013

²³ Fraga 2005

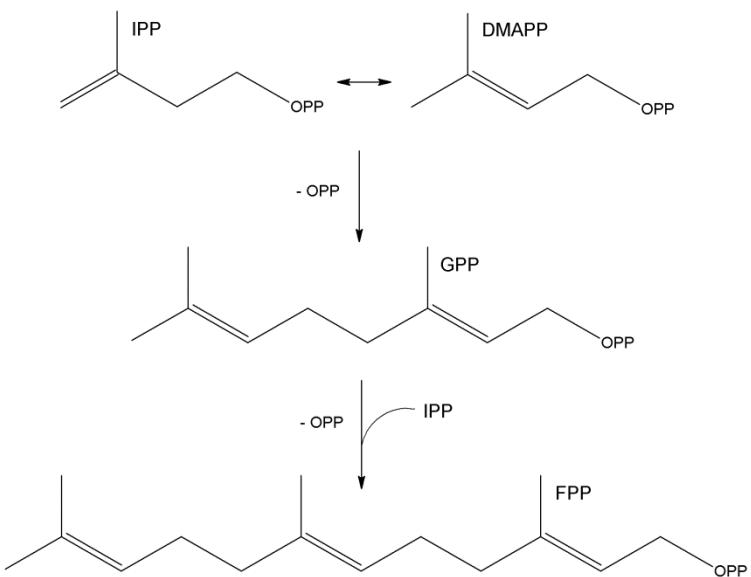


Abbildung 1: Schematische Darstellung der Verknüpfung von 2 C₅-Bausteinen, dem Isopentenylpyrophosphat (IPP) und dem Dimethylallylpyrophosphat (DMAPP) zum C₁₀-Körper Geranylpyrophosphat (GPP) welches unter Anlagerung eines weiteren IPP zum C₁₅-Körper Farnesylpyrophosphat (FPP) reagiert, dem Vorläufermolekül der Sesquiterpene und Sesquiterpenlactone.

Werden zwei FPP verknüpft, bildet sich der C₃₀-Körper Squalen, das Vorläufermolekül der Triterpene. Addiert ein IPP an FPP, bildet sich ein C₂₀-Körper, das Geranylgeranylpyrophosphat (GGPP), woraus die Gruppe der Diterpene gebildet wird. Zwei GGPP bilden schließlich die Tetraterpene mit 40 C-Atomen. Durch die Verknüpfung vieler, z.T. tausender Isopreneinheiten entstehen schließlich Polyterpene, wie Kautschuk oder Guttapercha.^{24,25} Es wird vermutet, dass Tetra-, Di-, Mono- und Hemiterpene eher in Plastiden gebildet werden, also über den DXP-Weg, während Sesquiterpene und Triterpene im Zytosol über den Acetat-Mevalonat-Weg entstehen.^{26,27} Dagegen sprechen allerdings Untersuchungen von Adam & Zapp (1998). Sie zeigten, dass bei der Biosynthese der Sesquiterpene der Kamille das GGP aus dem plastidären DXP-Weg stammt, das IPP, welches an das GGP addiert, aber gemischten Ursprungs ist. Das Sesquiterpen Ricciocarpin A aus *Ricciocarpus natans* hingegen wird ausschließlich via Acetat-Mevalonat-Weg gebildet.^{28,29} Es ist also durchaus möglich, dass jede Pflanzengruppe oder sogar jede Art unterschiedliche Biosynthesewege wählt. Der nächste Schritt in der Biosynthese der Sesquiterpene ist die Zyklisierung des azyklischen FPPs durch Sesquiterpen-Synthasen, welche in verschiedenen

²⁴ Dingermann et al. 2004

²⁵ Bresinsky et al. 2008

²⁶ Bohlmann und Keeling 2008

²⁷ Kirby und Keasling 2009

²⁸ Adam und Zapp 1998

²⁹ Adam et al. 1998

Formen in unterschiedlichen Arten vorkommen. Durch die Vielfalt dieser Terpensynthasen, aber auch durch deren räumliche und zeitliche Regulation in der Pflanze, ist u.a. die enorme Vielfalt der Sesquiterpene und der Terpene allgemein begründet.^{30,31,32} Der erste Schritt ist immer eine Ionisierung des FPPs zum Farnesylkation, einem Carbokation, welches hierauf einen Ringschluss zum Germacren A oder Germacran eingeht.³³ Germacran wiederum ist die Ausgangsstruktur der wichtigsten Klassen der Sesquiterpene, nämlich die vom Germacran-, Eudesman-, Guaian- und Pseudoguaian-Typ. Dabei entsteht durch Zyklisierung zwischen C-5 und C-10 das Eudesman bzw. durch Zyklisierung zwischen C-1 und C-5 das Guaian. Das Pseudoguaian entsteht wiederum aus dem Guaian durch einen Methylshift von C-4 an C-5 (Abbildung 2).^{34,35}

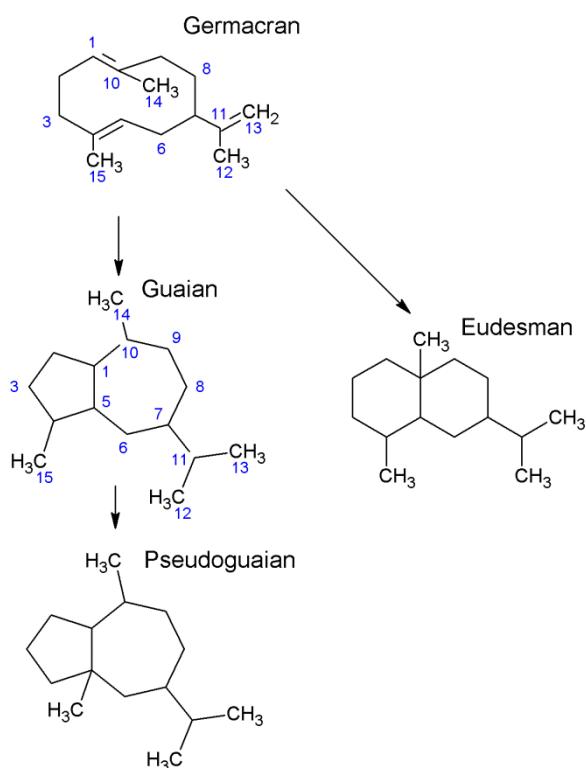


Abbildung 2: Bildung der wichtigsten Sesquiterpene ausgehend vom Germacran. Der Eudesman-Typ entsteht durch Zyklisierung zwischen C-5 und C-10, der Guaian-Typ durch Zyklisierung zwischen C-1 und C-5 und der Pseudoguaian-Typ aus dem Guaian durch Methylshift von C-4 an C-5.

³⁰ McGarvey und Croteau 1995

³¹ Tholl 2006

³² Degenhardt et al. 2009

³³ Degenhardt et al. 2009

³⁴ Dingermann et al. 2004

³⁵ Hänsel und Sticher 2007

Diese Ringschlüsse werden wohl auch auf dem Weg zu den entsprechenden Lactonen vollzogen und führen so zu den wichtigsten Sesquiterpenlactongruppen (Abbildung 3).

Die Bildung dieser Sesquiterpenlactone geht vermutlich vom Germacran aus, welches schrittweise an C-12 über eine Alkohol- und Aldehydvorstufe zur Germacrancarbonsäure oxidiert wird. Dabei ist das NADPH/H⁺-NADP⁺-Redoxsystem und molekularer Sauerstoff nötig und die Reaktionen werden von Cytochrom P450-Enzymen und Dehydrogenasen katalysiert. Die Germacrancarbonsäure wiederum wird von einem NADPH/H⁺- und O₂-abhängigen Cytochrom P450-Enzym, der Costunolidsynthase, an C-6 hydroxyliert (alternativ wäre auch Position 8 denkbar, wodurch die 8-Lactone entstehen). Carboxylgruppe und Hydroxylgruppe bilden dann unter Wasserabspaltung den intramolekularen Ester, den Lactonring zum (+)-Costunolid. Costunolid wird als Ausgangsstoff der Geramcralide, Guaianolide und wohl auch der Eudesmanolide angesehen, welche über Epoxid-Zwischenstufen gebildet werden. Diese Ergebnisse stammen aus der Forschung an *Cichorium intybus* (Asteraceae), jedoch wird davon ausgegangen, dass dieser Biosyntheseweg auch für andere Asteraceen Gültigkeit besitzt. Abbildung 3 zeigt schematisch den angenommenen Verlauf der Biosynthese der Geramcralide, Eudesmanolide, Guaianolide und der Pseudoguaianolide. Letztere bilden sich aus den Guaianoliden. Neben der Lactonbildung über C-6 ist auch jeweils die Ringbildung über C-8 möglich.^{36,37,38,39,40}

³⁶ de Kraker et al. 2002

³⁷ Dingermann et al. 2004

³⁸ Hänsel und Sticher 2007

³⁹ Barquera-Lozada und Cuevas 2008

⁴⁰ Schall und Reiser 2008

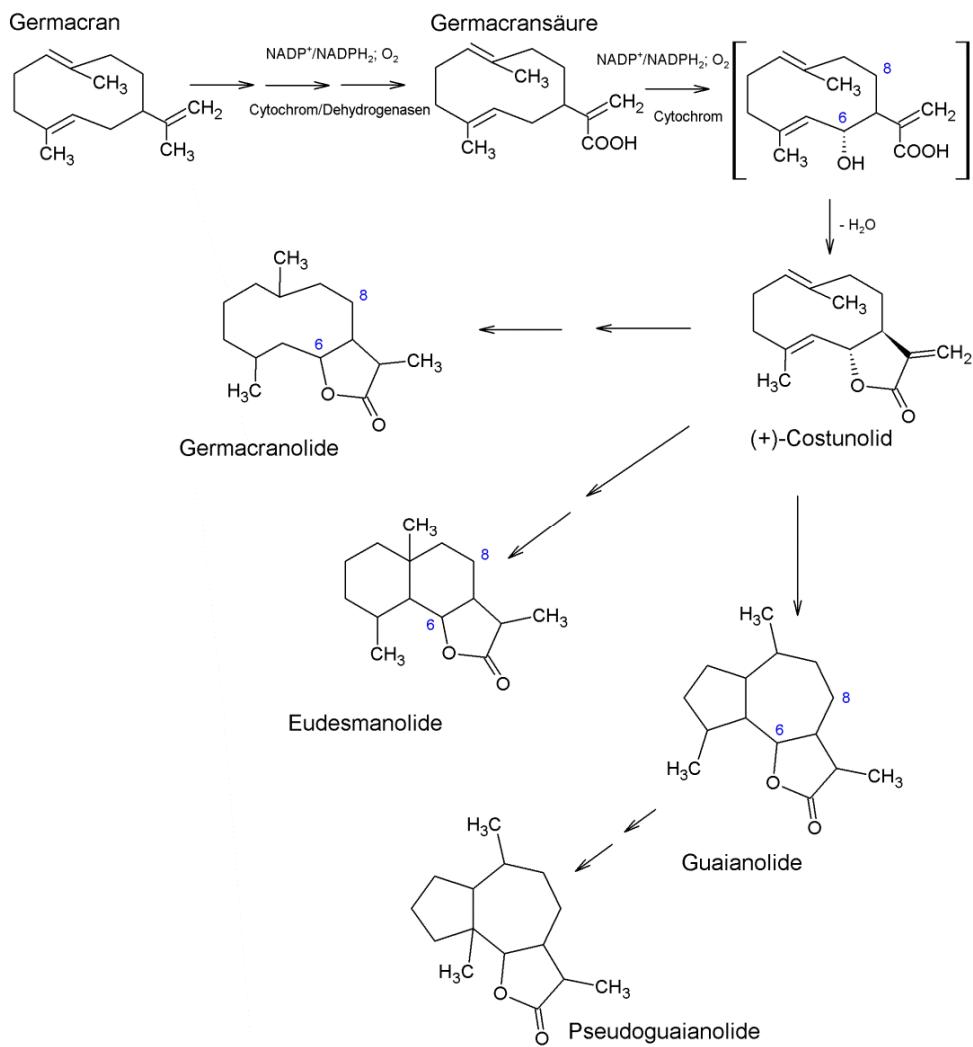


Abbildung 3: Schematische Darstellung des vermutlichen Biosynthesewegs vom Germacran über die Germacransäure zum einfachsten Germacranolid, dem (+)-Costunolid. Alternativ ist neben der Lactonisierung über C-6 auch eine Ringbildung über C-8 möglich. Vom Costunolid ausgehend bilden sich andere wichtige Sesquiterpenlacton-Grundstrukturen, wie Eudesmanolide und Guaianolide. Pseudoguaianolide entstehen vermutlich aus Guaianoliden durch Methylshift.

Sesquiterpenlactone finden sich hauptsächlich bei den *Asteraceae*, in deren Trichomen sich viele der an diesen Reaktionen beteiligten Enzyme befinden.⁴¹ Aber auch in *Apiaceae* sind u.a. Germacranolide, Eudesmanolide und Guaianolide zu finden, allerdings weisen die Strukturen dort eine andere Stereochemie auf, was auf eine unterschiedliche Biosynthese hinweist und zwar vermutlich schon sehr früh, bei der Bildung des Precursors, dem FFP.

⁴¹ Lange und Turner 2013

Die Guaianolide der Apiaceae werden wahrscheinlich auch nicht über eine Germacran-Zwischenstufe gebildet, sondern über das Guaian, das danach oxidiert und lactonisiert wird.^{42,43,44,45,46}

Neben ihrer Bedeutung für die Chemosystematik, sind Sesquiterpenlactone aufgrund unterschiedlichster biologischer Aktivitäten auch von pharmakologischem sowie chemoökologischem Interesse. So besitzen die häufig bitter schmeckenden SL in Pflanzen Funktionen wie z.B. den Schutz gegen Herbivoren, wirken aber auch antimikrobiell oder allelopathisch. Es wurde auch eine Fülle von Effekten im Menschen beschrieben, wie z.B. anti-Krebs und anti-inflammatorische Wirkung oder die Wirkung gegen Parasiten wie den Malaria-Erreger, um nur einige wichtige zu nennen.^{47,48,49,50} Während im Jahre 1986 etwa 2000 Sesquiterpenlactone bekannt waren, sind es heute mehr als 5000.^{51,52} Bedingt durch die große Zahl bekannter Verbindungen und den rasanten Zuwachs neuer Strukturen, hinkt die Datenmenge über deren biologische Funktionen weit hinterher.

Das Ziel der vorliegenden Arbeit war den pharmakologischen und chemoökologischen Wissensstand über Sesquiterpenlactone aus den bekannten Arzneipflanzen Kamille (*Matricaria recutita* L.), Schafgarbe (*Achillea millefolium* L.) und Arnika (*Arnica montana* L.) zu erweitern. Neben der Optimierung ihrer Isolierung wurden anschließend pharmakologische Untersuchungen zur Entzündungshemmung einer Untergruppe der Guaianolide, den Proazulen, durchgeführt, die in Form von Matricin und ähnlicher Verbindungen in Kamille und Schafgarbe vorkommen. Zusätzlich wurde das Chamazulen, ein Abbauprodukt des Matricins, untersucht. Der zweite Teil der Arbeit beschäftigt sich mit dem Einfluss von Umweltfaktoren auf die Zusammensetzung und den Gehalt der qualitätsbestimmenden Helenanolide bei *Arnica montana*. Dazu wurden sowohl Proben aus Populationen in Rumänien analysiert, als auch Stressexperimente an Arnikaklonen durchgeführt.

⁴² Holub und Buděšínský 1986

⁴³ Holub et al. 1987

⁴⁴ Frohne und Jensen 1998

⁴⁵ Drew et al. 2009

⁴⁶ Drew et al. 2012

⁴⁷ Seaman 1982

⁴⁸ Zidorn 2008

⁴⁹ Picman 1986

⁵⁰ Chadwick et al. 2013

⁵¹ Picman 1986

⁵² Chadwick et al. 2013

B Phytochemische und pharmakologische Untersuchungen von Proazulenen aus Kamille und Schafgarbe

B.1 Einleitung

B.1.1 Artbeschreibung der Kamille

B.1.1.1 Botanik der Kamille

Der wissenschaftliche Artnamen der echten Kamille *Matricaria recutita* L. (syn. *Chamomilla recutita* L. (RAUSCHERT), *Matricaria chamomilla* L.) leitet sich von (lat.) „mater“ = „Mutter“ bzw. von (lat.) „matrix“ = „Gebärmutter“ ab und bezieht sich damit auf die ursprüngliche Verwendung der Kamille bei Erkrankungen gebärender Frauen. Der Name „chamomilla“ stammt aus dem Griechischen „chamaimelon“ = „niedrig oder auf dem Boden wachsender Apfel“, zusammengesetzt aus „chamai“ = „niedrig, am Boden“ und „mélon“ = „Apfel“. Dies ist mit dem apfelartigen Geruch der Kamille zu erklären.⁵³ Systematisch wird die Kamille innerhalb der Familie der Asteraceae in die Unterfamilie der Asteroideae eingeordnet, die sich u.a. durch den Besitz von Röhrenblüten im Zentrum des Köpfchens und das Fehlen von Milchsaft von der Unterfamilie der Lactucoideae (Cichorioideae) unterscheidet. Innerhalb der Unterfamilie wird die Kamille zusammen mit der Schafgarbe (*Achillea* sp.) und auch dem Beifuß (*Artemisia* sp.) in den Tribus Anthemideae (111 Gattungen, ca. 1800 Arten) gestellt. Die Arten des Tribus zeichnen sich meist durch den Besitz randständiger Zungenblüten, einen trockenhäutigen Rand der Hüllblätter, das Fehlen eines Pappus und einen aromatischen Geruch aus. Außerdem ist für die Anthemideae der Besitz von Acetylenen, Sesquiterpenlactonen und Flavonoiden von taxonomischer Relevanz. Die Gattung *Matricaria* L. umfasst insgesamt 6 nordhemisphärisch verbreitete Arten.^{54,55}

Die Kamille ist ein annuelles, 10-55 cm (bis 80 cm) hohes, aufrecht stehendes Kraut mit 2-3 fach gefiederten Blättern. Die zahlreichen Köpfchen sitzen einzeln, besitzen einen Durchmesser von 15-25 mm und bestehen aus 5-zähnigen, goldgelben Röhrenblüten im Zentrum und weißen, später zurückgeschlagenen, randständigen Zungenblüten. Der anfangs flache Köpfchenboden wölbt sich später kegelförmig auf und wird hohl. Das Involucrum besteht aus fast einreihig stehenden, grünen Hüllblättern mit braunem Hautrand.

⁵³ Hegi 1954

⁵⁴ Danert und Fukarek 1994

⁵⁵ Kadereit und Jeffrey 2007

Die Achänen (0,8-2,0 mm lang) besitzen keinen Pappus. Abbildung 4 zeigt den Habitus der Kamille.



Abbildung 4: Habitus der Kamille (*Matricaria recutita* L.).^{56,57}

Die Blütezeit reicht von Mai bis September. Als Hauptbestäuber werden Dipteren-Arten angesehen.^{58,59} Außerdem gilt die Kamille als Akkumulatorpflanze für Cadmium und Nickel.⁶⁰ Ihre bevorzugten Standorte sind Äcker, Brachen und Wegränder, also eher ruderaler Standorte. Sie bevorzugt stickstoffsalzreiche, lehmige und kalkarme Böden. Dabei steigt sie bis etwa 1500 Höhenmeter. Das Verbreitungsgebiet erstreckt sich über ganz Europa mit Grönland, Sibirien und Nordafrika über Vorderasien bis in die obere Gangesebene in Indien. In Nord- und Südamerika, Australien und Neuseeland wurde sie eingeschleppt. Die Heimat der Kamille ist in Südosteuropa und Vorderasien zu finden, sie gilt aber in Mitteleuropa wegen der Jahrhunderte zurückliegenden Einbürgerung als Archäophyt.^{61,62,63} Heute wird die Kamille weltweit angebaut. Hauptanbauländer sind Frankreich, Belgien, England, Weißrussland, Ukraine, Tschechien, Polen, Ungarn, Ägypten aber auch Argentinien, Chile, Deutschland (Thüringen) und Österreich.^{64,65,66}

⁵⁶ www.floraweb.de 2013

⁵⁷ Wurzer 1994

⁵⁸ Hegi 1954

⁵⁹ Carle 2007

⁶⁰ Kováčik et al. 2009

⁶¹ Hegi 1954

⁶² Aichele und Schwegler 2000

⁶³ Sebald et al. 1996

⁶⁴ Dingermann et al. 2004

⁶⁵ Hoppe 2012

⁶⁶ Carle 2007

B.1.1.2 Phytochemie der Kamille

Wie in den meisten Pflanzen finden sich auch in der Kamille ubiquitär vorkommende Inhaltsstoffe wie Lipide, Phytosterole, Cholin, Aminosäuren, mineralische Bestandteile und Polysaccharide (u.a. Fructan vom Inulintyp, wobei Inulin typisch für *Asteraceae* ist). Die Schleimstoffe der Kamille sind v.a. zusammengesetzt aus D-Galacturonsäure, Xylose, Arabinose, Galactose, Glucose und Rhamnose.⁶⁷ Außerdem finden sich Phenolcarbonsäuren wie Kaffeesäure, Vanillinsäure, Syringasäure und Anissäure (Abbildung 5).⁶⁸

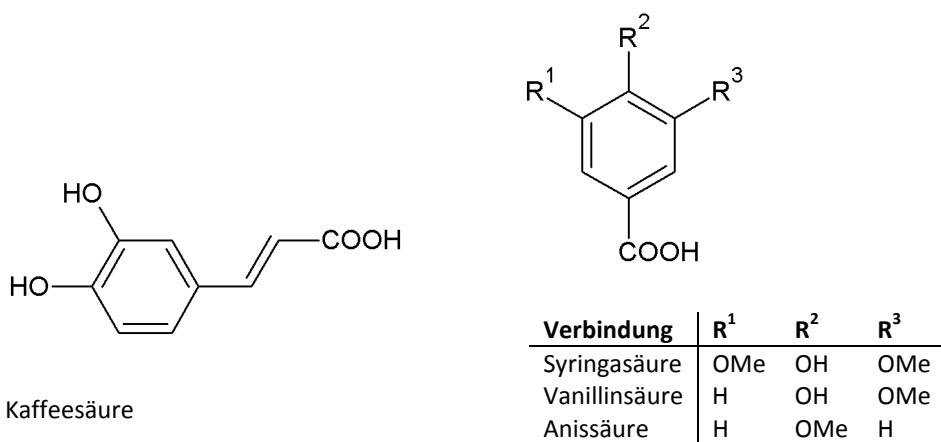


Abbildung 5: In Kamillenblüten vorkommende Phenolcarbonsäuren nach Luppold (1984).

Auch ließen sich die Cumarene Umbelliferon und Herniarin aus der Kamille isolieren (Abbildung 6).

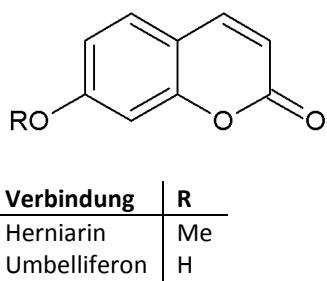


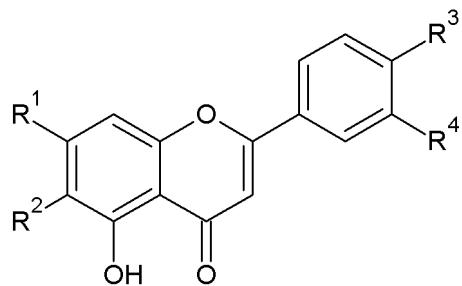
Abbildung 6: Cumarene aus Kamillenblüten.

Des Weiteren wurden in der Kamille über 20 Flavonoide nachgewiesen. Hauptflavonoide sind das Apigenin und das Apigenin-7-O-β-glucosid. Daneben finden sich instabile Acylderivate

⁶⁷ Janecke und Weisser 1964

⁶⁸ Luppold 1984

wie z.B. das Apigenin-7-O- β -D (6‘‘-O-acetyl)-glucosid, Quercetin- und Luteolin-glykoside und methoxylierte, lipophile Flavonoide. Abbildung 7 und Abbildung 8 zeigen die Flavonoide der Kamille.^{69,70}

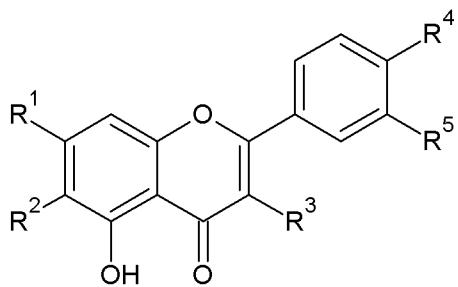


Verbindung	R ¹	R ²	R ³	R ⁴
Luteolin	H	H	OH	OH
Luteolin-7-O-glucosid	OGlu	H	OH	OH
Luteolin 4‘-O-glucosid	H	H	OGlu	OH
Luteolin-7-O-rutinosid	OGlu-Rham	H	OH	OH
6-Hydroxy-luteolin-7-O-glucosid	OGlu	OH	OH	OH
Chrysoeriol	OH	H	OH	OMe
Chrysoeriol-7-O-glucosid	OGlu	H	OH	OMe
Apigenin	OH	H	OH	H
Apigenin-7-O-glucosid	OGlu	H	OH	H
Apigenin-7-O-(6‘‘-O-acetyl)-glucosid	OGlu-ac	H	OH	H
Apigenin-7-O-(6‘‘-O-apiosyl)-glucosid	OGlu-Apio	H	OH	H
Apigenin-7-O-rutinosid	OGlu-Rham	H	OH	H

Abbildung 7: Die in Kamillenblüten vorkommenden Flavonoidglykoside (alle β -glykosidisch verknüpft) und deren Aglyka nach Luppold (1984).

⁶⁹ Luppold 1984

⁷⁰ Schilcher 1987



Verbindung	R ¹	R ²	R ³	R ⁴	R ⁵
Quercetin	OH	H	OH	OH	OH
Iisorhamnetin	OH	H	OH	OH	OMe
Quercetin-7-O-glucosid	OGlu	H	OH	OH	OH
Quercetin-3-O-rutinosid (Rutin)	OH	H	OGlu-Rham	OH	OH
Quercetin-3-O-galactosid (Hyperosid)	OH	H	OGal	OH	OH
Iisorhamnetin-7-O-glucosid	OGlu	H	OH	OH	OMe
6-Methoxy-kämpferol	OH	OMe	OH	OH	H
Eupaletin	OMe	OMe	OH	OH	H
Patuletin	OH	OMe	OH	OH	OH
Patuletin-7-O-glucosid	OGlu	OMe	OH	OH	OH
Axillarin	OH	OMe	OMe	OH	OH
Spinacetin	OH	OMe	OH	OH	OMe
Eupatoletin	OMe	OMe	OH	OH	OH
Chrysolenol	OMe	OMe	OMe	OH	OH
Chrysoplenetin	OMe	OMe	OMe	OH	OMe
Jaceidin	OH	OMe	OMe	OH	OMe

Abbildung 8: In Kamillenblüten vorkommende Flavonolglykoside (alle β -glykosidisch verknüpft) und deren Aglyka nach Luppold (1984).

Im ätherischen Öl der Kamille finden sich die Polyne Z- und E-Spiroether (Abbildung 9), die Terpene Farnesen, Myrcen, Cadinen und Geraniol, der Sesquiterpenalkohol (-)- α -Bisabolol und dessen Oxidationsprodukte (-)- α -Bisabololoxid A, B und C und das (-)- α -Bisabolonoxid A (Abbildung 10).

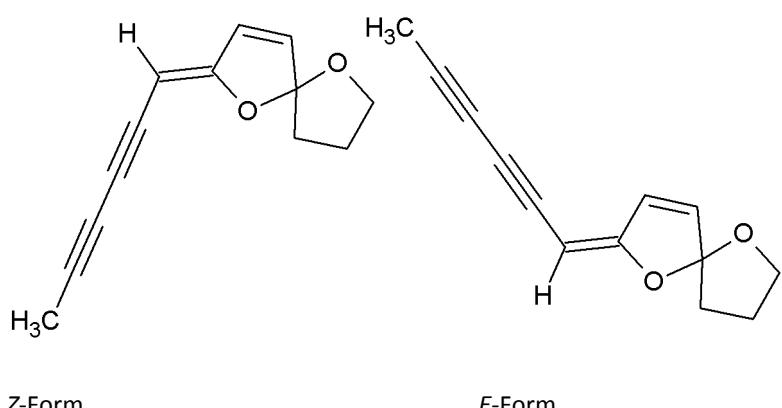


Abbildung 9: Z- und E-Spiroether (En-In-Dicloether) aus der Kamille.

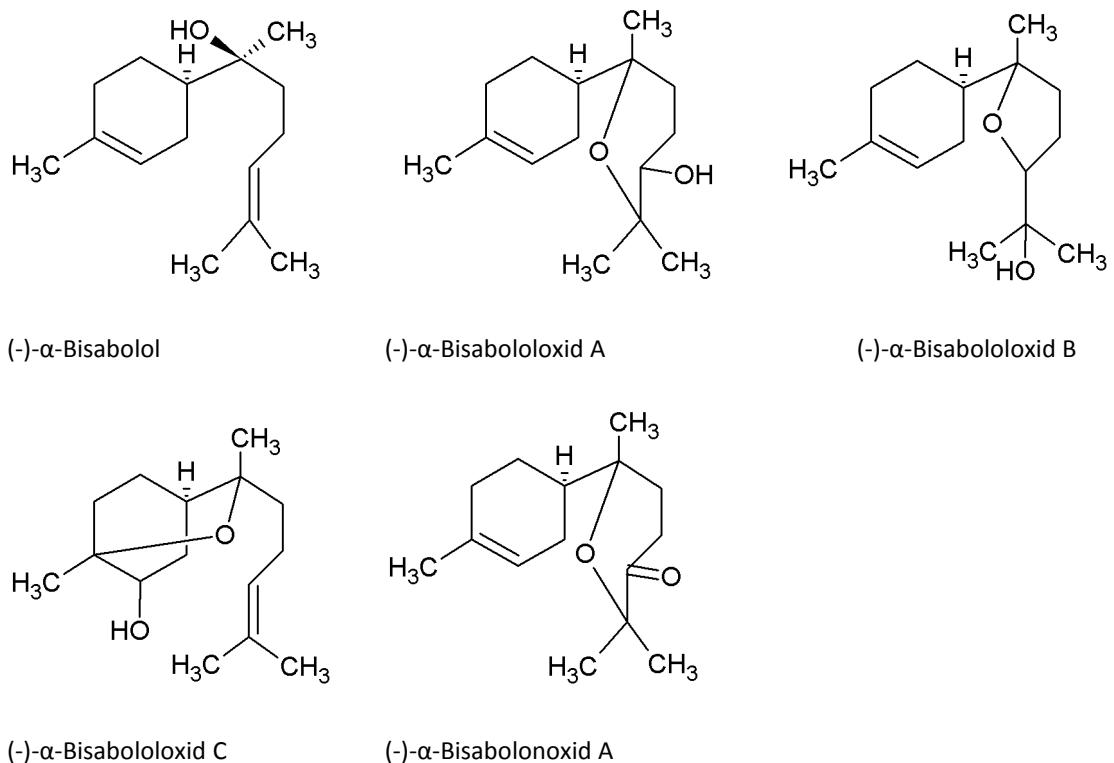


Abbildung 10: Im Kamillenöl enthaltene Bisaboloide.

Ebenfalls im ätherischen Öl enthalten sind Spathulenol, das rote Chamaviolin und die aus dem Proazulen Matricin durch Wasserdampfdestillation entstehenden Verbindungen Chamazulencarbonsäure und Chamazulen (Abbildung 11).

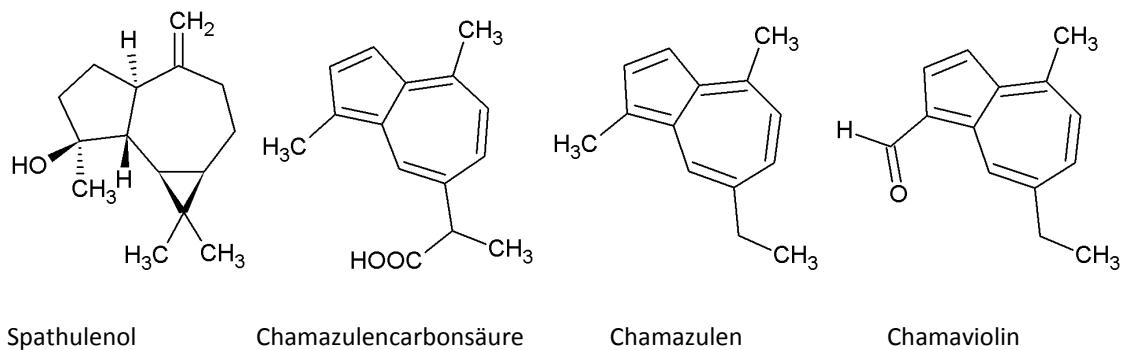


Abbildung 11: Weitere Terpenoide im ätherischen Öl der Kamille.

Zu den nicht-flüchtigen terpenoiden Inhaltsstoffen zählen die beiden Sesquiterpenlactone Matricarin und Matricin. Die Bestandteile des ätherischen Öls und Matricin werden in den Drüsenschuppen der Köpfchen angereichert (Abbildung 12).^{71,72,73,74}

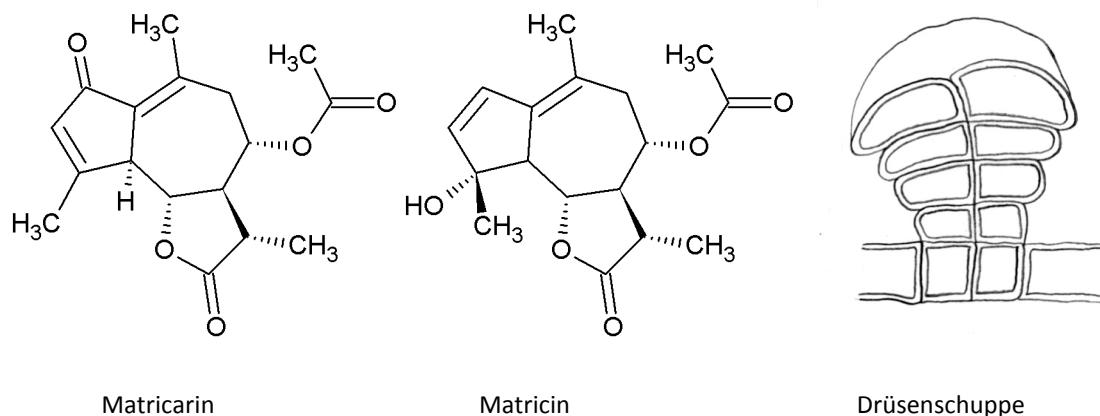


Abbildung 12: Die beiden in Kamillenblüten enthaltenen Guaianolide Matricarin (links) und Matricin (Mitte) und eine Asteraceen-Drüsenschuppe (rechts), unter deren Cuticula das ätherische Öl sezerniert wird.

B.1.2 Artbeschreibung der Schafgarbe

B.1.2.1 Botanik der Schafgarbe

Der wissenschaftliche Artnname der Gewöhnlichen oder Wiesen-Schafgarbe *Achillea millefolium* subsp. *millefolium* L. leitet sich vom Helden des trojanischen Krieges „Achilles“ ab und wurde schon von Hippokrates für diese Pflanze benutzt. Der Beiname „millefolium“ setzt sich zusammen aus (lat.) „mille“ = „tausend“ und (lat.) „folium“ = „Blatt“ und bezieht sich auf die sehr feine Fiederung der Laubblätter.⁷⁵ Abbildung 13 zeigt den Habitus der Schafgarbe.

⁷¹ Schilcher 1987

⁷² Frohne und Jensen 1998

⁷³ Hänsel und Sticher 2007

⁷⁴ Dingermann et al. 2004

⁷⁵ Hegi 1954

Schafgarbe — *Achillea millefolium*

Abbildung 13: Habitus von *Achillea millefolium*, der Gewöhnlichen Schafgarbe.^{76,77}

Wie die Kamille wird auch die Gattung *Achillea* innerhalb der Familie der Asteraceae in die Unterfamilie der *Astroideae* und in den Tribus *Anthemideae* eingeordnet.^{78,79} Die taxonomische Abgrenzung der verschiedenen Spezies der Gattung *Achillea* erweist sich jedoch als sehr schwierig. Hegi (1954) sieht auch *A. asplenifolia*, *A. setacea*, *A. tanacetifolia* als Unterarten von *A. millefolium* bzw. als Übergänge zu *A. millefolium* an, behält sie jedoch als eigenständige Arten bei. Als Subspezies von *A. millefolium* sieht er folgende an: subsp. *millefolium* (L.) HAYEK, subsp. *sudetica* OPIZ, subsp. *collina* BECKER (leitet zu *A. setacea* über) und subsp. *pannonica* (SCHEELE) HAYEK.⁸⁰ Man spricht daher auch vom *Achillea millefolium* agg. (Aggregat). Das *A. millefolium*-Aggregat ist durch Polyploidisierungen und Hybridisierungen hoch polymorph, ökologisch divers und nach wie vor in Radiation begriffen. Beschränkt man sich auf die diploiden (2x) Vertreter der Gruppe, beläuft sich deren Zahl auf etwa 7, berücksichtigt man auch, tetra-, hexa-, und octoploide (4x, 6x, 8x) Arten, erhöht sich diese Zahl auf etwa 20-40 (Klein)arten. Andere Autoren fassen alle Kleinarten in einer riesigen Sammelart *A. millefolium* (sensu latissimo) zusammen.⁸¹ Auf jeden Fall wird *A. millefolium* agg. als monophyletische Gruppe und als „crown group“ der Gattung *Achillea*

⁷⁶ www.ramusverlag.com 2013

⁷⁷ www.gardencoachpictures.files.wordpress.com 2011

⁷⁸ Danert und Fukarek 1994

⁷⁹ Kadereit und Jeffrey 2007

⁸⁰ Hegi 1954

⁸¹ Jurenitsch 2007

angesehen.⁸² Als basal gelten die diploiden (2x) Vertreter *A. setacea* WALDST. & KIT. (pontisches Gebirge, Anatolien, Zentralalpen), *A. asplenifolia* VENT. (pannonische Ebene), *A. roseo-alba* EHREND. (Norditalien), *A. ceretanica* SENNEN (Pyrenäen), *A. asiatica* SERG. (Altai, Mongolei, Nordost-China) und *A. cuspidata* WALL.. Eine noch größere Variabilität eröffnet sich beim Betrachten der tetraploiden (4x) eurasischen Mitglieder des *A. millefolium*-Aggregats. Hierzu zählen *A. ceretanica* (4x) (Zentralfrankreich), *A. pratensis* SAUKEL & LÄNGER (Mitteleuropa), *A. styriaca* SAUKEL & DANIHELKA INED. (Steiermark bis Tschechien), *A. collina* BECKER EX HEIMERL (Zentral und Südosteuropa), *A. euxina* KLOK. und *A. inundata* KONDR. (Ukraine), *A. stepposa* KLOK. & KRYTZKA (östlich des Dnjepr), *A. submillefolium* KLOK. & KRYTZKA (Osteuropa bis Sibirien) und *A. asiatica* (4x) (Zentral- bis Ostsibirien). Zu den hexaploiden Arten zählt *Achillea millefolium* s.s (sensu stricto), welche die größten Gemeinsamkeiten mit *A. submillefolium* (4x) und *A. asiatica* (4x) aufweist. Das natürliche Verbreitungsgebiet von *A. millefolium* s.s erstreckt sich durch Nord-Eurasien von Island bis zur Kamtschatkahalbinsel und mittlerweile weltweit als Kulturfolger. Weitere hexaploide Vertreter sind *A. distans* WALDST. EX KIT. EX WILD. (Alpen, Karpaten, Balkan und Apennin), *A. stricta* SCHLEICHER EX GREMLI. (Hybrid aus *A. millefolium* und *A. distans*) und *A. schmakovii* KUPR. (Altai). Zu den octoploiden (8x) Mitgliedern zählen u.a. *A. monticola* MARTRIN-DONOS (Iberische Halbinsel) und *A. pannonica* SCHEELE. Auch in Nordamerika befindet sich das *A. millefolium*-Aggregat in einem starken Radiationsprozess, ausgehend von einem *A. asiatica* (4x) ähnlichen Vorfahren. Horizontale Hybridisierungen (zwischen Arten gleicher Ploidiestufe) und vertikale Hybridisierungen (zwischen Arten unterschiedlicher Ploidiestufe) sind häufig und tragen zur Variabilität des Aggregats bei. All diese Erkenntnisse stützen sich auf DNA-Sequenzierungen und AFLP-Analysen (amplified fragment-length polymorphism).^{83,84} Etwas übersichtlicher und daher für diese Arbeit relevanter gliederten Saukel & Länger (1992) folgende Kleinarten in das *A. millefolium*-Aggregat ein: *A. setacea*, *A. roseo-alba*, *A. asplenifolia*, *A. collina*, *A. pannonica*, *A. distans*, *A. stricta*, *A. millefolium*, *A. millefolium* subsp. *sudetica* und *A. ceretanica*.⁸⁵

Im Folgenden wird wegen der Schwierigkeit der taxonomischen Abgrenzung der Kleinarten, auch in der arzneilichen Verwendung, nur das *Achillea millefolium*-Aggregat behandelt, ohne auf die inhaltstofflichen Besonderheiten der einzelnen Subspezies näher einzugehen. Dies ist

⁸² Ehrendorfer und Guo 2006

⁸³ Guo et al. 2008

⁸⁴ Ehrendorfer und Guo 2006

⁸⁵ Saukel und Länger 1992

auch dadurch gerechtfertigt, als dass das Arzneibuch die als Droge verwendete Art nicht näher differenziert. Es wird lediglich indirekt über die Blaufärbung des ätherischen Öls ein Mindestgehalt an Proazulen in der Blüten- als auch der Krautdroge gefordert, wodurch die alleinige Verwendung der nahezu proazulenfreien, hexaploiden *A. millefolium* s.s praktisch ausgeschlossen wird und proazulenhaltige Unterarten wie *A. asplenifolia*, *A. roseo-alba*, *A. pannonica*, *A. collina* und *A. setacea* zumindest beigemischt sein müssen.^{86,87,88}

Die Schafgarbe ist eine 8-80 cm (bis 100 cm) hohe, aromatisch duftende, ausdauernde Pflanze mit 2-3 fach gefiederten Blättern. Der Durchmesser der Köpfchen liegt zwischen 0,4-1,0 cm. Sie stehen zu mehreren endständig verzweigt in einer Ebene (doldenartige Rispe). Zumindest der obere Teil der verzweigten Stengel ist wollig behaart. Die Köpfchen bestehen aus meistens 5 weiblichen, randständigen, weißen, seltener rosa oder rötlichen Zungenblüten und zwischen 2-9 zwittrigen, weißen Röhrenblüten. Das Involucrum ist mehrreihig, bestehend aus gelbgrünen, hellbraunen bis schwarzen, meist häutig berandeten Hüllblättern. Die etwa 2 mm langen, silbergrauen Achänen tragen keinen Pappus. Die Blütezeit von *A. millefolium* erstreckt sich etwa von Juni bis November. Als Hauptbestäuber gelten Dipteren. *A. millefolium* benötigt stickstoffsalzhaltige, nicht zu feuchte Lehmböden. Man findet sie auf Fettwiesen, Trocken- und Halbtrockenrasen, an Wegrändern, auf Weiden und ruderalen Standorten. Bei Einbeziehung aller Kleinarten (also *A. millefolium* agg.) kann man von globaler Verbreitung sprechen. Der Schwerpunkt liegt jedoch in Eurasien.^{89,90,91} Die Droge stammt aus Kultur und Wildbeständen v.a. aus Ländern Süd- und Südosteuropas, aber auch aus Osteuropa und Deutschland.⁹²

B.1.2.2 Phytochemie der Schafgarbe

Wegen der äußerst schwierigen taxonomischen Einordnung der Schafgarbe und aufgrund der nur teilweise klaren Artbeschreibung in der Literatur zur Phytochemie, fällt es sehr schwer hier eine eindeutige Auflistung der Inhaltstoffe zu liefern. Grundsätzlich kann man das Aggregat aber in proazulenhaltige und -freie Sippen einteilen, wobei ein Zusammenhang

⁸⁶ Jurenitsch 2007

⁸⁷ Europäisches Arzneibuch 2011

⁸⁸ Stahl-Biskup 2011

⁸⁹ Hegi 1954

⁹⁰ Aichele und Schwegler 2000

⁹¹ Sebald et al. 1996

⁹² Jurenitsch 2007

zur Ploidiestufe besteht. So gelten tetraploide und einige diploide Vertreter als proazulenhaltig, nicht jedoch hexa- und octaploide (Tabelle 1).⁹³

Tabelle 1: Einordnung der Kleinarten des *A. millefolium*-Komplexes aufgrund ihres Ploidiegrades und der Proazulenführung nach Orth et al. (1994).⁹⁴

Ploidiestufe	proazulenfrei	proazulenhaltig
diploid	<i>A. setacea</i>	<i>A. asplenifolia</i> <i>A. roseo-alba</i>
tetraploid	<i>A. pratensis</i> <i>A. roseo-alba*</i> <i>A. collina*</i>	<i>A. collina</i>
hexaploid	<i>A. millefolium</i> s. s.	<i>A. millefolium</i> s.s. ^{**}
octaploid	<i>A. pannonica</i>	

* Möglicherweise handelt es sich hierbei um *A. pratensis*

** Ausnahmefall beschrieben bei Michler et al. (1992)⁹⁵

Die hexaploide *Achillea millefolium* s.s. ist eigentlich proazulenfrei.⁹⁶ Da sich das Europäische Arzneibuch bezüglich der genauen taxonomischen Einordnung der Stammpflanze für Millefolii herba bedeckt hält, es aber einen Mindestgehalt von Proazulen von 0,02% (berechnet als Chamazulen) fordert, kann man davon ausgehen, dass das als Droge verwendete Pflanzenmaterial zumindest Beimischungen proazulenführender Kleinarten enthält.⁹⁷ Im Folgenden wird daher eine kurze Übersicht zur Phytochemie der Sammelart *A. millefolium* agg. gegeben.

Es wird das Vorkommen von Gerbstoffen, Cumarinen, Sterolen wie β -Sitosterol und Triterpenen und cyanogenen Glycosiden wie dem D-Prunasin beschrieben. Weiterhin finden sich Phenylcarbonsäuren wie Kaffeesäure, Chlorogensäure, Ferulasäure, Mandelsäure und Salicylsäure (Abbildung 14).

⁹³ Kastner et al. 1992c

⁹⁴ Orth et al. 1994

⁹⁵ Michler et al. 1992

⁹⁶ Bracher et al. 2004

⁹⁷ Europäisches Arzneibuch 2011

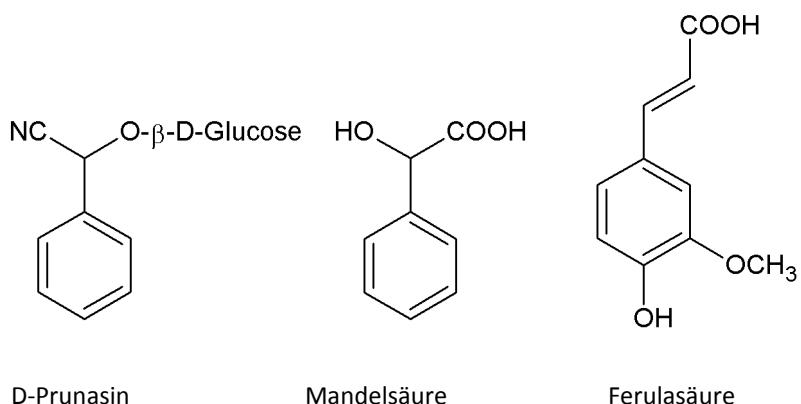


Abbildung 14: Das in Schafgarbe vorkommende cyanogene Glycosid D-Prunasin und die u.a. in Schafgarbe vorkommenden Phenolcarbonsäuren Mandel- und Ferulasäure.^{98,99,100,101,102,103}

Außerdem finden sich die Methylester der Capryl-, Linolen und Undecylensäure, das Phenol Catechol und von Aminosäuren abgeleitete, stickstoffhaltige Verbindungen wie Cholin, Betain, Stachydrin, Betonicin (Achillein) in der Schafgarbe (Abbildung 15).^{98,99,100,101,102,103}

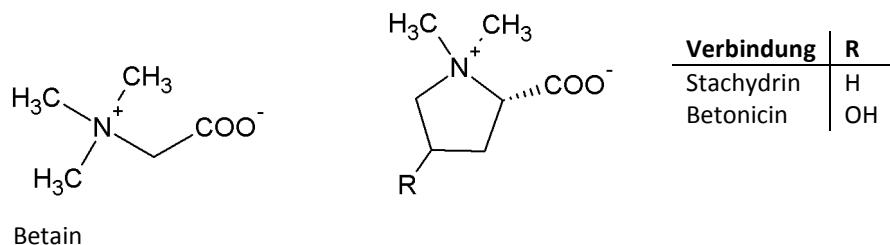


Abbildung 15: Von Aminosäuren abgeleitete, stickstoffhaltige Verbindungen aus *Achillea millefolium*.

Die Amide sind v.a. in der Wurzel enthalten.¹⁰⁴ Einige Flavonoide und deren Glycoside wurden für das *A. millefolium*-Aggregat beschrieben u.a. Apigenin, Luteolin und deren 7-O-Glucoside, Vitexin, Isovitexin, Orientin, Rutin, Artemetin, Casticin, Chrysoeriol, Jeceidin, Centaureidin und Quercetagetin-3,3'-dimethylether (Abbildung 16).^{105,106,107,108,109,110,111}

⁹⁸ Orth et al. 1994

⁹⁹ Tunón et al. 1994

¹⁰⁰ Bracher et al. 2004

¹⁰¹ Glasl et al. 2002

¹⁰² Hänsel und Sticher 2007

¹⁰³ Si et al. 2006

¹⁰⁴ Jurenitsch 2007

¹⁰⁵ Orth et al. 1994

¹⁰⁶ Bracher et al. 2004

¹⁰⁷ Pires et al. 2009

¹⁰⁸ Huo et al. 2013

¹⁰⁹ Csupor-Löffler et al. 2009

¹¹⁰ Glasl et al. 2002

¹¹¹ Benedek et al. 2007a

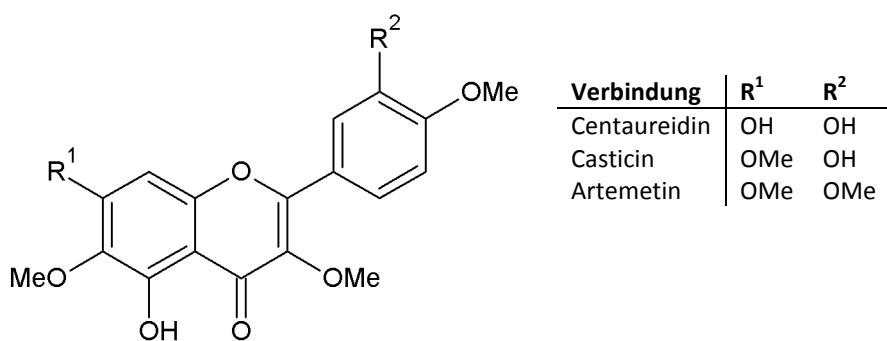


Abbildung 16: In Schafgarbe vorkommende, mehrfach methoxylierte Flavonoide.

Ferner enthalten sind Cynarosid, Luteolin-7-O- β -malonyl-glucosid, Cosmosin, Apigenin-7-O- β -malonyl-glucosid, 5-Hydroxy-3,6,7,4'-tetramethoxyflavon, Schaftosid, Isoschaftosid, Vicenin-2, Isoorientin-7-methlyether und Luteolin-4'-O-glucosid.¹¹²

Zu den Polyinen zählen Ponticaepoxid und cis-trans-Matricariaester (Abbildung 17)¹¹³, welche in der Wurzel zu finden sind.¹¹⁴

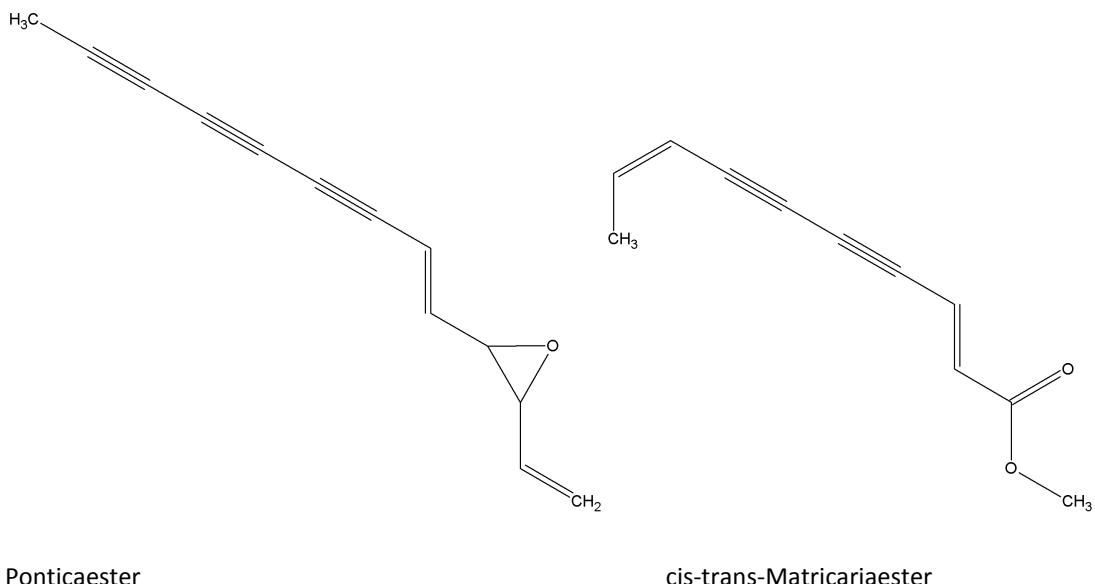


Abbildung 17: In Schafgarbe vorkommende Polyine.

Auch die Zusammensetzung des ätherischen Öls der Schafgarbe ist äußerst komplex. Eine gute Übersicht findet sich bei Hofmann et al. (1992), die in tetra-, hexa-, und octoploidien

¹¹² Si et al. 2006

¹¹³ Orth et al. 1994

¹¹⁴ Jurenitsch 2007

Individuen insgesamt 149 Verbindungen nachweisen konnten.¹¹⁵ Hier seien nur einige der Verbindungen exemplarisch erwähnt. Beschrieben sind u.a. die Monoterpenen α -und β -Pinen, Sabinen, 1,8-Cineol, γ -Terpinen, Linalool, α -Thujon, Campher, Borneol, 4-Terpineol, α -Terpineol, Bornylacetat, die Sesquiterpene α - und β -Caryophyllen, α -Farnesen, cis- und trans-Nerolidol, Caryophyllenoxid, Bisaboloide und Germacren D, Longipinenon und Hydroxylongipinenon.^{116,117,118,119} In proazulenführenden Sippen finden sich außerdem Chamazulen und Guajazulen, welche beide bei der Wasserdampfdestillation aus Proazulenen entstehen.^{120,121} Der Proazulengehalt kann dabei erheblich schwanken. So steigt er während der Entwicklung der Pflanze stark an, erreicht sein Maximum kurz vor der Blüte und sinkt danach wieder ab. Außerdem finden sich Proazulene nur in den Drüsenhaaren und nicht in Exkretgängen.¹²² In einigen Sippen kommt außerdem das irregulär gebaute Artemisiaketon vor (Abbildung 18).¹²³

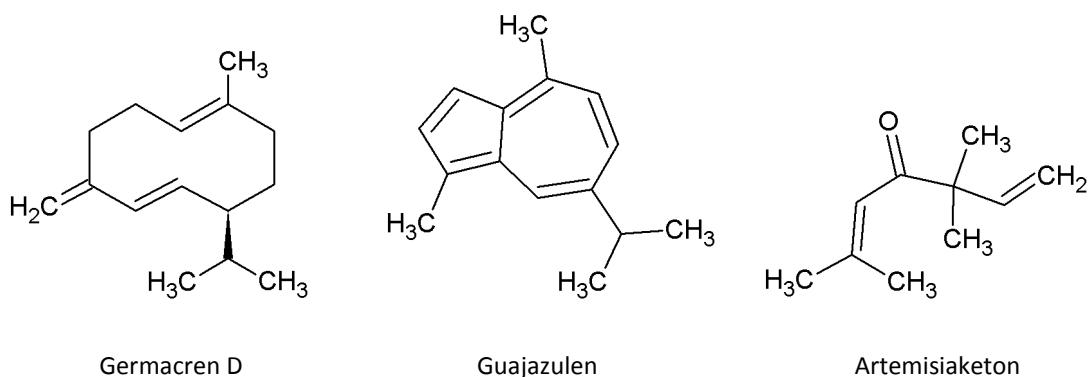


Abbildung 18: Eine Auswahl der im ätherischen Öl der Schafgarbe enthaltenen terpenoiden Verbindungen.

Im Aggregat *A. millefolium* wurden zahlreiche Sesquiterpenlactone des Guaianolid-, Germacranolid-, und Eudesmanolidtyps gefunden, außerdem noch einige ungewöhnlich gebaute SL. Die folgende, tabellarische Auflistung (Tabelle 2,Tabelle 3,Tabelle 4,Tabelle 5 und Tabelle 6) versucht eine Übersicht über die in der Literatur angegebenen SL zu geben

¹¹⁵ Hofmann et al. 1992

¹¹⁶ Rohloff et al. 2000

¹¹⁷ Bracher et al. 2004

¹¹⁸ Todorova et al. 2007

¹¹⁹ Fischer et al. 2001

¹²⁰ Michler et al. 1992

¹²¹ Suleimenov et al. 2001

¹²² Jurenitsch 2007

¹²³ Orth et al. 1994

und nimmt eine gewisse strukturelle Gliederung der Verbindungen vor. Es sei darauf hingewiesen, dass einige (gekennzeichnete) Verbindungen als Artefakte angesehen werden.

Tabelle 2: In *A. millefolium* agg. gefundene, ungewöhnlich gebaute Sesquiterpenlactone.^{124,125}

Ungewöhnlich gebaute Sesquiterpenlactone
Achimillsäureester A, B,C (Tozyo et al. 1994)
Hemiacetale von 2,3-seco-Guajanolide (Todorova et al. 2007), evtl. Artefakte

Tabelle 3: In *A. millefolium* agg. gefundene Sesquiterpendilactone.¹²⁶

Sesquiterpendilactone
Paulitin (Csupor-Löffler et al. 2009)
Isopaulitin (Csupor-Löffler et al. 2009)
Psilostachyin (Csupor-Löffler et al. 2009)

Tabelle 4: In *A. millefolium* agg. gefundene Eudesmanolide.^{127,128,129,130}

Eudesmanolide
Dihydroreynosin (Ulubelen et al.1990; Todorova et al. 2007)
Tauremisin (Glasl et al. 1999a)
Arglanin (Glasl et al. 1999a)
4- <i>epi</i> -Arglanin (Glasl et al. 1999a)
4-Hydroperoxy-arglanin (Glasl et al. 1999a)
Santamarin (Glasl et al. 1999a)
11 α ,13-Dihydrosantamarin (Todorova et al. 2007)
11- <i>epi</i> -Artesin (Todorova et al. 2007)
1 β -Hydroxy-11- <i>epi</i> -colatrin (Todorova et al. 2007)
8-Acetylartapshin (Mustakerova et al. 2002)
Artapshin (Mustakerova e tal. 2002)
8 α -Hydroxy-11 β ,13-dihydrobalchanin (Mustakerova et al. 2002)

¹²⁴ Tozyo et al. 1994

¹²⁵ Todorova et al. 2007

¹²⁶ Csupor-Löffler et al. 2009

¹²⁷ Ulubelen et al. 1990

¹²⁸ Todorova et al. 2007

¹²⁹ Glasl et al. 1999a

¹³⁰ Mustakerova et al. 2002

Tabelle 5: In *A. millefolium* agg. gefundene Germacranolide.^{131,132,133,134,135,136,137,138,139}

Germacranolide
Achillifolin (Ulubelen et al. 1990)
Millefin (Kasymov & Sidyakin 1972; Konovalov & Chelombit'ko 1991)
Dihydroparthenolid (Ulubelen et al. 1990; Mustakerova et al. 2002; Todorova et al. 2007)
Balchanolid (Mustakerova et al. 2002)
3β-Hydroxy-11α,13-dihydrocostunolid (Glasl et al. 2002)
8α-Acetoxy-3β-hydroxy-11(αH),13-dihydrocostunolid (Trendafilova et al. 2006)
3β-Hydroxy-13-acetoxygermacra-1(10)E,4E,7(11)-trien-12,6α-olid (Trendafilova et al. 2006)
Sintenin (Csupor-Löffler et al. 2009)
13-Acetoxy-3β-isovaleroxygermacra-1(10)E,4E,7(11)-trien-12,6α-olid (Todorova et al. 2006)
13-Acetoxy-3β-(2-methylbutyroyloxy)-germacra-1(10)E,4E,7(11)-trien-12,6α-olid (Todorova et al. 2006)
13-Hydroxy-3β-isovaleroxygermacra-1(10)E,4E,7(11)-trien-12,6α-olid (Todorova et al. 2006)
13-Hydroxy-3β-(2-methylbutyroyloxy)-germacra-1(10)E,4E,7(11)-trien-12,6α-olid (Todorova et al. 2006)
3β-Isovaleroxy-8α-hydroxy-11(αH),13-dihydrocostunolid (Todorova et al. 2006)
3β-(2-Methylbutyroyloxy)-8α-hydroxy-11(αH),13-dihydrocostunolid (Todorova et al. 2006)
Artabin (Todorova et al. 2007)
1β-Hydroxy-6βH,7αH,11αH-germacra-4(5),10(15)-dien-6,12-olid (11- <i>epi</i> -Gallicin) (Todorova et al. 2007)
3β-(2-Methylbutyroyloxy)-9β-hydroxy-germacra-1(10),4-dienolid (Todorova et al. 2007)
8α-Tigloyloxy-11β,13-dihydroparthenolid (Mustakerova et al. 2002)
8-Acetylshonachalin (Mustakerova et al. 2002)
1β-Hydroperoxy-8α-hydroxygermacra-4,10(14)-dien-6β,7α,11βH-12,6-olid (Mustakerova et al. 2002)
8α-Hydroxy-4α,5β-epoxy-11βH-germacr-1(10)-en-12,6α-olid (Mustakerova et al. 2002)
Lanuginolid (Mustakerova et al. 2002)
Shonachalin A (Mustakerova et al. 2002)

¹³¹ Ulubelen et al. 1990

¹³² Kasymov und Sidyakin 1972

¹³³ Konovalov und Chelombit'ko 1991

¹³⁴ Mustakerova et al. 2002

¹³⁵ Todorova et al. 2007

¹³⁶ Glasl et al. 2002

¹³⁷ Trendafilova et al. 2006

¹³⁸ Csupor-Löffler et al. 2009

¹³⁹ Todorova et al. 2006

Tabelle 6: In *A. millefolium* agg. gefundene Guaianolide eingeteilt in Proazulene und „nicht azulenogene“ Guaianolide. Beide Gruppen lassen sich weiter unterteilen. ** Literaturangaben am Tabellenende. Zahlen in Klammern verweisen auf die jeweiligen Strukturen.

Guaianolide
Proazulene
Proazulene ohne besondere funktionelle Gruppen
Achillicin (1) (8 α -Acetylartabsin bzw. 8 α -Acetoxy-10- <i>epi</i> -artabsin, z.T. widersprüchliche Literaturangaben) (Banh-Nhu et al. 1979; Kastner et al. 1991a,b,c; Kastner et al. 1992a; Schröder et al. 1994; Glasl et al. 1999a; Trendafilova et al. 2006; Todorova et al. 2007;)
8 α -Angeloxyartabsin (2) (bzw. 8 α -Angeloxy-10- <i>epi</i> -artabsin, z.T. widersprüchliche Literaturangaben) (Kastner et al. 1991b,a,c; Kastner et al. 1992a; Schröder et al. 1994; Glasl et al. 1999a; Todorova et al. 2007; Trendafilova et al. 2006)
8 α -Tigloxyartabsin (3) (bzw. 8 α -Tigloxy-10- <i>epi</i> -artabsin, z.T. widersprüchliche Literaturangaben) (Kastner et al. 1991a,b,c; Kastner et al. 1992a; Schröder et al. 1994; Glasl et al. 1999a; Trendafilova et al. 2006; Todorova et al. 2007)
Matricin (4) (Trendafilova et al. 2006; Todorova et al. 2007)
8-Desacetyl-8-tigloylmatricin (5) (Kastner et al. 1991b; Kubelka et al. 1999)
4- <i>epi</i> -Matricin (6) (Trendafilova et al. 2006; Todorova et al. 2007)
8-Desacetyl-4- <i>epi</i> -matricin (7) (Kastner et al. 1992a,b)
8-Desacetyl-8-tigloyl-4- <i>epi</i> -matricin (8) (Kastner et al. 1991b; Kubelka et al. 1999; Trendafilova et al. 2006)
8-Desacetyl-8-angeloyl-4- <i>epi</i> -matricin (9) (Todorova et al. 2006; Trendafilova et al. 2006)
8 α -Acetoxytannunolid B (10) (Todorova et al. 2006; Trendafilova et al. 2006)
8 α -Acetoxy-6- <i>epi</i> -tannunolid B (11) (Todorova et al. 2006; Trendafilova et al. 2006)
8 α -Angeloxyloxytannunolid B (12) (Todorova et al. 2006, Todorova et al. 2007 evtl. Artefakt)
8 α -Angeloxyloxy-6- <i>epi</i> -tannunolid B (13) (Todorova et al. 2006)
8 α -Angeloxyloxy-11- <i>epi</i> -tannunolid C (14) (Todorova et al. 2006)
8 α -Acetoxy-11- <i>epi</i> -tannunolid C (15) (Trendafilova et al. 2006)
2 α ,8 α -Dihydroxy-1 α ,5 α ,6 β ,7 α ,11 β H-guaja-3,10(14)-dien-12,6-olid (16) (Glasl et al. 1999b)
8 α -Acetoxy-2 α -hydroxy-1 α ,5 α ,6 β ,7 α ,11 β H-guaia-3,10(14)-dien-12,6-olid (17) (Glasl et al. 1999b)
8 α -Angeloxy-2 α ,4 α ,10 β -trihydroxy-6 β H,7 α H,11 β H-1(5)-guaien-12,6 α -olid (18) (Glasl et al. 2001a,b)
2,3-Dihydrodesacetoxymatricin (19) (Verzar-Petri et al. 1979)
Proazulenogene Diepoxyguaianolide (evtl. Artefakte nach Todorova et al. 2007)
1 α ,2 α ,4 α ,5 α -Diepoxy-8 α -angeloxyloxy-10 β -hydroxy-6 β H,7 α H,11 β H-12,6 α -guaianolid (20) (Todorova et al. 2006; Trendafilova et al. 2006)
1 β ,2 β ,4 β ,5 β -Diepoxy-8 α -angeloxyloxy-10 β -hydroxy-6 β H,7 α H,11 β H-12,6 α -guaianolid (21) (Glasl et al. 2001; Trendafilova et al. 2006; Todorova et al. 2007)
1 α ,2 α ,4 α ,5 α -Diepoxy-8 α -tigloyloxy-10 β -hydroxy-6 β H,7 α H,11 β H-12,6 α -guaianolid (22) (Trendafilova et al. 2006)
1 β ,2 β ,3 β ,4 β -Diepoxy-8 α -tigloyloxy-10 β -hydroxy-6 β H,7 α H,11 β H-12,6 α -guaianolid (23) (Trendafilova et al. 2006)
1 α ,2 α ,3 α ,4 α -Diepoxy-8 α -tigloyloxy-10 β -hydroxy-6 β H,7 α H,11 β H-12,6 α -guaianolid (24) (Trendafilova et al. 2006)
1 α ,2 α ,3 α ,4 α -Diepoxy-8 α -angeloxyloxy-10 β -hydroxy-6 β H,7 α H,11 β H-12,6 α -guaianolid (25) (Trendafilova et al. 2006)

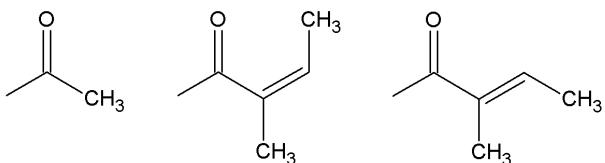
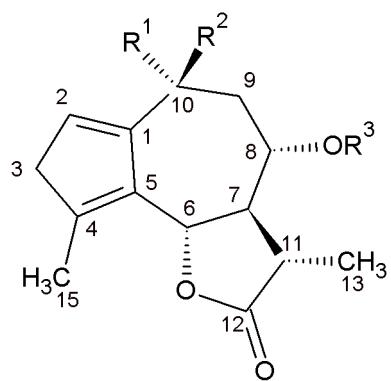
8α-Isobutyryloxy-11(βH),13-dihydro-10-<i>epi</i>-tanaparthin-α-peroxid (26) (Trendafilova et al. 2006)
8α-Tigloyloxy-11(βH),13-dihydro-10-<i>epi</i>-tanaparthin-α-peroxid (27) (Trendafilova et al. 2006)
7,8-Guaianolide
4α-Hydroxy-6α-angeloxy-9α-acetoxy-5αH,7αH,8βH,11αH-guai-1(10),2-dien-7,8-olid (28) (Kastner et al. 1992b)
4α-Hydroxy-6α-tigloxy-9α-acetoxy-5αH,7αH,8βH,11αH-guai-1(10),2-dien-7,8-olid (29) (Kastner et al. 1992b)
4α-Hydroxy-6α-acetoxy-9α-acetoxy-5αH,7αH,8βH,11αH-guai-1(10),2-dien-7,8-olid (30) (Kastner et al. 1992b)
4β-Hydroxy-6α-angeloxy-9α-acetoxy-5αH,7αH,8βH,11αH-guai-1(10),2-dien-7,8-olid (31) (Kastner et al. 1992b)
Nicht-azulenogene Guaianolide
Ohne besondere funktionelle Gruppen
Achillin (Glasl et al. 2002; Todorova et al. 2007)
8-Angeloxylachillin (Glasl et al. 2002)
Leucodin (Glasl et al. 2002)
Dehydroleucodin (Trendafilova et al. 2006, Todorova et al. 2007)
8-Angeloxyleucodin (Glasl et al. 2002)
8-Desacetylmatricarin (Konovalov und Chelombit'ko 1991; Glasl et al. 1999a; Glasl et al. 2001a; Glasl et al. 2002; Todorova et al. 2007; Csupor-Löffler et al. 2009)
Matricarin (Konovalov und Chelombit'ko 1991; Glasl et al. 1999a; Trendafilova et al. 2006; Todorova et al. 2007)
5 α -Hydroxymatricarin (Trendafilova et al. 2006)
11,13-Dehydro-desacetylmatricarin (Zitterl-Eglseer et al. 1991; Kubelka et al. 1999; Todorova et al. 2007)
4 α ,10 β -Dihydroxy-8 α -tigloyloxy-2-oxo-6 β H, 7 α H, 11 β H-1(5)-guajen-12,6 α -olid (Trendafilova et al. 2006)
8 α -Angeloyloxy-4 α -methoxyguaia-1(10),2-dien-12,6 α -olid (Todorova et al. 2006)
8 α -Angeloyloxy-4 β -methoxyguaia-1(10),2-dien-12,6 α -olid (Todorova et al. 2006)
5 α -Hydroxy-8-desacetyl-8-tigloylmatricarin (Kastner et al. 1991a)
8 α -Hydroxyachillin (Todorova et al. 2007; Konovalov und Chelombit'ko 1991)
8 α -Angeloxy-4 α ,10 β -dihydroxy-2-oxo-6 β H,7 α H, 11 β H-1(5)-guajen-12,6 α -olid (Glasl et al. 2001a,b)
3-Oxa-guaianolide
3-Oxa-achillicin (Kastner et al. 1991a; Ochir et al. 1991; Schröder et al. 1994; Glasl et al. 1999; Todorova et al. 2007; Trendafilova et al. 2006)
8 α -Tigloxy-3-oxa-artabsin (Kastner et al. 1991a; Schröder et al. 1994; Glasl et al. 1999a; Todorova et al. 2007; Trendafilova et al. 2006)
8 α -Angeloxy-3-oxa-artabsin (Kastner et al. 1991a; Ochir et al. 1991; Schröder et al. 1994; Glasl et al. 1999a; Todorova et al. 2007; Trendafilova et al. 2006)
Guaianolidperoxide
α -Peroxyachifolid (Rücker et al. 1990; Hausen et al. 1991)
β -Peroxyachifolid (Rücker et al. 1990)
Isoapressin (Rücker et al. 1993)
10-Isovaleroyldesacetylisoapressin (Rücker et al. 1993)
10-Angeloyldesacetylisoapressin (Rücker et al. 1993)

8-Tigloyl desacetyl zeomontanin (Rücker et al. 1993)
8α-Isobutyryloxy-11(βH),13-dihydro-10- <i>epi</i> -tanaparthin-α-peroxid (Trendafilova et al. 2006; Todorova et al. 2007)
8α-Tigloyloxy-11(βH),13-dihydro-10- <i>epi</i> -tanaparthin-α-peroxid (Trendafilova et al. 2006 ;Todorova et al. 2007)
8α-Angeloxylartabsin-1,4-endoperoxid (Kubelka et al. 1999)
8α-Tigloxyartabsin-1,4-endoperoxid (Kubelka et al. 1999)
Mit α-Methylen-γ-Lactonstruktur
Rupicolin A und B (Zittler-Eglseer et al. 1991; Kubelka et al. 1999)
2β,3β-Epoxy-1α,4β,10α-trihydroxyguai-11(13)-en-12,6α-olid (Achillinin A) (Li et al. 2011)
Dimere Guaianolide
Achicollinolid (Trendafilova et al. 2006)
Achillinin B und C (Li et al. 2012)

** Literatur ^{140,141,142,143,144,145,146,147,148,149,150,151,152,153,154,155,156,157,158,159,160,161,162,163,164,165}

Die Abbildung 19, Abbildung 20 und Abbildung 21 zeigen die Strukturen einiger der in Tabelle 6 aufgeführten Verbindungen.

-
- ¹⁴⁰ Banh-Nhu et al. 1979
¹⁴¹ Kastner et al. 1991c
¹⁴² Kastner et al. 1991b
¹⁴³ Schröder et al. 1994
¹⁴⁴ Glasl et al. 1999a
¹⁴⁵ Trendafilova et al. 2006
¹⁴⁶ Todorova et al. 2007
¹⁴⁷ Kastner et al. 1992a
¹⁴⁸ Glasl et al. 2002
¹⁴⁹ Kubelka et al. 1999
¹⁵⁰ Glasl et al. 1999b
¹⁵¹ Glasl et al. 2001a
¹⁵² Glasl et al. 2001b
¹⁵³ Konovalov und Chelombit'ko 1991
¹⁵⁴ Csupor-Löffler et al. 2009
¹⁵⁵ Zitterl-Eglseer et al. 1991
¹⁵⁶ Kastner et al. 1991a
¹⁵⁷ Ochir et al. 1991
¹⁵⁸ Kastner et al. 1992b
¹⁵⁹ Rücker et al. 1991
¹⁶⁰ Rücker et al. 1993
¹⁶¹ Hausen et al. 1991
¹⁶² Li et al. 2011
¹⁶³ Li et al. 2012
¹⁶⁴ Verzar-Petri et al. 1979
¹⁶⁵ Kastner et al. 1991a

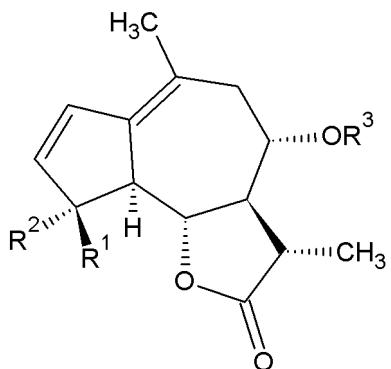


Acetyl

Angeloyl

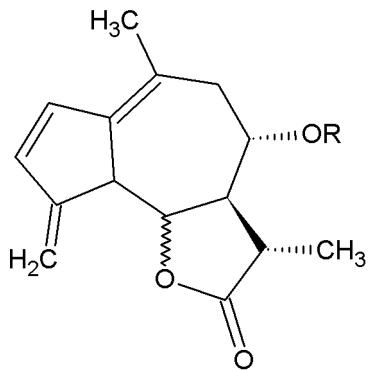
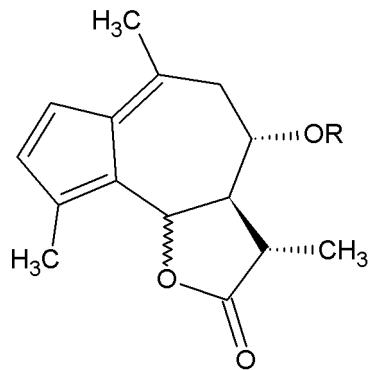
Tigloyl

Verbindung	R ¹	R ²	R ³
1	CH ₃	OH	Acetyl
2	CH ₃	OH	Angeloyl
3	CH ₃	OH	Tigloyl
1 (10- <i>epi</i>)	OH	CH ₃	Acetyl
2 (10- <i>epi</i>)	OH	CH ₃	Angeloyl
3 (10- <i>epi</i>)	OH	CH ₃	Tigloyl



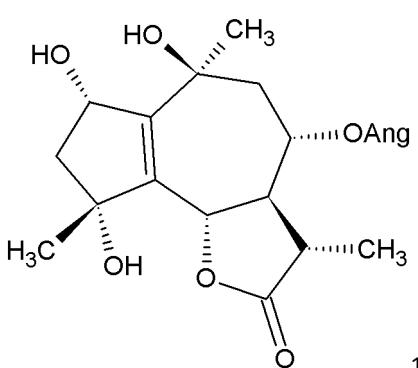
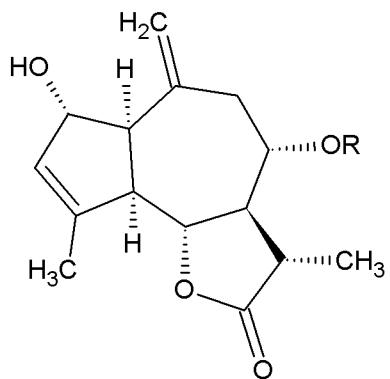
Verbindung	R ¹	R ²	R ³
4	CH ₃	OH	Acetyl
5	CH ₃	OH	Tigloyl
6	OH	CH ₃	Acetyl
7	OH	CH ₃	H
8	OH	CH ₃	Tigloyl
9	OH	CH ₃	Angeloyl

Abbildung 19: In der Schafgarbe vorkommende Guaianolide (vgl.Tabelle 6)



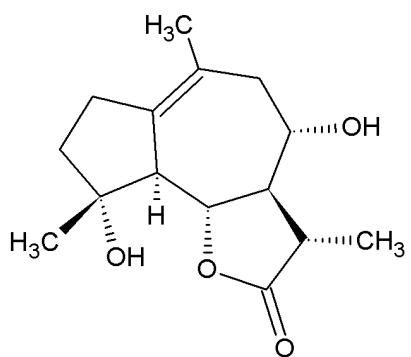
Verbindung	R	6-H
10	Acetyl	α
11	Acetyl	β
12	Angeloyl	α
13	Angeloyl	β

Verbindung	R	6-H
14	Angeloyl	β
15	Acetyl	α



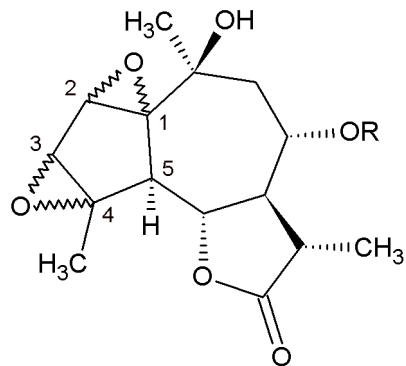
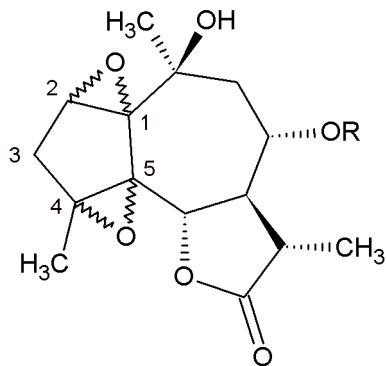
18

Verbindung	R
16	H
17	Acetyl



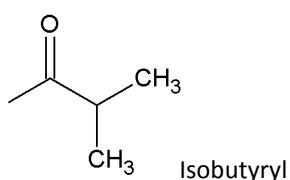
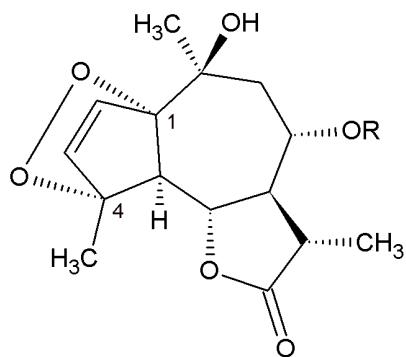
19

Abbildung 20: Weitere in der Schafgarbe vorkommende Guaianolide (vgl.Tabelle 6)

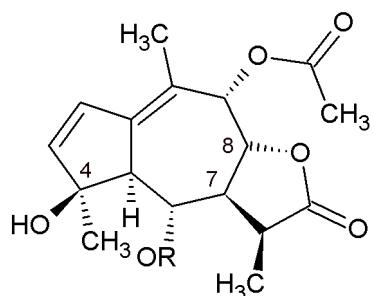
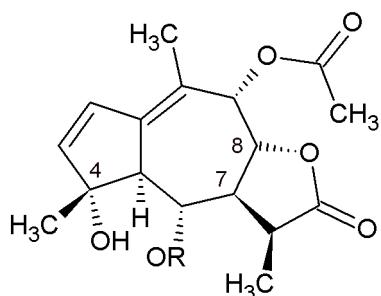


Verbindung	R	Konfiguration
20	Angeloyl	1 α , 2 α , 4 α ,5 α -diepoxy
21	Angeloyl	1 β , 2 β , 4 β , 5 β -diepoxy
22	Tigloyl	1 α , 2 α , 4 α ,5 α -diepoxy

Verbindung	R	Konfiguration
23	Tigloyl	1 β , 2 β , 3 β , 4 β -diepoxy
24	Tigloyl	1 α , 2 α , 3 α ,4 α -diepoxy
25	Angeloyl	1 α , 2 α , 3 α ,4 α -diepoxy



Verbindung	R
26	Isobutyryl
27	Tigloyl



Verbindung	R
28	Angeloyl
29	Tigloyl
30	Acetyl

Verbindung	R
31	Angeloyl

Abbildung 21: In der Schafgarbe vorkommende Guaianolide mit Epoxid und Peroxid Substitutionen sowie C-8 Lactone (vgl.Tabelle 6)

Aufgrund der zahlreichen Kleinarten des *A. millefolium*-Aggregats, kann diese Liste keinen Anspruch auf Vollständigkeit erheben.

Die Schafgarbe ist außerdem eine Akkumulatorpflanze für Schwermetalle, v.a. für Cu und Pb, für die sie sogar als Monitor der Luftkonzentration dienen kann.¹⁶⁶

B.1.3 Einführung zur Pharmakologie von Proazulenen aus Kamille und Schafgarbe

Die Kamille wurde bereits von den Menschen des Altertums als Heilpflanze geschätzt.¹⁶⁷ Ihre Verwendung ist seit etwa 2500 Jahren belegt und schon im Jahr 1488 erwähnte Saladin von Ascolum das blaue ätherische Öl der Kamille. Auch Sebastian Kneipp und viele weitere Autoren aus dem Bereich der Phytotherapie berichten über die Heilwirkung von Kamillenzubereitungen.¹⁶⁸ Die Anwendungsbereiche der Kamille und ihrer Zubereitungen sind vielfältig. Meist wird sie als Tee oder in Form eines der zahlreichen erhältlichen alkoholischen Auszüge, wie z.B. Kamillosan®, verabreicht.¹⁶⁹

Kamillenzubereitungen werden innerlich u.a. bei von Krämpfen begleiteten, entzündlichen Erkrankungen des Gastrointestinaltrakts angewandt. Äußerlich finden sie Anwendung bei Haut- und Schleimhautentzündungen, auch in der Mundhöhle, als Inhalation bei entzündlichen Erkrankungen und Reizzuständen der Atemwege, als Bäder und Spülungen bei Erkrankungen im Genital- und Analbereich und das Kamillenöl v.a. bei unterschiedlichen Hauterkrankungen.^{170,171,172} Dabei ist wichtig zu erwähnen, dass das Extraktionsmittel natürlich großen Einfluss auf die Zusammensetzung des Extraktes hat. So enthält Kamillentee nur einen kleinen Teil des in den Blüten enthaltenen ätherischen Öls, dafür höhere Konzentrationen wasserlöslicher Flavonoide, die einen Beitrag zur entzündungshemmenden und krampflösenden Wirkung leisten. In ethanolischen Auszügen wie Kamillosan® sind hingegen lipophilere Substanzen wie α -Bisabolol, Bisabololoxid, Spiroether und das Proazulen Matricin in größeren Mengen enthalten.¹⁷³ Am Beispiel von Heißwasserauszügen der Schafgarbe wurde jedoch nachgewiesen, dass auch in Teezubereitungen nennenswerte

¹⁶⁶ Jurenitsch 2007

¹⁶⁷ Luppold 1984

¹⁶⁸ Schilcher 1987

¹⁶⁹ Hitziger et al. 2003

¹⁷⁰ Schilcher 1987

¹⁷¹ Dingermann et al. 2004

¹⁷² Hänsel und Sticher 2007

¹⁷³ Schilcher 1987

Mengen von Proazulenen vorhanden sein können.^{174,175} Das ebenfalls therapeutisch eingesetzte ätherische Öl der Kamille, welches durch Wasserdampfdestillation gewonnen wird, enthält u.a. das blau gefärbte Chamazulen, ein aus dem instabilen Matricin durch Abspaltung von Essigsäure, Wasser und anschließender Decarboxylierung entstehender, aromatischer Kohlenwasserstoff.^{176,177,178,179} Es wurde schon in der ersten Hälfte des 20. Jahrhunderts gezeigt, dass Chamazulen nicht genuin in der Kamille vorkommt, sondern aus einem Vorgängermolekül einem „Azulenbildner“ oder „Proazulen“ entsteht.^{180,181,182,183} 1954 wurde dann das Guaianolid Matricin als Vorstufe des Chamazulens entdeckt und isoliert.¹⁸⁴ Verschiedene Wirkungen sind für Kamillenzubereitungen bzw. für die darin enthaltenen Einzelsubstanzen nachgewiesen, wobei man davon ausgeht, dass es sich um synergistische Effekte der verschiedenen Inhaltsstoffe handelt.¹⁸⁵ Die wichtigsten sind die antiphlogistische, spasmolytische und antibakterielle bzw. antifungale Wirkung.¹⁸⁶ Letztere wird v.a. den lipophilen Bestandteilen des ätherischen Öls der Kamille wie dem Bisabolol und den Spiroethern, aber auch dem Chamazulen, zugeschrieben.^{187,188,189,190,191} Die spasmolytische Wirkung von Kamillenextrakten wird v.a. durch Flavonoide, wie das Apigenin, aber auch durch das ätherische Öl und durch Cumarine bewirkt.^{192,193,194,195} Viele weitere Wirkungen der Kamille sind bekannt und es würde den Rahmen dieser Arbeit sprengen, auf alle näher einzugehen, daher seien hier nur einige kurz erwähnt. Unter anderem wurde von immunmodulatorischer, antihyperglykämischer, Juckreiz mindernder, wundheilender, Stress mindernder, antidepressiver und anxiolytischer Aktivität berichtet.¹⁹⁶ Auch krebshemmende Wirkung und eine Verminderung der Entwicklung einer Morphinabhängigkeit bei Ratten

¹⁷⁴ Zitterl-Eglseer et al. 1991

¹⁷⁵ Eglseer et al. 1990

¹⁷⁶ Stahl 1954a

¹⁷⁷ Stahl 1954b

¹⁷⁸ Stahl 1954c

¹⁷⁹ Schilcher 1987

¹⁸⁰ Ruhemann und Lewy 1927

¹⁸¹ Koch 1942

¹⁸² Neuwald 1948

¹⁸³ Wegner 1950

¹⁸⁴ Cekan et al. 1954

¹⁸⁵ Ammon und Kaul 1992

¹⁸⁶ Hänsel und Sticher 2007

¹⁸⁷ Schilcher 1987

¹⁸⁸ Morgan 1996

¹⁸⁹ McKay und Blumberg 2006

¹⁹⁰ Hänsel und Sticher 2007

¹⁹¹ Gupta et al. 2010

¹⁹² Schilcher 1987

¹⁹³ Avallone et al. 2000

¹⁹⁴ Hänsel und Sticher 2007

¹⁹⁵ Maschi et al. 2008

¹⁹⁶ Gupta et al. 2010

wurde beobachtet.^{197,198} Für den Inhalt dieser Arbeit ist jedoch v.a. die anti-inflammatoryische Aktivität der Kamille (und auch der Schafgarbe) von Interesse. Die antiphlogistische Wirkung wird einer Vielzahl von Stoffgruppen zugeschrieben darunter Flavonoiden, dabei hauptsächlich dem Apigenin, aber auch Bestandteilen des ätherischen Öls, wie dem α -Bisabolol, den Spiroethern und auch dem hier untersuchten Chamazulen und dessen Precursor, dem Sesquiterpenlacton Matricin.^{199,200}

Die Forschungsergebnisse zur anti-inflammatoryischen Wirkung von Matricin und Chamazulen sind allerdings z.T. sehr widersprüchlich, was die im Folgenden erwähnten Untersuchungen exemplarisch verdeutlichen sollen. Sehr früh schon zeigten Heubner & Albath (1939) mittels *in vivo* Studien eine entzündungshemmende Wirkung des Chamazulens.²⁰¹ F. Neuwald (vgl. Jakolev et al. 1983) schrieb in einer Publikation von 1948 aufgrund seiner Beobachtungen ebenfalls dem Chamazulen die anti-inflammatoryische Wirksamkeit zu, während andere, wie H. Janistyn (vgl. Jakolev et al. 1983) oder auch Oettel & Wilhelm-Kollmannsperger (1955) keine Wirkung des Chamazulens beobachteten bzw. dem Proazulen größere Wirksamkeit zuschrieben.^{202,203} Jakolev et al. (1983) beschreiben in ihrer Publikation eingangs die widersprüchliche Datenlage bezüglich der anti-inflammatoryischen Aktivität von Matricin und Chamazulen und zeigen dann an einer eigenen *in vivo* Untersuchung die stärkere Wirksamkeit von Matricin im Vergleich zum Chamazulen.²⁰⁴ Safayhi et al. 1994 berichten wiederum von einem hemmenden Einfluss von Chamzaulen auf den proinflammatoryischen Arachidosäurestoffwechsel, nicht jedoch von Matricin. Bei der Matricin-degradation entsteht auf dem Weg zum Chamazulen eine weitere tiefblaue Verbindung als Zwischenprodukt, die Chamazulencarbonsäure.²⁰⁵ Mit dieser Verbindung wurde relativ aktuell die beobachtete antiphlogistische Wirkung des Matricins erklärt, welches sukzessive Chamazulencarbonsäure durch Wasserabspaltung nachliefert.^{206,207} In einigen *in vivo*-Untersuchungen wurde eine Ödemhemmung durch Matricin beschrieben, in einer *in vitro*-Studie zeigte sich jedoch, dass Matricin und

¹⁹⁷ Srivastava und Gupta 2007

¹⁹⁸ Gomaa et al. 2003

¹⁹⁹ Schilcher 1987

²⁰⁰ Hänsel und Sticher 2007

²⁰¹ Heubner und Albath 1939

²⁰² Jakolev et al. 1983

²⁰³ Oettel und Wilhelm-Kollmannsperger 1955

²⁰⁴ Jakolev et al. 1983

²⁰⁵ Stahl 1954c

²⁰⁶ Hitziger et al. 2003

²⁰⁷ Ramadan et al. 2006

Strukturverwandte den u.a. proinflammatorischen NF-κB-Weg nicht inhibieren konnten.^{208,209,210}

Da sich die meisten aktuellen Studien zur Kamille entweder mit Kamillenextrakten, mit an unterschiedlichen Substanzklassen angereicherten Fraktionen, bzw. dem Apigenin oder dem Chamazulen befassen und kaum mit dem Matricin, ist weiterhin relativ unklar, ob Matricin nun anti-inflammatoryische Aktivität besitzt, oder nicht.²¹¹ Die Klärung einer potentiellen Wirksamkeit des Matricins ist jedoch wünschenswert, da es ein wichtiger/typischer Bestandteil in Kamillenextrakten ist. Außerdem handelt es sich bei den vorhandenen Untersuchungen zu Matricin und anderer Proazulene und Chamazulen hauptsächlich um *in vivo* Studien älteren Datums, deren Aussagekraft zu den möglichen molekularen Wirkmechanismen stark begrenzt ist. Daher sind pharmakologische *in vitro* Experimente nötig, die eine genauere Eingrenzung der molekularen Targets erlauben. Dieses für Matricin und Chamazulen zu tun war u.a. Ziel dieser Arbeit (siehe auch Zielsetzung B.1.5).

Doch das Matricin ist nicht das einzige Proazulen, welches eine entzündungshemmende Aktivität zeigt. Auch andere, mit dem Matricin verwandte Proazulene, wie z.B. das Achillicin oder dessen Angeloyl- bzw. Tigloylderivate, die in der ebenfalls zu den Asteraceae gehörenden Schafgarbe (*Achillea millefolium* L.) vorkommen, wurden auf ihre anti-inflammatoryische Aktivität getestet.²¹² Einige dieser Proazulene erwiesen sich als aktiv, was die Verwendung der Schafgarbe in der Volksmedizin u.a. bei Entzündungen und Wunden rechtfertigt.²¹³

Die Schafgarbe ist, wie die Kamille, ebenfalls eine seit langer Zeit verwendete Arzneipflanze. Seit mindestens 3000 Jahren (nach Mitich, 1990) hat diese Pflanze ihren Platz bei den Heilkundigen, eventuell auch schon viel länger, denn bereits in einem 65.000 Jahre alten Grab eines Neanderthalers konnten Schafgarbenpollen nachgewiesen werden.^{214,215} Außerdem ist diese Sammelart, die aus zahlreichen schwer voneinander abzugrenzenden Kleinarten besteht, sehr weit verbreitet und wurde neben den Menschen im antiken Europa

²⁰⁸ Zitterl-Eglseer et al. 1991

²⁰⁹ Zidorn et al. 1999

²¹⁰ Lyss et al. 2000

²¹¹ McKay und Blumberg 2006

²¹² Kastner et al. 1993

²¹³ Benedek und Kopp 2007

²¹⁴ Mitich 1990

²¹⁵ Aplequist und Moerman 2011

auch schon von den indigenen Völkern Nordamerikas arzneilich genutzt.^{216,217} Die Schafgarbe ist in ihrer Anwendung der Kamille sehr ähnlich.²¹⁸ Wie bei der Kamille, werden auch von der Schafgarbe v.a. wässrige oder alkoholische Auszüge verwendet und innerlich bei krampfartigen Magen-Darm-Beschwerden, bei Appetitlosigkeit und als Choleretikum eingesetzt. Äußerlich werden die Zubereitungen v.a. zur Behandlung von Wunden und Entzündungen der Haut angewandt.^{219,220}

Aplinequist & Moerman (2011) geben eine aktuelle Übersicht der Datenlage zu den Wirkungen von *Achillea millefolium*. Sie erwähnen u.a. antibakterielle Aktivität von Schafgarbenextrakten, z.B. auch gegen das Magengeschwüre auslösende Bakterium *Helicobacter pylori*, sowie die ebenfalls antibakterielle Wirkung des ätherischen Öls. Des Weiteren berichten sie über antifungale Aktivität, Wirkung gegen parasitäre Sporozoen, eine krampflösende Wirkung des Rohextrakts und flavonoidreicher Fraktionen, antioxidative Aktivität und Wirksamkeit gegen Krebszellen.²²¹ Anti-inflammatorische Aktivität wurde z.B. für einen methanolischen Extrakt und für flavonoid- bzw. dicaffeoylchinasäurereiche Fraktionen gezeigt.²²² Auch von Sesquiterpenlactonen aus der Schafgarbe ist antiphlogistische Aktivität bekannt. So hemmten der Extrakt und verschiedene sesquiterpenlactonreiche Fraktionen der Schafgarbe den sog. „oxidativen burst“ bei humanen Neutrophilen, eine Reaktion von Immunzellen auf z.B. bakterielle Infektionen, die bei chronischem Auftreten aber Schäden im Gewebe verursachen kann.²²³ Außerdem erwies sich ein Sesquiterpenlacton vom Germacran-Typ *in vivo* als entzündungshemmend.²²⁴ Einige v.a. *in vivo*-Studien zeigten für die im *Achillea millefolium*-Aggregat zahlreich vorkommenden Proazulene anti-inflammatoryische Wirkung.^{225,226,227,228}

²¹⁶ Chandler et al. 1982

²¹⁷ Aplinequist und Moerman 2011

²¹⁸ Hänsel und Sticher 2007

²¹⁹ Orth et al. 1994

²²⁰ Nemeth und Bernath 2008

²²¹ Aplinequist und Moerman 2011

²²² Benedek et al. 2007b

²²³ Choudhary et al. 2007

²²⁴ Sosa et al. 2001

²²⁵ Jakovlev et al. 1983

²²⁶ Zitterl-Eglseer et al. 1991

²²⁷ Kastner et al. 1993

²²⁸ Zidorn et al. 1999

Trotzdem wurde auch bei der Schafgarbe auf den Abbau der Proazulene über Chamazulencarbonsäure zum Chamazulen verwiesen und den Abbauprodukten und nicht den Proazulenen die entzündungshemmende Wirkung zugesprochen.^{229,230,231} Diese momentan vorherrschende, eher unbefriedigende, weil widersprüchliche Datenlage bezüglich der anti-inflammatorischen Wirksamkeit von Proazulenen war u.a. Motivation dieser Arbeit mit dem Ziel, die Datenlage zu bereichern und damit zur Klärung einiger Widersprüchlichkeiten beitragen zu können.

B.1.4 Kurze Einführung zur Molekularbiologie von Entzündungsprozessen

Um die potentiell entzündungshemmende Wirkung von Matricin, Chamazulen bzw. Schafgarbenextrakt zu testen, wurden in dieser Arbeit verschiedene *in vitro* Methoden angewendet. Die molekularen Hintergründe und der jeweilige Bezug zur Entzündungshemmung werden hier für jede Methode kurz beschrieben. Damit soll ein ausschnittsweiser Überblick über das sehr komplexe Entzündungsgeschehen geben werden.

B.1.4.1 Entzündungsprozesse und die Rolle des Adhäsionsmoleküls ICAM-1

Die physiologische Aufgabe einer Entzündung besteht in der Regel darin, ins Gewebe eingedrungene Mikroorganismen oder andere Noxen zu bekämpfen oder zu beseitigen. Dazu ist eine komplexe Kette verschiedener Ereignisse nötig, beginnend mit der Wahrnehmung und „Meldung“ des pathogenen Geschehens bis hin zur Migration von Immunzellen aus den Blutgefäßen ins betroffene Gewebe, die den Kampf z.B. mit pathogenen Mikroorganismen aufnehmen.^{232,233} Dieser hochkomplexe Vorgang soll hier nur grob umrissen werden. Leukozyten rollen innerhalb des Blutgefäßes am Endothel entlang („rolling“). Die Haftung vermittelt dabei v.a. die Wechselwirkung von auf der Leukozytenmembran exprimierten Integrinen (β_2 -Integrin) und L-Selektin mit dem auf Endothelzellen befindlichen P-Selektin und E-Selektin. Liegt eine Entzündung in der Nähe eines Blutgefäßes vor, so werden die dortigen Endothelzellen durch proinflammatorische Cytokine wie z.B. Interleukin-1 (IL-1) oder TNF- α , die von Gewebe-Makrophagen ausgeschüttet werden, oder von bakteriellen Endotoxinen zur vermehrten Bildung von P-

²²⁹ Orth et al. 1994

²³⁰ Ramadan et al. 2006

²³¹ Aplequist und Moerman 2011

²³² Mutschler et al. 2007

²³³ Cronstein und Weissmann 1993

Selektin und E-Selektin stimuliert, was das „Rollen“ verlangsamt und die Leukozytenmembran in engeren Kontakt zur Endothelmembran bringt. Zusätzlich exprimieren stimulierte Endothelzellen vermehrt interzelluläre Adhäsionsmoleküle wie ICAM-1 (**I**ntercellular **a**hesion **m**olecule-1), ICAM-2 oder VCAM-1 (**V**ascular **c**ell **a**hesion **m**olecule-1). ICAM-1 (auch CD54 genannt), ein Glykoprotein mit einer Molekülmasse von 55.000 Da, bewirkt durch die Wechselwirkung mit dem β_2 -Integrin CD11a,b/CD18 der Leukozyten deren Adhäsion an der Endothelzellmembran. Damit wird die Migration der Leukozyten durch das Endothel ins Gewebe eingeleitet. Auch an der Migration der Leukozyten, die entweder durch die Endothelzellen selbst oder aber zwischen ihnen hindurch erfolgen kann, ist ICAM-1 beteiligt.^{234,235,236,237} Die ICAM-1-Expression in Endothelzellen kann durch verschiedenste Mediatoren bzw. Substanzen stimuliert werden, wie z.B. durch TNF- α , IL-1, IL-6, Thrombin, IFN- γ , Substanz P, Estradiol, LPS und Endothelin, aber auch durch Scherwirkungen, UV-Strahlung, oxidiertes LDL (low density lipoprotein), Phorbolester, Metallionen wie Ni²⁺ und Co²⁺ oder H₂O₂. Die unterschiedlichen Stimuli wirken an unterschiedlichen Rezeptoren und beeinflussen die Expression von ICAM-1 durch die Aktivierung verschiedener Signaltransduktionswege. Abbildung 22 gibt einen kurzen Überblick über das Geschehen.^{238,239,240}

²³⁴ Cronstein und Weissmann 1993

²³⁵ Ley et al. 2007

²³⁶ Chavakis et al. 2009

²³⁷ Van de Stolpe und Van der Saag 1996

²³⁸ Cronstein und Weissmann 1993

²³⁹ Van de Stolpe und Van der Saag 1996

²⁴⁰ Roebuck und Finnegan 1999

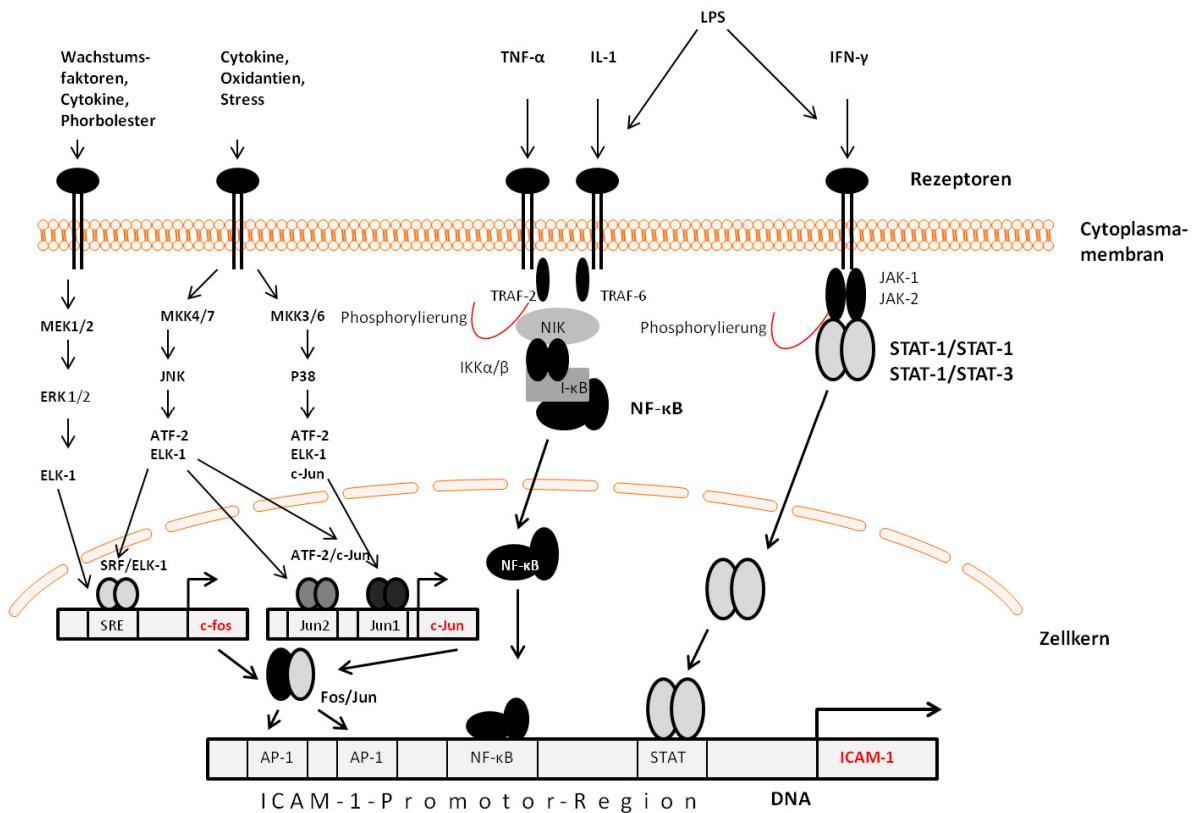


Abbildung 22: Übersicht der Signaltransduktionswege, die zu einer vermehrten ICAM-1-Expression führen. Die Cytokine TNF- α (Tumornekrosefaktor alpha) und IL-1 (Interleukin-1) aktivieren ICAM-1 über den Transkriptionsfaktor NF- κ B (nuclear factor kappa B). NF- κ B, bestehend aus den Untereinheiten p50 und p65, wird dabei über eine Phosphorylierungskaskade aus seinem Signalosomkomplex freigesetzt. Nach Translokation in den Zellkern bindet es an seine Promotorsequenz und ermöglicht so die Transkription. Das Interferon IFN- γ aktiviert ebenfalls über Phosphorylierungskaskaden sog. Januskinasen (JAK), die wiederum STAT (signal transducers and activators of transcription) phosphorylieren, die darauf als Hetero- oder Homodimere in den Kern translozieren, wo sie ebenfalls durch Bindung an den entsprechenden Promotor die Transkription von ICAM-1 aktivieren können. LPS (Lipopolysaccharid) aktiviert beide Rezeptortypen. Eine Aktivierung findet außerdem über den AP-1 (activator protein 1) und MAP-Kinase (mitogen-activated protein) Weg statt. Der Transkriptionsfaktor AP-1, welcher direkt an den ICAM-1-Promotor bindet, ist entweder ein Homodimer aus Jun oder ein Heterodimer aus Fos und Jun. Die Untereinheiten entstehen über die Aktivierung verschiedener MAP-Kinase-Signalwege (mitogen-activated protein). Abgewandelt nach Roebuck & Finnegan (1999).²⁴¹

Die wichtigsten Signalwege für die ICAM-1 Expression sind der NF- κ B-Signalweg (nuclear factor kappa B), aktiviert über TNF- α und IL-1 und der JAK/STAT-Signalweg (Januskinase/signal transducers and activators of transcription), aktiviert über IFN- γ . Dabei ist ein synergistischer Effekt von TNF- α und IFN- γ zu beobachten. TGF- β (Transforming growth factor β), IL-4, IL-10 und Glucocorticoide vermindern hingegen die ICAM-1-Expression. Der komplexe Promotor des ICAM-1-Gens auf Chromosom 19 besitzt u.a. Bindungsstellen für die Transkriptionsfaktoren NF- κ B, AP-1, STAT, C/EBP (CCAAT-enhancer-binding proteins), Ets

²⁴¹ Roebuck und Finnegan 1999

(erythroblast transformation specific Transkriptionsfaktor) und SP1 (specificity protein 1) und es hat sich gezeigt, dass ICAM-1 v.a. auf der Ebene der Transkription und weniger posttranskriptional reguliert wird.^{242,243}

Neben der physiologisch sinnvollen Entzündungsreaktion auf pathogene Mikroorganismen stellen chronische Entzündungen jedoch ein Problem dar, weil dadurch das betroffene Gewebe geschädigt werden kann. ICAM-1 ist an der Entstehung verschiedener (Autoimmun-)Erkrankungen wie z.B. Asthma, Arteriosklerose, chronisch entzündlicher Darmerkrankungen wie Colitis ulcerosa und Morbus Crohn, Psoriasis, Multipler Sklerose oder rheumatoider Arthritis involviert. Eingriffe in die von ICAM-1 beeinflusste Adhäsions-Kaskade könnte bei chronischen entzündlichen Erkrankungen von Bedeutung sein.^{244,245,246,247}

B.1.4.2 Entzündungsprozesse und die Rolle der Translokation von NF-κB

Wie oben bereits erwähnt, spielt die Translokation von Transkriptionsfaktoren vom Zytoplasma in den Zellkern eine zentrale Rolle im Entzündungsgeschehen (siehe Abbildung 22). Der induzierbare Kernfaktor NF-κB besteht aus den beiden Untereinheiten p50 (50 kDa) und p65 oder RelA (65 kDa) und liegt im Zytoplasma assoziiert mit dem regulatorischen Protein I-κB (Inhibitor of κB) in inaktiver Form vor. Durch Stimuli, wie z.B. TNF-α, IL-1 oder LPS, wird dieser Proteinkomplex aktiviert, indem sich I-κB von NF-κB löst. Dazu phosphoryliert IKK (I-κB-Kinase-Komplex) den Inhibitor I-κB, welcher daraufhin ubiquitiniert wird. Dies führt zum Abbau von I-κB durch das 26S-Proteasom und damit zur Freisetzung von NF-κB. IKK selbst kann u.a. von NIK (NF-κB-inducing Kinase) aktiviert werden.

NF-κB transloziert daraufhin in den Zellkern, bindet an entsprechende Promotoren und aktiviert damit die Transkription bestimmter Gene, wie z.B. von proinflammatorischen Cytokinen (TNF-α, IL-1β, IL-6 und IL-8), Chemokinen, Adhesionsmolekülen (ICAM, VCAM, Selektine) und pro-inflammatorischen Enzymen wie MMPs (Matrix-Metalloproteasen), COX-2 (Cyclooxygenase 2) und iNOS (induzierbare Stickstoffmonoxid (NO)-Synthase),

²⁴² Roebuck und Finnegan 1999

²⁴³ Tak und Firestein 2001

²⁴⁴ Cronstein und Weissmann 1993

²⁴⁵ Chavakis et al. 2009

²⁴⁶ Roebuck und Finnegan 1999

²⁴⁷ Van de Stolpe und Van der Saag 1996

welche alle in Entzündungsprozesse involviert sind.^{248,249,250,251,252,253,254}

Wie in Abbildung 22 gezeigt, ist auch der Transkriptionsfaktor AP-1 (activating protein 1) am Entzündungsgeschehen beteiligt.²⁵⁵ AP-1 kann z.B. als Heterodimer aus den Proteinen Jun (z.B. c-Jun) und Fos (z.B. c-Fos) vorliegen und die Transkription proinflammatorischer Gene fördern (z.B. das von ICAM-1 oder VCAM-1).^{256,257,258} Es werden auch noch weitere proinflammatorische Gene von AP-1 aktiviert, wie z.B. IL-6 oder MMP-9.^{259,260} Ein entscheidender Schritt des Wirkmechanismus von NF-κB und c-Jun ist deren Translokation vom Zytoplasma in den Zellkern. Eine mögliche Hemmung dieser Translokation durch Testsubstanzen kann immunfluoreszenzmikroskopisch untersucht werden, indem der jeweilige Transkriptionsfaktor mit fluoreszenzmarkierten Antikörpern angefärbt wird und daraufhin die Fluoreszenz, die nun proportional zur vorhandenen Menge des Transkriptionsfaktors ist, im Zytoplasma und im Zellkern stimulierter bzw. nicht stimulierter, behandelter Zellen bestimmt wird. Aus dem Verhältnis bzw. der Differenz der gemessenen Fluoreszenz in den beiden Kompartimenten lässt sich ein Transport des Transkriptionsfaktors ableiten. Abbildung 23 gibt einen stark vereinfachten, schematischen Überblick über den NF-κB-Signalweg, vom Stimulus bis zur Genexpression.

²⁴⁸ Beg et al. 1992

²⁴⁹ Beg et al. 1993

²⁵⁰ Beg und Baldwin 1993

²⁵¹ Tak und Firestein 2001

²⁵² Luo et al. 2005

²⁵³ Barnes 1997

²⁵⁴ Hayden und Ghosh 2004

²⁵⁵ Ahmad et al. 1998

²⁵⁶ Karin et al. 1997

²⁵⁷ Roebuck und Finnegan 1999

²⁵⁸ Ahmad et al. 1998

²⁵⁹ Delerive et al. 1999

²⁶⁰ Sato et al. 1993

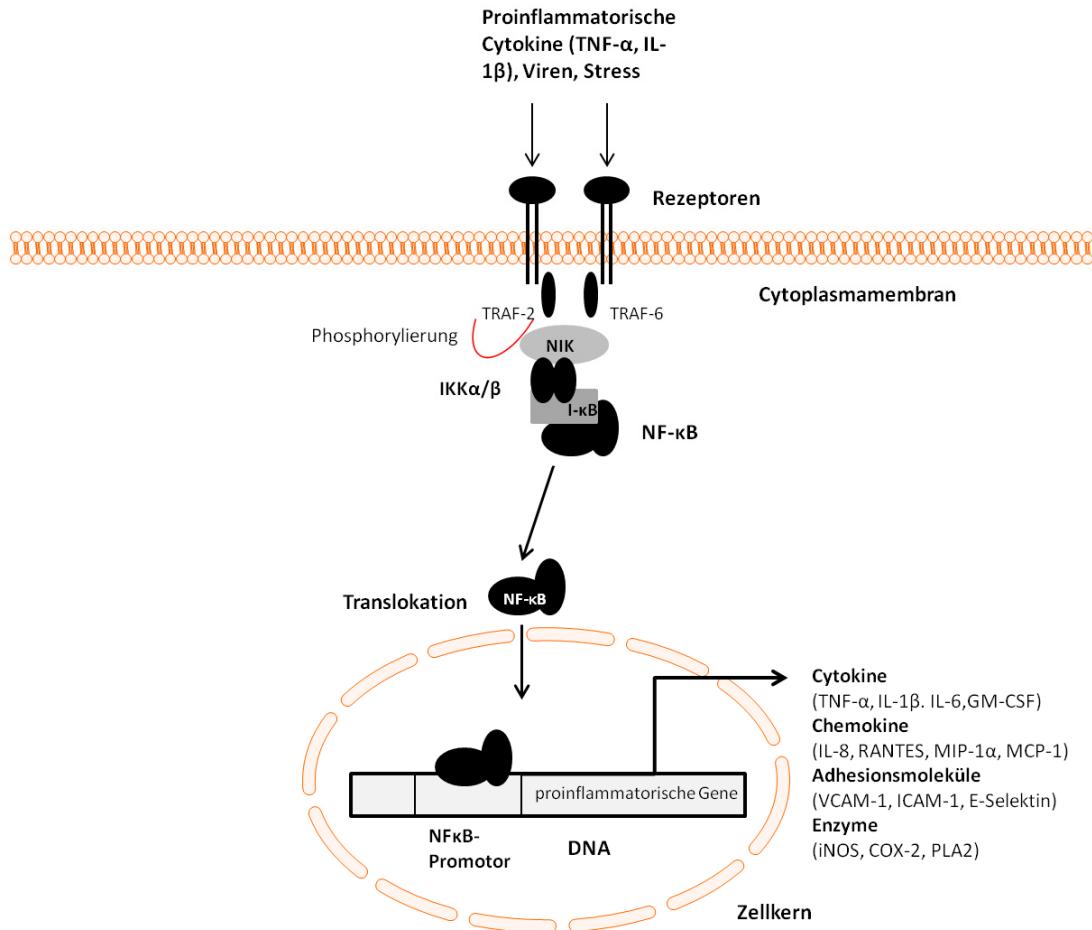


Abbildung 23: Stark vereinfachte Übersicht über den NF-κB-Weg. Durch Cytokine oder Stressfaktoren vermittelte Phosphorylierungskaskaden setzen NF-κB aus seinem inhibitorischen Komplex mit I-κB frei. Dadurch kann NF-κB in den Zellkern translozieren, wo er an Promotoren auf der DNA bindet, wodurch u.a. die Transkription proinflammatorischer Gene ausgelöst wird. TRAF (TNF receptor associated factors) NIK (NF-κB-inducing Kinase), I-κB (Inhibitor of κB), IKK (I-κB-Kinase-Komplex), TNF- α (Tumornekrosefaktor alpha), IL (Interleukin) GM-CSF (Granulocyte Macrophage Colony-Stimulating Factor), RANTES (Regulated on Activation, Normal T Cell Expressed and Secreted), MIP (Macrophage Inflammatory Protein), MCP (Monocyte Chemotactic Protein), VCAM (Vascular Cell Adhesion Molecule), ICAM (Intercellular Adhesion Molcule), iNOS (Induzierbare NO-Synthase), COX (Cyclooxygenase), und PLA₂ (Phospholipase A₂). Abgewandelt nach Luo et al. (2005).²⁶¹

Inhibitoren des NF-κB-Wegs, verhindern beispielsweise die Translokation von NF-κB in den Zellkern oder die Bindung des Transkriptionsfaktors an die DNA und vermindern damit die Transkription proinflammatorischer Gene. Das Sesquiterpenlacton Parthenolid (Abbildung 24) beispielsweise verhindert sowohl die DNA-Bindung von NF-κB, als auch dessen Freisetzung durch Hemmung von IKK.^{262,263,264}

²⁶¹ Luo et al. 2005

²⁶² Hehner et al. 1999

²⁶³ Garcia-Pineres et al. 2004

²⁶⁴ Mathema et al. 2012

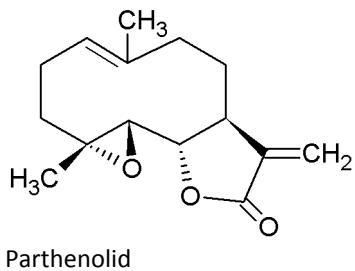


Abbildung 24: Das Germacranolid Parthenolide, ein Sesquiterpenlacton aus *Tanacetum parthenium*.

B.1.4.3 Die Rolle von NO-Radikalen im Entzündungsgeschehen

Aufgrund der sehr komplexen Zusammenhänge und seiner z.T widersprüchlichen Aufgaben ist es nicht möglich ein einfaches Bild der Rolle von NO im Organismus zu geben. Daher wird hier lediglich versucht eine knappe Übersicht darzustellen. Die Mechanismen sind bei Maus und Mensch in etwa identisch, jedoch werden hier hauptsächlich die Mechanismen für murine Makrophagen beschrieben. NO wird von NO-Synthasen (NOS) gebildet, wobei die neuronale NOS (nNOS) und die endotheliale NOS (eNOS) konstitutiv exprimiert werden, die induzierbare NOS (iNOS) jedoch, wie der Name schon sagt, induzierbar ist. Alle 3 Isoformen katalysieren die gleiche Reaktion, nämlich die Umsetzung von L-Arginin und molekularem Sauerstoff zu N^ω-Hydroxy-L-arginin und weiter zum Citrullin und NO. Je nach Lokalisation im Gewebe kommen dem NO unterschiedliche Rollen zu. Das von den Endothelzellen durch die eNOS gebildete NO dient z.B. der Gefäßrelaxation. Im Entzündungsgeschehen ist jedoch v.a. das von Makrophagen durch die iNOS gebildete NO relevant, das in hohen Konzentrationen abgegeben wird. Hohe NO-Bildungsraten durch die iNOS erfordern eine hohe extrazelluläre Argininkonzentration und die Aufnahme der Aminosäure durch die Transporter CAT1 und CAT2A (γ^+ -System), welche in Makrophagen durch die Stimulierung mit LPS aktiviert werden. Die extrazelluläre Argininkonzentration ist wiederum stark abhängig von der Aktivität der Arginase, welche Arginin zu Ornithin umsetzt und dadurch die NO-Produktion durch iNOS indirekt verringern kann. Die Bildung der iNOS wird v.a. von Cytokinen (IFN- γ , TNF- α , IL-1, IL-2, IL-10, IFN- $\alpha\beta$, MIF (migration inhibitory factor)) induziert, aber auch von LPS, einem Bestandteil der bakteriellen Zellmembran. LPS und IFN- γ wirken dabei synergistisch durch die Aktivierung zweier Promotor Regionen up-stream des iNOS-Gens. Partizipierende Transkriptionsfaktoren sind u.a. NF- κ B, AP-1, STAT-1, IRF-1 (interferon regulatory factor-1) und NF-IL-6 (nuclear factor interleukin-6). iNOS ist nur als Homodimer aktiv, dessen Bildung

Calmodulin erfordert. Stabilisiert wird das Dimer außerdem durch den Cofaktor BH₄ (Tetrahydrobiopterin) und durch das iNOS-Substrat L-Arginin. Die Dimerisierung und Aktivität von iNOS kann durch das Makrophagenprotein NAP110 und durch das ZNS-Protein Kalirin gehemmt werden. Abbildung 25 zeigt eine schematische Übersicht der Regulierung der NO Synthese in murinen Makrophagen.^{265,266,267,268}

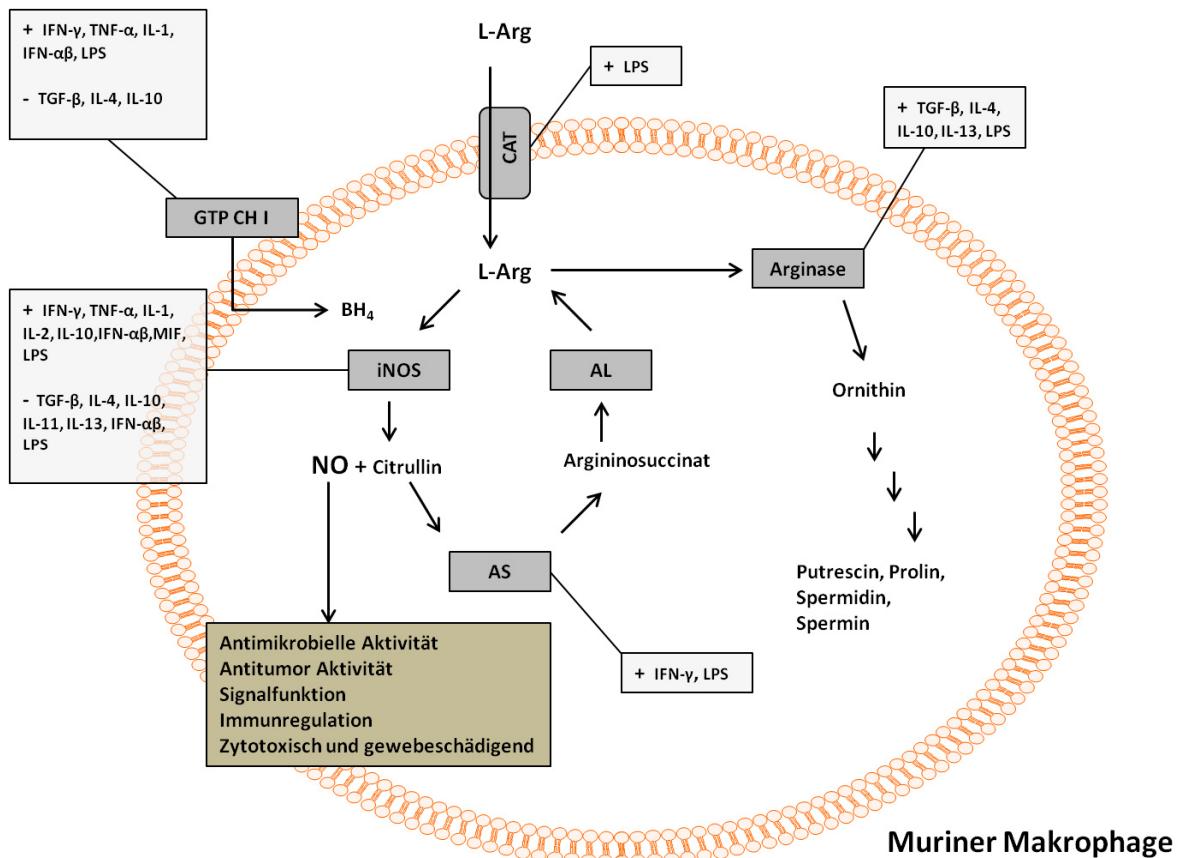


Abbildung 25: Übersicht der Regulierung der NO-Synthese durch iNOS in murinen Makrophagen. Verschiedene Cytokine, aber auch LPS, spielen eine wichtige Rolle bei der NO-Synthese. Essentiell ist der Transport von L-Arg (L-Arginin) durch CAT (cationic amino acid transporter) in das Zellinnere. L-Arginin wird durch die iNOS zu NO umgesetzt oder durch die Arginase in einer Konkurrenzreaktion zu Ornithin. Wichtig für die Stabilität der iNOS ist außerdem der Cofaktor BH₄ (Tetrahydrobiopterin). Die Vielzahl der Einflussfaktoren verdeutlicht die Komplexität des Vorgangs. AS (Argininosuccinat-Synthase), AL (Argininosuccinat-Lyase). Abgewandelt nach Bogdan (2001).²⁶⁹

NO besitzt mehrere wichtige physiologische Funktionen, wie z.B. die bereits oben erwähnte Funktion der Vasodilatation oder, in hohen Konzentrationen, die der unmittelbaren Bekämpfung von pathogenen Mikroorganismen und Tumorzellen durch Makrophagen. NO

²⁶⁵ Lowenstein et al. 1993

²⁶⁶ Nussler und Billiar 1993

²⁶⁷ Clancy et al. 1998

²⁶⁸ Bogdan 2001

²⁶⁹ Bogdan 2001

wirkt aber auch als Signalmolekül und Immunmodulator. NO kann beispielsweise in Endothelzellen die TNF- α vermittelte Aktivierung von NF- κ B hemmen und damit die Expression einiger pro-inflammatorischer Gene wie z.B. die von Adhäsionsmolekülen oder COX-2 hemmen.^{270,271} NO ist aber auch fähig NF- κ B zu aktivieren.²⁷² Hier zeigt sich die widersprüchliche Wirkweise von NO. Die Toxizität für Mikroorganismen beruht auf der mutagenen Wirkung von NO bzw. Hemmung der DNA-Reparaturmechanismen, Hemmung der Proteinbiosynthese oder Inaktivierung von Enzymen. Als weiteres bakterizides Molekül gilt Peroxynitrit (ONOO^-), das sich aus dem NO-Radikal und O_2^- bilden kann. Neben der Bekämpfung von Mikroorganismen ist die iNOS jedoch auch an Gewebeschädigung und an der Entstehung von Entzündungen und Autoimmunerkrankungen über die Produktion des zytotoxischen NO beteiligt. Eine vermehrte NO-Produktion wurde bei Krankheiten wie Sepsis, Colitis ulcerosa, Psoriasis, Arthritis, multipler Sklerose oder Typ 1 Diabetes beobachtet. NO hat aber auch anti-inflammatoryische Wirkung indem es z.B. die Adhäsion von Leukozyten hemmt. Die Wirkweisen von NO sind hoch komplex und noch wenig verstanden. So wurden etwa 200 Gene gefunden, die durch die Aktivität der iNOS reguliert werden, darunter Gene mit Bezug zur Entzündung, Infektion und Apoptose. Die jeweilige Funktion von NO ist vom zellulären Kontext und der Konzentration abhängig.^{273,274,275,276,277}

²⁷⁰ Colasanti und Persichini 2000

²⁷¹ Peng et al. 1995

²⁷² Laroux et al. 2001

²⁷³ Lowenstein et al. 1993

²⁷⁴ Nussler und Billiar 1993

²⁷⁵ Clancy et al. 1998

²⁷⁶ Bogdan 2001

²⁷⁷ Guzik et al. 2003

B.1.5 Zielsetzung

Folgende Ziele wurden im ersten Teil der vorliegenden Arbeit verfolgt:

- Die Optimierung der Isolierung von Proazulenen vor allem für das Matricin aus der Kamille und für dessen Derivate aus der Schafgarbe.
- Die pharmakologische *in vitro*-Testung bezüglich potentieller entzündungshemmender Aktivität des Proazulens Matricin und dessen Abbauprodukt Chamazulen. Dabei sollte auch versucht werden, den molekularen Wirkmechanismus näher aufzuklären.
- Die bioaktivitätsgeleitete Fraktionierung eines Schafgarbenextrakts und das Isolieren anderer potentiell wirksamer Inhaltsstoffe.

B.2 Material und Methoden

B.2.1 Präparativ-analytischer Teil

B.2.1.1 Isolierung und Identifizierung von Matricin aus Kamillenblüten

Die von einigen Autoren beschriebene Methode der Extraktion und Aufreinigung von Matricin über eine Vielzahl von Flüssig-Flüssig-Verteilungsschritten erwies sich als eher unpraktikabel, da sich beim Ausschütteln der Petroletherphase mit KHCO_3 -Lösung nur äußerst langsam eine dann unscharfe Phasentrennung einstellt.^{278,279,280} Der Schritt der Flüssig-Flüssig-Verteilung wurde daher durch chromatographische Verfahren ersetzt. Die Herstellung und Aufarbeitung des Extraktes erfolgte abgewandelt nach der von Ramadan et al. (2006) beschriebenen Methode.²⁸¹

B.2.1.1.1 Herstellung eines Kamillenblütenextrakts

Herstellung des Rohextrakts

500 g Kamillenblüten (Flores Chamomillae, PH.EUR.6.0, Caelo) wurden für 1,5 h mit 3,5 l Dichlormethan (DCM) bei Raumtemperatur (RT) unter gelegentlichem Umrühren mazeriert. Nach Abnutschen des Lösungsmittels wurde die Droge dreimal mit je 1 l DCM gewaschen. Nach Abdestillieren des Lösungsmittels am Rotationsverdampfer (35°C) blieben 19,0 g einer braun-grünen Masse (Rohexakt). Diese wurde zur weiteren Aufarbeitung in zwei gleiche Teile geteilt, die im weiteren Verlauf gleich behandelt wurden.

Entfernung hydrophiler Substanzen

Die beiden Hälften des Rohextrakts wurden jeweils in etwas DCM gelöst und unter Rühren in 300 ml Petroleumbenzin mit einer Temperatur von 40°C eingegossen. Sofort bildete sich dabei ein Niederschlag hydrophiler Substanzen. Dieser wurde über Celite® 560 und Seesand abgenutscht und verworfen. Das Lösungsmittel wurde am Rotationsverdampfer (35°C) abdestilliert. Der Rückstand wurde weiter aufgearbeitet.

²⁷⁸ Cekan et al. 1954

²⁷⁹ Stahl und Schild 1981

²⁸⁰ Schmidt und Ness 1993

²⁸¹ Ramadan et al. 2006

Entfettung des Extrakts

Der so erhaltene Rückstand wurde mit 200 ml Methanol (MeOH) versetzt und für 20 min im Ultraschallbad belassen. Es bildete sich ein unlöslicher Niederschlag aus Wachsen. Dieser wurde über wenig Celite® 560 und Seesand abgenutscht und mit wenig MeOH gespült. Der Niederschlag wurde verworfen. Das Filtrat wurde am Rotationsverdampfer (35 °C) eingeengt. Der so entfettete Extrakt wurde für die Chromatographie verwendet.

B.2.1.1.2 *Chromatographische Isolierung des Matricins*

Die Isolierung von Matricin erfolgte ausgehend vom behandelten Extrakt mit Hilfe dreier aufeinanderfolgender Flash-Chromatographie-Schritte. Beginnend mit einer Flash-Chromatographie an Kieselgel, folgte ein Wechsel der stationären Phase zu Aluminiumoxid und schließlich zu RP-18-Kieselgel. Matricinhaltige Fraktionen wurden mit Hilfe von Normalphasen-Dünnschichtchromatographie (NP-DC) identifiziert.

Dünnschichtchromatographie (DC)

Soweit nicht anders erwähnt wurden für alle Normalphasen-Dünnschichtchromatographien Kieselgelplatten (Silicagel 60, Merck) verwendet. Die mobile Phase bestand aus DCM/tBME (tert-Butylmethylether) im Verhältnis 5:1. Die Laufstrecke betrug etwa 8 cm. Nach Entwicklung der Platte wurde das verbleibende Fließmittel im Luftstrom verflüchtigt. Zur Derivatisierung wurde Anisaldehyd (AA)-Reagenz benutzt (Anisaldehyd: 0,5 ml, Essigsäure: 10 ml, Methanol: 85 ml, Schwefelsäure: 5 ml). Nach Besprühen mit AA-Reagenz wurde die Platte bei etwa 100 °C für 1-2 min erhitzt. Matricin erschien als blau-violette Bande bei einem R_F -Wert von etwa $0,3 \pm 0,08$. Der R_F -Wert schwankte bedingt durch die hohe Flüchtigkeit des Fließmittels.

Kieselgel-Flash-Chromatographie

Der entfettete Extrakt wurde in etwas MeOH gelöst und unter Abdestillieren des Lösungsmittels am Rotationsverdampfer (35 °C) an die zweifache Masse Kieselgel (Gerduran®, Si60) adsorbiert. Das so erhaltene Pulver wurde auf eine mit dem gleichen Kieselgel gefüllte Flash-Chromatographiesäule (Größe 1: 18,5 cm x 4 cm) gegeben und nach folgender Methode einer Flash-Chromatographie unterzogen (Tabelle 7):

Tabelle 7: Parameter für die Kieselgel-Flash-Chromatographie des behandelten Kamillenextraktes.

Parameter:	
Stationäre Phase	90 g Kieselgel (Gerduran® Si60, Merck)
Fließmittel	DCM/tBME 7:1
Fluss	50 ml/min
Fraktionsvolumen	20 ml

Mittels DC wurden die matricinhaltigen Fraktionen identifiziert und vereinigt. Nach Abdestillieren des Lösungsmittels am Rotationsverdampfer (35 °C) wurde der Rückstand einer Flash-Chromatographie mit Aluminiumoxid als stationärer Phase unterzogen.

Aluminiumoxid-Flash-Chromatographie

Dieser Chromatographieschritt orientierte sich an der Methode von Schmidt & Ness (1993).²⁸² Die vereinigten, matricinhaltigen Fraktionen aus der oben beschriebenen Kieselgel-Flash-Chromatographie wurden in etwas MeOH gelöst und an die zweifache Menge Al₂O₃ (neutral, Aktivitätsstufe IV) unter Abdestillieren des Lösungsmittels am Rotationsverdampfer (35 °C) adsorbiert. Das so erhaltene Pulver wurde auf eine mit Al₂O₃ (neutral, Aktivitätsstufe IV) gefüllte Flash-Chromatographiesäule (Größe 2: 12 cm x 2,8 cm) aufgegeben und nach folgender Methode chromatographisch fraktioniert (Tabelle 8).

Tabelle 8: Parameter für die Aluminiumoxid-Flash-Chromatographie der vereinigten, matricinreichen Fraktionen aus der vorangegangenen Kieselgel-Flash-Chromatographie.

Parameter:	
Stationäre Phase	65 g Al ₂ O ₃ (neutral, Aktivitätsstufe IV)
Fließmittel	DCM/MeOH 99:1
Fluss	20 ml/min
Fraktionsvolumen	5 ml

Mittels DC wurden die matricinhaltigen Fraktionen identifiziert und vereinigt. Nach Abdestillieren des Lösungsmittels am Rotationsverdampfer (35 °C) wurde der Rückstand einer RP-18-Flash-Chromatographie unterzogen.

²⁸² Schmidt und Ness 1993

RP-18-Flash-Chromatographie

Dieser Aufreinigungsschritt orientierte sich ebenfalls an der Methode von Schmidt & Ness (1993)²⁸³. Die vereinigten, matricinhaltigen Fraktionen aus der oben beschriebenen Aluminiumoxid-Flash-Chromatographie wurden in etwas MeOH gelöst und an die dreifache Masse RP-18-Kieselgel (LiChroprep®, Merck) unter Abdestillieren des Lösungsmittels am Rotationsverdampfer (35 °C) adsorbiert. Das so erhaltene Pulver wurde auf eine mit RP-18-Kieselgel befüllte Flash-Chromatographiesäule (Größe 2) aufgegeben und wurde nach folgender Methode chromatographisch fraktioniert (Tabelle 9):

Tabelle 9: Parameter für die RP-18-Flash-Chromatographie der vereinigten, matricinreichen Fraktionen aus der vorangegangenen Aluminiumoxid-Flash-Chromatographie.

Parameter:	
Stationäre Phase	30 g RP-18-Kieselgel (LiChroprep®, Merck)
Fließmittel	ACN/MeOH/H ₂ O 12 : 38 : 50
Fluss	20 ml/min
Fraktionsvolumen	5 ml

Mittels DC wurden die matricinhaltigen Fraktionen identifiziert und vereinigt. Nach Abdestillieren der organischen Lösungsmittel Acetonitril (ACN) und Methanol (MeOH) wurde die verbleibende Wasserphase (ca. 30 ml) dreimal mit je 30 ml Diethylether (Et₂O) ausgeschüttelt und die Etherphasen vereinigt. Nach Abdampfen des Lösungsmittels im Stickstoffstrom blieben weiß-gelbe Kristalle zurück. Die Vollständigkeit der Extraktion der Wasserphase wurde durch DC kontrolliert.

B.2.1.1.3 Identifizierung des Matricins

Die Identifizierung des isolierten Matricins erfolgte durch die durch Dünnschichtchromatographie ermittelten R_F-Werte und der beobachteten Farbreaktionen mit Sprühreagenzien bzw. durch Massenspektrometrie und ¹H-NMR-Spektroskopie und dem Vergleich der jeweiligen Ergebnisse mit entsprechenden Literaturwerten.

²⁸³ Schmidt und Ness 1993

Dünnschichtchromatographische Identifizierung

Zur Identifizierung mittels DC wurden zwei in der Literatur beschriebene Methoden gewählt (vgl. auch Tabelle 17).^{284,285,286,287,288} Als Fließmittel wurde entweder DCM/tBME 5:1 oder DCM/Aceton 9:1 verwendet. Es wurden jeweils zwischen 5-10 µl einer methanolischen Matricinlösung einer Konzentration von etwa 0,05 mg/ml aufgetragen. Die Laufstrecke betrug etwa 8 cm. Nach Besprühen mit dem jeweiligen Sprühreagenz wurden die DC-Platten 2-5 min bei etwa 100 °C erhitzt, bis sich keine Änderung der Farbreaktion mehr ergab. Die mit Essigsäure-Phosphorsäure-Reagenz (EP-Reagenz: 4-Dimethylaminobenzaldehyd: 0,25 g, Essigsäure: 50g, 85%Phosphorsäure: 5 g, Wasser: 20 ml) besprühten Platten wurden nach dem Erhitzen zur Farbverstärkung zusätzlich mit Ethanol (EtOH) besprüht.²⁸⁹ Die derivatisierten Platten wurden unter Weißlicht mittels CAMAG-Reprostar 3 dokumentiert.

Dünnschichtchromatographie-Massenspektrometrie (DC-MS)

Zur Identifizierung der DC-Banden, wurde ein Massenspektrum der entsprechenden Bande aufgenommen. Dazu wurden 30 µl einer methanolischen Matricinlösung einer Konzentration von etwa 0,05 mg/ml auf eine NP-DC (Bandenlänge 1 cm) aufgetragen (CAMAG Linomat 5) und entwickelt (Fließmittel DCM/tBME 5:1, Laufhöhe: 8 cm, keine Kammersättigung). Die Platte wurde nicht derivatisiert, die Banden unter UV-Licht (254 nm) mit Bleistift markiert und mit Hilfe einer DC-MS Kopplung (CAMAG TLC-MS Interface, Eluent: MeOH + 5mM NH₄OAc/H₂O 80:20) in das Massenspektrometer (ThermoQuest Finnigan, TSQ 7000) injiziert. Es wurde ein niedrig aufgelöstes Elektrospray-Ionisations (ESI)-Massenspektrum aufgenommen.

¹H-NMR-Spektroskopie

Zur Aufnahme eines Protonenspektrums wurden etwa 10 mg des isolierten Matricins in 700 µl deuteriertem Methanol (CD₃OD) gelöst, in ein NMR-Röhrchen (Norell 507-HP) überführt und an einem 300 MHz NMR-Spektrometer (Avance 300, Bruker BioSpin GmbH) mit 64 Scans bei 295 Kelvin vermessen. Die Auswertung erfolgte mit dem Programm MestReNova 6.0.2-5475 (Mestrelab Research).

²⁸⁴ Ramadan 2005

²⁸⁵ Glasl et al. 2001b

²⁸⁶ Glasl et al. 1999a

²⁸⁷ Glasl et al. 2001a

²⁸⁸ Glasl et al. 1999b

²⁸⁹ Banh-Nhu et al. 1979

B.2.1.1.4 Reinheitsbestimmung des Matricins

Die Reinheitsbestimmung des isolierten Matricins erfolgte mittels analytischer Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (HPLC) (Hitachi Elite LaChrom, VWR) mit UV-Detektor. Als Probenlösung diente eine methanolische Matricinlösung der Massenkonzentration 0,1 mg/ml. Die verwendeten Lösungsmittel hatten HPLC-Qualität und wurden vor der Messung 20 min im Ultraschallbad entgast. Die Chromatogramme wurden bei einer Wellenlänge von 242 nm ausgewertet und die Bestimmung der chromatographischen Reinheit erfolgte mit Hilfe der Software EZchromElite® prozentual nach dem Verfahren der Normalisierung. Die Messungen wurden als Triplikate durchgeführt. Tabelle 10 beschreibt die Parameter der HPLC-Analyse.

Tabelle 10: HPLC-Parameter zur Reinheitsbestimmung des Matricins.

Parameter:	
Verwendete Säule	Hibar® 250-4, Purospher® STAR, RP-18e, 5 µm (Merck)
Fließmittel	ACN/MeOH/H ₂ O 12:38:50, isokratisch
Injektionsvolumen	10 µl
Ofentemperatur	30 °C
Flow	1,0 ml/min

B.2.1.2 Chamazulen

Chamazulen ist nicht genuin in Kamillenblüten enthalten sondern entsteht u.a. bei der Wasserdampfdestillation aus dem Proazulen Matricin unter Abspaltung der Acetylgruppe, Eliminierung von Wasser und schließlich einer Decarboxylierungsreaktion. Eine Zwischenstufe ist dabei die Chamazulencarbonsäure (Abbildung 11). Durch Ausbildung eines delokalisierten, π-Elektronensystems absorbieren Chamazulencarbonsäure und Chamazulen im langwelligen Bereich, wodurch die tiefblaue Färbung zu erklären ist.²⁹⁰ Chamazulen ist bei RT flüssig. Das für die pharmakologischen Untersuchungen benutzte Chamazulen wurde von der Firma PhytoLab GmbH & Co. Kg (Deutschland) bezogen und hatte eine Reinheit von 97% (GC). Es wurde eine ethanolische (EtOH, p.a.) Stammlösung der Konzentration 100 mM hergestellt.

²⁹⁰ Hänsel und Sticher 2007

B.2.1.3 Aktivitätsgeleitete Fraktionierung eines Schafgarbenblütenextrakts

B.2.1.3.1 Herstellung eines Schafgarbenblütenextrakts

Herstellung des Rohextrakts

250 g Schafgarbenblüten (Flores Millefolii gerebelt, Caelo) wurden mit etwa dem gleichen Volumen Seesand vermischt und, auf 2 Portionen verteilt, in einer Glassäule mit insgesamt 8 l DCM bei RT perkoliert. Die Verweildauer von je einem Liter Lösungsmittel pro Durchlauf betrug etwa 10 min. Nach dieser Zeit wurde das Lösungsmittel mit Hilfe einer Wasserstrahlpumpe abgesaugt. Das Lösungsmittel wurde bei max. 35 °C am Rotationsverdampfer bis zur Gewichtskonstanz eingeengt. Der braun-grüne, ölige Rückstand hatte eine Masse von 19,4 g.

Entfettung des Rohextrakts

Der so erhaltene Rohextrakt wurde mit 250 ml MeOH versetzt und für 20 min im Ultraschallbad belassen. Es bildete sich ein unlöslicher Rückstand, der mit Hilfe eines Papierfilters (Sartorius) abgetrennt wurde. Der Filter wurde mit etwas MeOH gespült. Der Rückstand wurde verworfen. Das Filtrat ergab nach Abdestillieren des Lösungsmittels den entfetteten Rohextrakt.

B.2.1.3.2 Fraktionierung des Schafgarbenblütenextrakts

Der entfettete Extrakt wurde auf 6 Portionen aufgeteilt und jeweils einer Flash-Chromatographie mit Kieselgel als stationärer Phase unterzogen. Dazu wurde der Extrakt in etwas MeOH gelöst und unter Abdestillieren des Lösungsmittels am Rotationsverdampfer (35 °C) und einem Kieselgel-Extraktverhältnis von 2:1 an Kieselgel (Gerduran® Si60) adsorbiert. Das so erhaltene Pulver wurde auf eine mit Kieselgel gefüllte Flash-Chromatographiesäule (Größe 1) gegeben und nach folgender Methode chromatographisch fraktioniert (Tabelle 11).

Tabelle 11: Parameter der Kieselgel-Flash-Chromatographie zur Fraktionierung des behandelten Schafgarbenblütenextrakts.

Parameter:	
Stationäre Phase	90 g Kieselgel (Gerduran® Si60)
Fließmittel A	DCM
Fließmittel B	Aceton
Gradient:	
t = 0	0% B
t = 60 min	20% B
t = 70 min	100% B
t = 85 min	100% B
Fluss	30 ml/min
Fraktionsvolumen	25 ml

Die durch die einzelnen Flash-Chromatographiedurchläufe erhaltenen Fraktionen wurden mittels DC auf Ähnlichkeit bzw. Übereinstimmung der Zusammensetzung überprüft. Maximal ähnliche Fraktionen nach Derivatisierung mit AA-Reagenz wurden vereinigt.

B.2.1.4 Isolierung von 8-Desacetyl-8-angeloyl-4-epi-matricin

B.2.1.4.1 Herstellung eines Schafgarbenkrautextrakts

200 g Schafgarbenkraut der Firma Bombastus wurden in einer Glassäule mit 1,3 l Et₂O (mit 5 Tropfen 25% NH₃-Lösung versetzt) für 1 h mazeriert. Nach Abnutzen des Lösungsmittels wurde das Drogenmaterial noch zweimal mit je 1 l und einmal mit 0,7 l Et₂O (jeweils versetzt mit einigen Tropfen NH₃-Lösung) gewaschen. Dazu wurde das Drogenmaterial mit Lösungsmittel bedeckt, etwa 5 min mazeriert und dann abgenutscht (gesamt 4 l Et₂O). Mittels DC (NP-DC, Fließmittel: DCM/Aceton 9:1, EP-Reagenz, Erhitzen und anschließend Besprühen mit EtOH) wurde auf Vollständigkeit der Extraktion der Proazulene kontrolliert. Nach Abdestillieren des Lösungsmittels bei 35 °C Badtemperatur blieb eine zähe, braun-grüne Masse (4,1 g) zurück (Rohextrakt).

Entfettung des Schafgarbenkrautextrakts

Der Rohextrakt wurde mit 200 ml MeOH versetzt und für 20 min im Ultraschallbad belassen. Es bildete sich ein unlöslicher Rückstand. Dieser wurde über Celite® 560 und Seesand abgenutscht. Das Filtrat ergab nach Abdestillieren des Lösungsmittels am Rotationsverdampfer (35 °C) den entfetteten Extrakt, der zur Chromatographie verwendet wurde.

B.2.1.4.2 Chromatographische Aufarbeitung des Schafgarbenkrautextrakts

Kieselgel-Säulenchromatographie

Zur ersten Fraktionierung wurde der entfettete Extrakt in 2 Portionen geteilt und über eine offene Säule chromatographiert. Tabelle 12 gibt die entsprechenden Parameter wieder.

Tabelle 12: Parameter der Kieselgel-Säulenchromatographie des entfetteten Schafgarbenkrautextrakts aufgeteilt auf zwei Durchgänge B-K1 und B-K2.

Parameter:	B-K1	B-K2
Extraktmasse	1,6 g	1,7 g
Säule	50 cm Länge, Ø 3 cm	Länge 50 cm, Ø 3 cm
Stationäre Phase	116 g Kieselgel (Gerduran® Si60)	121 g Kieselgel (Gerduran® Si60)
Fließmittel	DCM/Aceton 9:1 + 5 Tropfen 25% NH ₃ -Lösung/l	DCM/Aceton 9:1 + 5 Tropfen 25% NH ₃ -Lösung/l
Fließgeschwindigkeit	2,0 ml/min	2,1 ml/min
Fraktionsvolumen	4 ml	5,5 ml
Totvolumen	85 ml	75 ml

Nach der in Tabelle 12 beschriebenen Chromatographie wurde die jeweilige Säule mit 400 ml EtOAc und danach mit 400 ml MeOH gespült. Ähnliche Fraktionen wurden mittels NP-DC (DCM/Aceton 9:1, EP-Reagenz, Erhitzen und anschließend Besprühen mit EtOH) identifiziert, die entsprechenden Fraktionen von B-K1 und B-K2 zu B-K vereinigt und das Lösungsmittel am Rotationsverdampfer bei 30 °C Badtemperatur abdestilliert.

Aluminiumoxid-Säulenchromatographie

Zur weiteren Auftrennung der Fraktion B-KIV der Kieselgel-Säulenchromatographie wurde eine Aluminiumoxid-Säulenchromatographie mit einer offenen Säule und den in Tabelle 13 beschriebenen Parametern durchgeführt.

Tabelle 13: Parameter der Aluminiumoxidsäule (A) zur weiteren Auftrennung der Fraktion B-KIV aus der Kieselgel-Säulenchromatographie.

Parameter:	
Extraktmasse Fraktion B-KIV	120 mg
Säule	Länge 50 cm, Ø 1,2 cm
Stationäre Phase	55,6 g Al ₂ O ₃ (N, Aktivitätsstufe IV)
Fließmittel	Hexan/Aceton 7:3, + 5 Tropfen 25% NH ₃ -Lösung/l
Fließgeschwindigkeit	0,5 ml/min
Fraktionsvolumen	1 ml
Totvolumen	18,5 ml

Die Auftrennung wurde mittels NP-DC (Hexan/Aceton 6:4, EP-Reagenz, Erhitzen und anschließend Besprühen mit EtOH) kontrolliert, die entsprechenden Fraktionen vereinigt und das Lösungsmittel am Rotationsverdampfer bei 30 °C Badtemperatur abdestilliert.

Semi-präparative HPLC

Zur weiteren Aufreinigung der Fraktionen der Aluminiumoxid-Säulenchromatographie wurde eine semi-präparative RP-18 HPLC (Varian, Prostar mit UV-Detektor) mit den in Tabelle 14 beschriebenen Parametern durchgeführt. Die verwendeten Lösungsmittel hatten HPLC-Qualität und wurden vor der Messung 20 min im Ultraschallbad entgast.

Tabelle 14: Parameter zur Aufreinigung der Fraktion B-KIV-All mit der semipräparativen HPLC.

Parameter:	Einstellungen:
Säule	Varian, Dynamax 250x10 mm, Pursuit XRs 5 C18
Injectivolumen	je 50 µl (3x)
Probemenge	9 mg (je 3 mg gelöst in MeOH, 3x)
Temperatur	RT (20 °C)
Fließmittel A	H ₂ O
Fließmittel B	ACN/MeOH 12:38
Gradient:	
t = 0	50% B
t = 45 min	100% B
t = 50 min	100% B
t = 52 min	50% B
t = 45 min	50% B
Flow	4 ml/min
λ	238 nm

Die ähnlichen Fraktionen der 3 Durchläufe wurden durch den UV-Detektor ermittelt, vereinigt und die organische Lösungsmittelphase am Rotationsverdampfer bei 30 °C Badtemperatur abdestilliert. Die wässrige Phase wurde wie beim Matricin beschrieben mit Et₂O extrahiert und das Lösungsmittel abdestilliert (vgl. B.2.1.1).

B.2.1.4.3 Identifizierung von 8-Desacetyl-8-angeloyl-4-epi-matricin

DC-MS

Zur Identifizierung der EP-positiven (proazulenhaltigen) DC-Banden des Schafgarbenkraut-extrakts, wurde ein Massenspektrum der entsprechenden Bande aufgenommen. Dazu wurden 3 Banden a 15 µl einer Et₂O-Lösung des Rohextrakts auf eine NP-DC (Bandenlänge

1,2 cm) aufgetragen (CAMAG Linomat 5) und entwickelt (Fließmittel: DCM /Aceton 9:1, Laufhöhe: 8 cm, keine Kammersättigung). Eine Bande wurde von der Platte abgetrennt, mit EP-Reagenz derivatisiert und mit der nicht derivatisierten verglichen. Die zu analysierende Bande wurde mit einem Spatel von der nicht derivatisierten Platte gekratzt in MeOH aufgenommen und der Überstand mit einem Spritzenvorsatzfilter (Titan Syringe Filter, RC, 0,2 µm, Sun Sri) filtriert. Von der Probe wurde ein Elektronenstoßionisations-Massenspektrum (EI-MS) (70 eV) vermessen (Finnigan, MAT SSQ 710 A).

Massenspektrometrie

Von der durch semipräparative HPLC aufgereinigten Fraktion B-KIV-AII-HPLC wurde ein hochauflöste ESI-Massenspektrum aufgenommen (Agilent, Q-TOF 6540 UHD) und die Summenformel bestimmt.

¹H-NMR-Spektroskopie

Die Fraktion B-KIV-AII-HPLC wurde in ca. 600 µl CD₃OD gelöst und ein ¹H-Spektrum 600 MHz Spektrometer (Avance III 600 Kryo, Bruker) bei 295 Kelvin vermessen. Die Auswertung erfolgte mit dem Programm MestReNova 6.0.2-5475 (Mestrelab Research).

B.2.2 Pharmakologischer Teil

B.2.2.1 Degradationskontrolle von Matricin in Zellkulturmedium

B.2.2.1.1 Wiederfindung von Matricin in Zellkulturmedium

Um bei der nachfolgenden Degradationskontrolle eine ausreichend große Wiederfindung von Matricin aus Zellkulturmedium nach der Aufarbeitung für die HPLC-Analyse zu gewährleisten, wurde folgender Versuchsansatz gewählt:

Es wurden je 500 µl Matricinlösung einer Konzentration von je 100 µM mit PBS (A) und ECGM (Endothelial Cell Growth Medium mit Supplements) (B) hergestellt. Dabei wurde die gleiche Matricin Stammlösung verwendet (100 mM, DMSO). A und B wurden zur Proteinfällung jeweils mit 500 µl eiskaltem MeOH versetzt, 2 min intensiv geschüttelt und 10 min bei 4 °C und 14000 U/min in 1,5 ml Reaktionsgefäßen (Eppendorf) zentrifugiert. Vom Überstand wurden je 300 µl abgenommen und 60 min bei 4 °C und 14000 U/min durch Nanoseps zentrifugiert. Die so filtrierten, klaren Lösungen von A und B wurden in Duplikaten

mit der analytischen HPLC mit UV-Detektor (Hitachi Elite LaChrom, VWR) mit der Methode der Reinheitsbestimmung von Matricin (Tabelle 10) vermessen und die Peak-Flächen von Matricin in den Proben A und B verglichen.

B.2.2.1.2 *Degradationskontrolle*

Voraussetzung für eine erfolgreiche Degradationskontrolle war die oben beschriebenen Wiederfindung von Matricin in ECGM. Um festzustellen, ob Matricin unter Zellkulturbedingungen stabil ist und somit als wirksames Prinzip gelten kann, wurde eine Degradationskontrolle in ECGM durchgeführt, angelehnt an die bei Knuth (2013) beschriebene Methode.²⁹¹ Dazu wurden in 6 Wells einer 24 well-Platte je 500 µl Matricin-ECGM-Lösung der Konzentration 100 µM gegeben und im Zellinkubator unter Zellkulturbedingungen (37 °C, 5% CO₂-Konzentration) inkubiert. Nach 0, 4, 8, 12, 24 und 30 h wurden je 400 µl Proben entnommen und zur Proteinfällung mit 400 µl eiskaltem MeOH versetzt, 2 min intensiv geschüttelt und 10 min bei 4 °C und 14000 U/min in 1,5 ml Reaktionsgefäß (Eppendorf) zentrifugiert. Vom Überstand wurden je 300 µl abgenommen und 20 min bei 4 °C und 14000 U/min durch Nanoseps zentrifugiert. Die so erhaltenen Lösungen wurden mittels analytischer HPLC mit UV-Detektor (Hitachi Elite LaChrom, VWR) mit der Methode der Reinheitsbestimmung von Matricin (Tabelle 10) vermessen und die Peak-Flächen von Matricin in den jeweiligen Proben bestimmt. Die Peakfläche zum Zeitpunkt 0 wurde dabei als 100% gesetzt. Die Degradationskontrolle wurde dreimal unabhängig voneinander wiederholt und die Mittelwerte aus den 3 ermittelten Werten der jeweiligen Zeitpunkte gebildet.

B.2.2.2 Pharmakologische Tests mit HMEC-1

B.2.2.2.1 *Allgemeines zu HMEC-1*

Für die immunfluoreszenzmikroskopische Untersuchung der Translokation von NFκB, für den ICAM-1- und den MTT-Assay wurde die von Ades et al. (1992) etablierte HMEC-1-Zelllinie (**human microvascular endothelial cells**) verwendet. Die Zellen wurden dankenswerter Weise von Dr. E. Ades und F. J. Candel (CDC, USA) und Dr. T. Lawley (Emory University, USA) zur Verfügung gestellt. Bei dieser Zelllinie handelt es sich um humane, dermale, mikrovaskuläre

²⁹¹ Knuth 2013

Zellen, die durch Transfektion mit einem PBR-322-Plasmid, welches ein Genprodukt des Simian-Virus 40 A enthielt, immortalisiert wurden. Diese Zellen haben laut den Autoren eine Lebensspanne über 95 Passagen hinaus, ohne Zeichen der Seneszenz zu zeigen, wohingegen nicht-transfizierte Zellen nach 8-10 Passagen an Vitalität deutlich abnehmen. Außerdem ist die Kultur von HMEC-1 in Medium ohne humanem Serum möglich. Die transfizierte HMEC-1 Zelllinie zeigt die morphologischen, phenotypischen und funktionellen Eigenschaften normaler HMEC, wie u.a. die Expression des Zelladhäsionsmoleküls ICAM-1, welche durch die Gabe von TNF- α gesteigert werden kann.²⁹²

B.2.2.2.2 *Allgemeines zur Kultur von HMEC-1*

Soweit nicht anders erwähnt, galten für alle Arbeiten mit HMEC-1 folgende Parameter:

Alle Arbeiten wurden unter sterilen Bedingungen durchgeführt (Sterilbank HERA SAFE KS 12 1/PE AC, Thermo Scientific). Die Kultivierung der Zellen erfolgte in einem Brutschrank (CO₂-Incubator NU-5500E, Nuaire) bei 37 °C, 5% CO₂ und gesättigter Luftfeuchtigkeit. Als Kulturflaschen dienten Cell Culture Flask 75 cm², 250 ml, PS, steril der Firma Greiner (Germany). Alle Flüssigkeiten, die mit den Zellen in Berührung kamen, wurden auf 37 °C vorgewärmt. Zur besseren Adhäsion der Zellen wurden die Flaschen vor dem Aussäen mit Kollagen beschichtet („coating“). Dazu wurden 20 ml Collagen-Lösung (0,01 mg/ml) in die Flasche gegeben und 20 min im Brutschrank inkubiert. Danach wurde die Lösung abgesaugt und die Flasche für die Zellkultur verwendet.

B.2.2.2.3 *Zellkultur von HMEC-1*

Auftauen von HMEC-1

Zur Inkulturnahme eingefrorener HMEC-1-Zellen wurden die Zellen zügig aufgetaut und vollständig in 10 ml ECGM überführt. Die Zellsuspension wurde bei 1000 U/min 5 min und RT zentrifugiert und der Überstand abgesaugt. Das Zellpellet wurde in 10 ml ECGM resuspendiert und in eine, mit Collagen beschichtete, Kulturflasche überführt und mit weiteren 10 ml ECGM versetzt. Nach 24 h Kultivierung wurde das Medium abgesaugt und

²⁹² Ades et al. 1992

durch 20 ml frisches ECGM ersetzt. Nach weiteren 24 h konnten die nun konfluent gewachsenen Zellen passagiert werden.

Passagieren von HMEC-1

Konfluent gewachsene HMEC-1 wurden zweimal mit je 20 ml PBS gewaschen (PBS zugeben, schwenken und absaugen). Zum Ablösen der Zellen wurden 4 ml Trypsin/EDTA-Lösung zugegeben und für 4 min im Brutschrank inkubiert. Durch leichtes Klopfen wurden die Zellen vom Boden abgelöst. Anschließend wurden 20 ml Abstoppmedium (500 ml M199 + 50 ml hitzeaktiviertes FCS) zugegeben und die gesamte Zellsuspension in ein 50 ml Zentrifugenrörchen überführt. Die Kulturflasche wurde nochmals mit 20 ml Abstoppmedium gespült und die Suspension ebenfalls ins Zentrifugenrörchen überführt. Nach 5 min Zentrifugieren bei 1000 U/min und RT wurde der Überstand abgesaugt und die Zellen in einer definierten Menge ECGM resuspendiert (bei 1:8 Splitting in 8 ml, bei 1:10 Splitting in 10 ml ECGM). 1 ml der Suspension wurde in eine neue Kulturflasche gegeben, in der 19 ml ECGM vorgelegt waren. Die Zellen wurden im Rhythmus von 2 bzw. 3 Tagen (1:8 bzw 1:10 splitting) passagiert. Die Zellen wurden bis etwa zur Passage 12 für die Zell-Assays verwendet.

Zellzahlbestimmung und Aussäen von HMEC-1

Die beim Passagieren der Zellen übrige Zellsuspension wurde zum Ansäen von Assays verwendet. Sollte eine bestimmte Zellzahl in einem Versuch eingesetzt werden, so wurde vor der Ansaat die Anzahl der Zellen in der nach dem Ernten erhaltenen Zellsuspension ermittelt. Hierzu wurde die Zellzahl pro Milliliter nach Anfärben mit Trypanblau-Lösung mit einer Thoma-Zählkammer bestimmt. Danach wurde die gewünschte Zellzahl pro Milliliter durch Verdünnen mit ECGM erreicht.

B.2.2.2.4 ICAM-1-Assay

Hintergrund und Bezug zur Entzündungshemmung, der ICAM-1-Assay als Entzündungsmodell

Zur Testung von Substanzen auf potentiell anti-inflammatoryische Eigenschaften ist u.a. der mit HMEC-1 Zellen *in vitro* durchgeführte ICAM-Assay geeignet. Dabei werden HMEC-1 zur

Expression von ICAM-1 stimuliert, was durch eine Vielzahl von Mediatoren geschehen kann wie z.B. TNF- α , LPS oder IFN- γ .^{293,294,295} Die Zellen werden gemeinsam mit Testsubstanzen inkubiert und das Maß der ICAM-1-Expression durch Zugabe eines fluoreszenzmarkierten Antikörpers gegen ICAM-1 durchflusszytometrisch bestimmt. Die Fähigkeit einer Substanz die ICAM-1-Expression zu vermindern kann als entzündungshemmende Eigenschaft angesehen werden, da ICAM-1 eine zentrale Rolle v.a. auch bei chronischen Entzündungen spielt (vgl. B.1.4.1). Der detaillierte pharmakologische Mechanismus einer beobachteten ICAM-1-Expressionshemmung wird durch den ICAM-Assay jedoch nicht geklärt.

Praktische Durchführung

Versuchsdesign

In jedem Experiment wurde eine Negativkontrolle, die nur mit Medium inkubiert und nicht (mit TNF- α , IFN- γ oder LPS) stimuliert wurde, mit vermessen. Alle anderen Wells wurden stimuliert. Als Aktivierungs-Kontrolle diente eine Gruppe, die nur mit Medium inkubiert und mit dem jeweiligen Stimulus behandelt wurde. Die ICAM-1 Expression dieser Gruppe wurde als 100% gesetzt. Als Positivkontrolle für die Hemmung der ICAM-1 Expression dienten Zellen die mit einer 5 μ M Parthenolid-ECGM-Lösung behandelt wurden. Eine Lösungsmittelkontrolle (maximale verwendete Lösungsmittelkonzentration in ECGM) wurde durchgeführt, um einen möglichen Einfluss des Lösungsmittels auf die ICAM-1 Expression ausschließen zu können. Wenn nicht anders erwähnt, wurde jede Konzentration einer Testsubstanz je Experiment in Duplicates vermessen und jedes Experiment wurde dreimal unabhängig voneinander mit jeweils unterschiedlichen Zellpassagen wiederholt.

Aussäen der Zellen und Substanzaufgabe

Konfluent gewachsene Zellen einer Kulturflasche wurden wie oben beschrieben geerntet und die Zellen in 9 ml ECGM resuspendiert. 3 ml davon wurden mit 10 ml ECGM auf 13 ml verdünnt und 500 μ l der verdünnten Suspension pro Well einer 24-well-Platte gegeben. Die Zellen wurden 48 h bis zur Konfluenz im Brutschrank inkubiert. Vor der Substanzaufgabe wurde das Medium abgesaugt und mit etwa 200-300 μ l PBS gewaschen. Die Verdünnungen

²⁹³ Roebuck und Finnegan 1999

²⁹⁴ Chan und Murphy 2003

²⁹⁵ Park et al. 2009

der Testsubstanzen wurden kurz vor der Zugabe frisch mit ECGM hergestellt und jeweils 500 µl davon pro Well auf die Zellen gegeben. Es wurden Konzentrationen von 1, 10, 25, 50 und 75 µM oder bei Extrakten in Konzentrationen zwischen 1-100 µg/ml getestet. Nach 30 min Vorinkubation im Brutschrank wurde mit TNF-α, LPS oder IFN-γ stimuliert.

Stimulierung der ICAM-1-Expression

Für die Stimulierung mit TNF-α wurden pro Well 5 µl einer TNF-α-Lösung (1 µg/ml TNF-α in ECGM, frisch hergestellt) gegeben. Dies ergab eine finale TNF-α-Konzentration von 10 ng/ml. Für die Stimulierung mit LPS wurden pro Well 2,5 µl einer LPS-Lösung in PBS der Konzentration 200 µg/ml gegeben. Dies ergab eine LPS-Konzentration von 1 µg/ml.

Für die Stimulierung mit IFN-γ wurden pro Well 5 µl einer IFN-γ-Lösung in PBS der Konzentration 4 µg/ml gegeben. Dies ergab eine IFN-γ-Konzentration von 40 ng/ml. Nach Stimulierung wurden die Zellen weitere 24 h im Brutschrank inkubiert. Die durch die Zugabe der Aktivierungslösungen auftretende Verdünnung und der dadurch entstehende Fehler von maximal 1% wurden vernachlässigt.

Aufarbeitung der Zellen für die FACS-Analyse

Nach 24 h Stimulierung wurde das Medium abgesaugt und die Zellen mit 200-300 µl PBS gewaschen. Zum Ablösen der Zellen wurden je Well 200 µl Trypsin/EDTA-Lösung zugegeben und für 4 min im Brutschrank inkubiert. Zur Verbesserung des Ablösevorgangs wurde die Suspension mit der Pipette mehrmals eingesaugt und kräftig in das Well ausgestoßen. Die Suspension wurde anschließend in ein FACS-Röhrchen überführt, in das zum Fixieren der Zellen 100 µl einer 10% Formaldehydlösung vorgelegt waren. Die Lösungen wurden intensiv vermischt (Vortexmixscher) und für 15 min bei RT inkubiert. Nach Zugabe von 1 ml PBS und erneutem Vortexen, wurden die Lösungen bei 1200 U/min 5 min bei RT zentrifugiert und daraufhin der Überstand abgekippt. In das verbliebene Restvolumen wurden pro Röhrchen 5 µl einer Lösung des fluoreszenzmarkierten (FITC, Fluorescein-Isothiocyanat) Mausantikörpers IgG1 gegen humanes CD54 (ICAM-1) (Firma Biozol) der Konzentration 0,1 mg/ml gegeben, das Ganze gevortext und für 20 min im Dunkeln bei RT inkubiert. Zur Entfernung überschüssigen Antikörpers wurde 1 ml PBS zugegeben. Nach Vortexen und Abzentrifugieren (1200 U/min 5 min bei RT) wurde der Überstand abgekippt und die Zellen

in 400 µl PBS aufgenommen. Nach erneutem intensivem Vortexen wurden die Zellsuspensionen am FACS (FacscaliburTM, Becton Dickinson, USA) vermessen.

FACS-Analyse

Zur Ermittlung der ICAM-1-Expression der Zellen wurde mittels FACS (**F**luorescence **A**ctivated **C**ell **S**orting) die Fluoreszenz der an ICAM-1 gebundenen, fluoreszenzmarkierten Antikörper jeder Zelle durchflusszytometrisch gemessen. Um eine Auswertung von z.B. Zelltrümmern zu vermeiden, wurde eine Vorauswahl der zu vermessenden Zellpopulation anhand ihrer Granularität und Größe getroffen (Seitenstreulicht, SSC und Vorwärtsstreulicht, FSC). Pro Röhrchen (also pro Well) wurden 5000 Zellen vermessen und anschließend die Daten mit der Software Cell Quest Pro (Becton Dickinson, Franklin, USA) prozessiert. Tabelle 15 gibt die Geräteeinstellungen des FACS wieder.

Tabelle 15: Einstellungen des FACS-Gerätes zur Analyse der ICAM-1-Expression.

Parameter:	Einstellungen:
Anregungswellenlänge	495 nm
Emmissionswellenlänge	519 nm
SSC	320 V
FSC	10 ⁻¹ V
Spannung FL 1	500 V
Fluss	60 µl/min

Auswertung

Die Auswertung der FACS-Messung erfolgte mit dem Programm WinMDI 2.9. Dazu wurden erneut die erwünschten Zellpopulationen im Densityplot nach Granularität und Größe ausgewählt, um Zelltrümmer von der Auswertung auszuschließen. Als Messwert dienten die jeweiligen Mittelwerte der Fluoreszenzintensitäten der 5000 vermessenen Zellen eines Wells. Der Mittelwert der beiden Messwerte der stimulierten, unbehandelten Zellen wurde als Referenzwert benutzt und als 100% ICAM-1-Expression gesetzt. Alle anderen Messwerte wurden prozentual auf diesen Wert bezogen.

B.2.2.2.5 Zellviabilität (MTT-Assay)

Hintergrund

Der MTT-Assay wird zum Testen eines möglichen toxischen Einflusses von Substanzen auf Zellen (Zytotoxizität) benutzt. Dabei wird davon ausgegangen, dass die Umsetzung des zu den Zellen gegebenen, gelben MTTs (3-(4,5-Dimethyl-2-thiazolyl)-2,5-diphenyl-2H-tetrazoliumbromid) zum blauen Formazan proportional zur Zellviabilität ist. MTT wird von der Succinat-Reduktase in der Atmungskette der Mitochondrien und Enzymen des Endoplasmatischen Reticulums mit Hilfe von NAPDH/H⁺ bzw. NADH/H⁺ zum wasserunlöslichen Formazan reduziert, welches sich, meist kristallin, in den Zellen anreichert. Durch Auflösen der Zellen mit einem Detergens wird das Formazan freigesetzt und kann photometrisch bestimmt werden.²⁹⁶ Sinn des Assays in dieser Arbeit war die Vermeidung falsch positiver oder falsch negativer Ergebnisse in anderen Assays wie z.B. dem ICAM-1-Assay, die durch die Toxizität der Substanzen hervorgerufen werden könnte. Daher wurden in anderen Assays i.d.R. nur Substanzkonzentrationen verwendet, die sich im MTT-Assay oder vergleichbaren Toxizitäts-Assays als nicht toxisch erwiesen haben. Neben der metabolischen Aktivität der Zellen spielt natürlich auch die Zellzahl eine Rolle für die umgesetzte Menge an MTT, wodurch auch ein Bezug zur Proliferation der Zellen besteht.²⁹⁷

Praktische Durchführung

Versuchsdesign

Die Umsetzung des Tetrazoliumsalzes MTT zum Formazan ist proportional zur Viabilität bzw. Vitalität der HMEC-1 Zellen. Neben einer Kontrollgruppe, die nur mit Medium versetzt wurde, und einer Lösungsmittelkontrolle, die die höchste Konzentration (meist 0,1%) an Lösungsmittel (EtOH oder DMSO) enthielt, wurden die Testsubstanzen aufgegeben, um ihre Zytotoxizität auf die Zellen zu testen. Die Lösungsmittelkontrolle wurde mitgeführt, um Lösungsmittelleffekte auszuschließen. Die unbehandelte Kontrolle wurde als 100% Lebensfähigkeit gesetzt. Bei einer Verminderung der Umsetzung des MTT wurde eine toxische Wirkung der Substanzen auf die Zellen angenommen.

²⁹⁶ Mosmann 1983

²⁹⁷ Hänsel und Sticher 2007

Aussäen der Zellen und Substanzaufgabe

Für den MTT-Assay wurden die HMEC-1 wie oben beschrieben geerntet und mit einer Zellzahl von 90.000 bzw. 15.000 pro Well (100 µl) in zuvor mit Collagen beschichtete 96-well-Platten ausgesät. Zur Beschichtung wurden 100 µl Collagen-Lösung pro Well gegeben, für 20 min im Brutschrank inkubiert und die Lösung danach abgesaugt. Daraufhin wurden die Zellen angesät. Nach 24 h Kultivierung im Brutschrank wurde das Medium aus den Wells abgesaugt und durch 100 µl der jeweiligen Verdünnung der Testsubstanzen ersetzt. Die Verdünnungen der Testsubstanzen wurden kurz vor der Zugabe frisch mit ECGM hergestellt. Es wurden Konzentrationen von 1, 10, 25, 50 und 75 µM oder bei Extrakten in Konzentrationen zwischen 1-100 µg/ml getestet. Die Zellen wurden nach Substanzaufgabe 24 h in Brutschrank inkubiert. Zur Vermeidung von Randeffekten wurden die Wells an den Rändern der Platte mit PBS befüllt. Jede Substanz wurde pro Experiment in sechs Parallelen getestet, jedes Experiment wurde dreimal unabhängig voneinander mit unterschiedlichen Zellpassagen wiederholt.

Aufgabe von MTT-Lösung und Aufarbeitung der Zellen

Nach 24 h Inkubation mit den Testsubstanzen wurde das Medium abgesaugt, durch 100 µl 10% MTT-Lösung in ECGM (MTT-Lösung: 4 mg/ml MTT in PBS) ersetzt und für 3 h im Brutschrank inkubiert. Hierauf wurde der Überstand abgesaugt und die Zellen mit 100 µl einer 10%igen SDS-Lösung (10% SDS in Wasser) lysiert. Die 96-well-Platten wurden über Nacht bei RT im Dunkeln inkubiert, damit sich die entstandenen Formazankristalle lösen konnten, und anschließend photometrisch vermessen.

Messung der Absorption und Auswertung

Die Absorption der einzelnen Wells wurde bei 560 nm mit einem Plattenlesegerät (Tecan SpectraFluor plus, Tecan) bestimmt. Der Mittelwert der 6 Messungen der Kontrolle wurde für jedes Experiment als Referenzwert für 100% Zellviabilität gesetzt. Hierauf wurden alle anderen Messwerte des Experiments prozentual bezogen. Aus den 3 Wiederholungen des Experiments wurden die Mittelwerte gebildet und statistisch ausgewertet.

B.2.2.2.6 *Immunfluoreszenzmikroskopische Untersuchung der Translokation von NF-κB*

Hintergrund und Bezug zur Entzündungshemmung

Mit Hilfe dieses Experiments sollte festgestellt werden, ob die Testsubstanzen die TNF- α -induzierte Translokation des Transkriptionsfaktors NF-κB vom Zytoplasma in den Zellkern vermindern können. Der Transkriptionsfaktor NF-κB ist, wie oben bereits erwähnt (vgl. B.1.4.1 und B.1.4.2), u.a. an der Signaltransduktion von Entzündungsreizen und der Transkription pro-inflammatorischer Gene beteiligt. Eine Hemmung der Translokation vom Zytoplasma in den Zellkern kann daher einen möglichen anti-inflammatoryischen Wirkmechanismus darstellen.

Praktische Durchführung

Versuchsdesign

Das Versuchsdesign bestand aus einer nicht mit TNF- α stimulierten Gruppe (Medium, Lösungsmittelkontrolle, Parthenolid 5 μ M und der Testsubstanz(en) in der jeweils höchsten Konzentration), um mögliche Einflüsse auf die Translokation ohne TNF- α -Stimulierung zu erkennen und einer zweiten Gruppe, die mit TNF- α stimuliert wurde (Medium, Parthenolid 5 μ M und den Testsubstanzen in den Konzentrationen 10, 50 und 75 μ M), um einen möglichen Einfluss von Testsubstanzen auf die Translokation zu untersuchen. Das SL Parthenolid wurde als Vergleichssubstanz (analog zur Positivkontrolle im ICAM-1-Assay) verwendet.

Aussäen der Zellen, Substanzaufgabe und Stimulierung mit TNF- α

Für die immunfluoreszenzmikroskopische Untersuchung der Translokation von NF-κB wurden die HMEC-1 wie oben beschrieben geerntet und mit einer Zellzahl von 15.000 pro Well (100 μ l) in zuvor mit Collagen beschichtete 96-well-Platten ausgesät. Nach 24 h Kultivierung im Brutschrank wurde das Medium abgesaugt und durch 100 μ l der jeweiligen Verdünnung der Testsubstanzen ersetzt. Die Verdünnungen der Testsubstanzen wurden kurz vor der Zugabe frisch mit ECGM-Medium hergestellt. Es wurden Konzentrationen von 10, 50 und 75 μ M getestet, außerdem Parthenolid in einer Konzentration von 5 μ M. Nach Aufgabe der Substanzen wurde 30 min im Brutschrank inkubiert. Anschließend wurden bei der zu

stimulierenden Gruppe die Lösungen der Testsubstanzen abgesaugt und durch 100 µl der jeweils selben Lösung ersetzt, welche jedoch unmittelbar zuvor mit 2 µl einer TNF-α-Lösung der Konzentration 1 µg/ml in ECGM (finale TNF-α-Konzentration im Well 20 ng/ml) versetzt und intensiv vermischt wurde. Es wurde für weitere 30 min im Brutschrank inkubiert. Der geringe Fehler durch die Verdünnung mit TNF-α-Lösung wurde dabei vernachlässigt. Die Experimente wurden in Duplicates durchgeführt und jedes Experiment wurde dreimal unabhängig voneinander mit jeweils unterschiedlichen Zellpassagen durchgeführt.

Immunfluoreszenzfärbung für den Transkriptionsfaktor NF-κB

Die Immunfluoreszenzfärbung zur Untersuchung der Translokation von NF-κB erfolgte nach dem Protokoll des Cellomics® HCS Reagent Kit Multiplex NF-κB and c-Jun Activation (Thermo Scientific, USA). In Tabelle 16 sind die verwendeten Reagenzien aufgelistet.

Tabelle 16: Reagenzien für die Immunfluoreszenzfärbung von NF-κB in HMEC-1 (Cellomics® HCS Reagent Kit Multiplex NF-κB and c-Jun Activation (Thermo Scientific, USA).

Reagenz:	Zusammensetzung:
1X Waschpuffer	10X Waschpuffer, 1:10 mit Millipore Wasser verdünnt
Fixierungslösung	4% Formaldehydlösung
Permeabilisierungspuffer	10X Permeabilisierungspuffer, 1:10 mit Wasser verdünnt
Blockpuffer	10X Blockpuffer, 1:10 mit Millipore Wasser verdünnt
Primäre Antikörperlösung (für 96 Wells)	24 µl primärer Antikörper NF-κB (Rabbit) in 5,5 ml 1 X Blockpuffer
Färbelösung (für 96 Wells)	0,275 µl Hoechst Dye, 13,75 µl DyLight 549 Goat Anti-Rabbit in 5,5 ml 1X Blockpuffer

Nach erfolgter Aktivierung mit TNF-α wurde das Medium aus allen Wells abgesaugt und die Zellen mit 100 µl warmer Fixierungslösung für 15 min bei RT inkubiert. Die Fixierungslösung wurde abgesaugt und die Wells zweimal mit 100 µl 1X Waschpuffer gewaschen. Daraufhin wurde mit 100-µl/Well Permeabilisierungspuffer für 15 min bei RT inkubiert, der Puffer danach abgesaugt und die Zellen zweimal mit 1X Blockpuffer gewaschen. Danach wurde mit 100 µl/Well 1X Blockpuffer für 15 min bei RT inkubiert. Nach Absaugen des Blockpuffers wurden 50 µl primäre Antikörperlösung je Well zugegeben und für 1 h bei RT inkubiert. Nach Absaugen der Antikörperlösung wurde zweimal mit 100 µl/Well 1X Blockpuffer gewaschen, 50 µl Färbelösung zugegeben und für 1 h bei RT im Dunkeln inkubiert. Die Färbelösung wurde abgesaugt, jedes Well zweimal mit 100 µl 1X Waschpuffer gewaschen und daraufhin mit 150 µl 1X Waschpuffer befüllt. Die so behandelte Platte wurde im Fluoreszenzmikroskop vermessen.

Fluoreszenzmikroskopische Bildaufnahme und Auswertung

Die fluoreszenzmikroskopische Bildaufnahme erfolgte mit Hilfe eines Carl Zeiss AxioObserver.Z1 (Carl Zeiss, Germany) mit motorisiertem Objekttisch, EC Plan-Neofluar 10x Objektiv, dem entsprechenden Reflektoren-Set für die verwendeten Fluoreszenzfarbstoffe (Reflektoren 38 HE, 43 HE, 49) und der Software AxioVision 4.8.1 (Carl Zeiss MicroImaging, Germany).

Für die Aufnahmen wurden folgende Einstellungen vorgenommen:

Multichannel, Autofocus,

Ch1 = DyLight 549 (NF- κ B), Reflektor 43 HE, Belichtungszeit 1500 ms,

Ch3 = Hoechst33342 (Nukleus), Reflektor 49, Belichtungszeit 300 ms.

Positionsliste: 3 Bilder pro Well

Für die Bildauswertung wurde das AxioVision ASSAYbuilder™ Physiology Analyst Modul benutzt. Zur automatischen Objekterkennung und Bestimmung der Zellkerngrenzen diente die Hoechstfärbung, welche hierzu als Ch1 = Primary Object (Nucleus) definiert wurde. NF- κ B wurde als Ch2 gesetzt.

Zur Analyse der Translokation von NF- κ B wurde eine Kreis-Maske (circ) über den Zellkern und eine Ring-Maske (ring) über das Zytoplasma jeder Zelle gelegt. Die Kreis-Maske erfasst die Fluoreszenzintensität des Transkriptionsfaktors im Kern, die Ring-Maske die Fluoreszenzintensität im Zytoplasma.

Zur Bestimmung der Translokation von NF- κ B wurde für jedes Well die gemittelte Differenz der durchschnittlichen Fluoreszenzintensität zwischen Kreis- und Ring-Maske (MEAN_CircRingAvgIntenDiff) von Ch2 bestimmt.

Einstellungen für die Bildanalyse:

Ch1 = primary object (nuclei)

Ch2= NF- κ B, CircModifier 0, Ring distance 0, Ring Width 20

B.2.2.7 Reportergen-Assay (Luciferase-Assay) für NF-κB

Hintergrund und Bezug zur Entzündungshemmung

Mit Hilfe eines Reportergen-Assays kann u.a. die Promotoraktivität von Genen untersucht werden. Dazu wird ein sog. Reportergen mit dem zu untersuchenden Promotor gekoppelt und dieses Konstrukt als Plasmid in Zellen eingeschleust. In der vorliegenden Arbeit wurde als Reportergen das Luziferasegen verwendet und mit dem NF-κB-Promotor gekoppelt. Bei Stimulierung der Zellen, z.B. mit TNF-α, wird der oben beschriebene NF-κB-Signalweg aktiviert, an dessen Ende die Bindung von NF-κB an seinen Promotor steht. Eine Aktivierung des Signalwegs führt zu vermehrter NF-κB Bindung an den Promotor und damit auch zur Erhöhung der Transkription (und damit i.d.R. auch der Translation) des Luciferasegens. Der Umfang der Luciferase-Expression wird durch deren enzymatische Aktivität (Oxidation von Luciferin unter Biolumineszenz) luminometrisch detektiert. Substanzen, die den NF-κB-Signalweg beeinflussen, erhöhen oder senken die Transkription und damit die Expression des Luciferasegens, was wiederum zu detektierbaren Änderungen der Biolumineszenz führt.²⁹⁸

Praktische Durchführung

Der Reportergen-Assay (Luciferase-Assay) wurde freundlicherweise von Frau Simone Fuchs (Lehrstuhl Pharmazeutische Biologie der Goethe-Universität Frankfurt am Main) mit dem Dual-Luciferase® Reporter Assay System (Promega, USA) durchgeführt. Dazu wurden HUVEC (**h**uman **u**mbilical **v**ein **e**ndothelial **c**ells) mit Plasmiden transfiziert, die für *Renilla*-Luziferase (zur Überprüfung des Transfektionserfolgs) und für Firefly-Luziferase (gekoppelt an NF-κB-Promotor) kodieren. Nach 24 h Kultivierung wurden die Zellen mit 10, 30 und 100 μM Matricin in Zellkulturmedium behandelt und nach 30 min Vorinkubation mit 10 ng/ml TNF-α für 5 h stimuliert. Luciferaseaktivität wurde durch Spektrofluorometrie bestimmt. Die Messwerte der 4 Wiederholungen wurden gemittelt und statistisch ausgewertet (One-way ANOVA gefolgt von Newman-Keuls-Test, behandelte Gruppen versus TNF-α).

²⁹⁸ Lottspeich und Engels 2006

B.2.2.3 Pharmakologische Tests mit RAW 264.7-Zellen

B.2.2.3.1 Allgemeines zu RAW 264.7

Die Zelllinie RAW 264.7 wurde durch Transfektion muriner Makrophagen mit dem Abelson Leukämievirus erhalten. Die Zellen weisen die Eigenschaften „normaler“ Makrophagen auf, wie z.B. die Pinozytose von Neutralrot, Phagozytose von Zymosan und Latexkügelchen und die Neutralisierung von Tumorzellen.²⁹⁹ RAW-Zellen geben außerdem bei bestimmten Stimuli, wie z.B. LPS (Lipopolysaccharid), einem Bestandteil der äußeren Zellmembran gramnegativer Bakterien, oder den Cytokinen TNF- α , IL-1 oder IFN- γ , Stickstoffmonoxid (NO) nach außen ab.

B.2.2.3.2 Zellkultur von RAW 264.7

Soweit nicht anders erwähnt, galten für alle Arbeiten mit RAW 264.7 folgende Parameter:
Alle Arbeiten wurden unter sterilen Bedingungen durchgeführt. Die Kultivierung der Zellen erfolgte analog zu den HMEC-1 in einem CO₂-Inkubator bei 37 °C, 5% CO₂ und gesättigter Luftfeuchtigkeit. Alle Flüssigkeiten, die mit den Zellen in Berührung kamen, wurden vorher auf 37 °C aufgewärmt. Als Kulturmedium wurde RPMI-Medium (RPMI 1640, 500 ml, 2,0 g/l NaHCO₃, mit Phenolrot + 50 ml hitzeinaktiviertes FCS + 5,5 ml L-Glutamin 200 mM, Biochrom), benutzt. Zum Passagieren wurden die konfluent gewachsene Zellen zweimal mit 10 ml PBS gewaschen. Anschließend wurden die Zellen mit einem Zellschaber vom Boden der Kulturflasche in 10 ml RPMI-Medium abgeschabt und gut resuspendiert. Je nach Zelldichte, wurde im Verhältnis 1:10 bzw. 1:20 gesplittet. Dazu wurde 0,5 bzw. 1 ml der Zellsuspension in eine neue Zellkulturflasche überführt und dann mit frischem Medium auf 20 ml aufgefüllt.

²⁹⁹ Raschke et al. 1978

B.2.2.3.3 Griess-Assay

Hintergrund und Bezug zur Entzündungshemmung

Wie oben bereits erwähnt (vgl. B.1.4.3) bilden Makrophagen u.a. bei Stimulierung mit LPS NO-Radikale. NO dient u.a. zur direkten Bekämpfung von Tumorzellen und Mikroorganismen aber auch als Entzündungsmediator. NO kann in Lösung mit Sauerstoff und Wasser reagieren und so Nitrit-Ionen bilden, die mit dem Griess-Reagenz nachgewiesen und quantifiziert werden können.^{300,301} Im Griess-Assay werden Testsubstanzen auf die Fähigkeit hin getestet, die Menge der im Überstand von stimulierten RAW 264.7-Zellen akkumulierten Nitrit-Ionen zu reduzieren. Ob dabei die iNOS-Synthese bzw. deren Aktivität vermindert wird oder NO bzw. Nitrit selbst abgefangen wird, lässt sich mit dem Assay nicht abschließend klären. Jedoch kann eine Verminderung der Nitrit-Konzentration durch Testsubstanzen im Zellüberstand einen Hinweis auf eine potentiell entzündungshemmende Wirkung dieser Stoffe liefern.

Praktische Durchführung

Versuchsdesign

RAW 264.7-Zellen wurden mit LPS zur Produktion von NO durch die iNOS stimuliert. Das NO wird in das Kulturmedium abgegeben, wo es zu Nitrit oxidiert und akkumuliert wird. Der Nachweis des NO erfolgt indirekt, über den Nachweis des Nitrats. Neben den mit den Testsubstanzen behandelten Zellen gab es eine Kontrollgruppe, die nur Medium erhielt und eine Lösungsmittelkontrolle, die mit der höchsten Konzentration (meist 0,1%) an Lösungsmittel (EtOH oder DMSO) behandelt wurde. Die Nitrit-Menge der nur mit LPS aktivierten Kontrollgruppe wurde als 100% gesetzt und die Werte der mit Testsubstanzen behandelten Zellen darauf bezogen. In Vorversuchen wurden auch nicht mit LPS stimulierte, aber ansonsten gleich behandelte Gruppen vermessen, um eventuelle Stimulierung oder andere Nebeneffekte der Testsubstanzen auf die Nitrit-Konzentration im Überstand auszuschließen.

³⁰⁰ Stuehr und Marletta 1987

³⁰¹ Misko et al. 1993

Aussäen der Zellen und Substanzaufgabe

Zur Durchführung des Griess-Assays wurden pro Well einer 96-well Platte 8×10^4 Zellen in einem Volumen von 100 µl angesät. Hierbei wurde Medium ohne Phenolrot verwendet, um den photometrischen Nitrit-Nachweis nicht zu stören. Die Zellen wurden im Brutschrank für 24 h kultiviert und danach mit den Testsubstanzen inkubiert. Dazu wurde das Medium abgesaugt und die Lösungen der Testsubstanzen in RPMI-Medium in doppelter Endkonzentration aufgegeben (50 µl). In die Wells, die mit LPS stimuliert werden sollten, wurden zusätzlich 50 µl einer LPS-Lösung (2 µg/ml LPS in PBS) der Konzentration 20 ng/ml in RPMI gegeben (final 10 ng/ml). In Wells, die nicht stimuliert werden sollten, wurde lediglich 50 µl RPMI zugegeben. Die Testsubstanzen wurden in den Konzentrationen 1, 10, 25, 50, 75 und 100 µM oder bei Extrakten in Konzentrationen zwischen 1-100 µg/ml getestet. Jede Konzentration wurde in einem Experiment in 8 Wells aufgegeben. Jedes Experiment wurde, wenn nicht anders erwähnt, dreimal unabhängig voneinander, mit jeweils unterschiedlichen Zellpassagen wiederholt. Nach der Substanzaufgabe wurden die Zellen für weitere 24 h im Brutschrank inkubiert.

Bestimmung der Nitrit-Konzentration im Überstand und Auswertung

Nach 24 h Inkubation wurden 50 µl Überstand aus jedem Well in eine neue 96-well-Platte überführt und jeweils mit 50 µl Griess-Reagenz versetzt, das frisch hergestellt wurde (50 mg N-(1-Naphtyl)ethylendiamindihydrochlorid, 500 mg Sulfanilamid, 175 µl ortho-Phosphorsäure 85%, in 50 ml Wasser, Erhitzen im Wasserbad auf ca 60-70 °C). Nach 15 min Inkubation bei RT im Dunkeln wurde die Absorption der Wells im Plattenlesegerät bei 560 nm bestimmt. Zum Erstellen einer Kalibriergeraden wurden NaNO₂-Lösungen der Konzentrationen 10, 25, 50 und 100 µM mit farblosem RPMI-Medium hergestellt, analog mit Griess-Reagenz versetzt und vermessen. Aus den Mittelwerten jeder Konzentration wurde eine Kalibriergerade erstellt, die Geradengleichung ermittelt und nach Umstellen der Gleichung und Einsetzen der jeweiligen Messwerte der Experimente die Konzentrationen an Nitrit in jedem Well berechnet. Diese Konzentrationen wurden prozentual auf die der unbehandelten, mit LPS stimulierten Kontrollgruppe (100%) bezogen. Dann wurden aus den resultierenden Prozent-Werten die Mittelwerte jeder Gruppe bestimmt und diese statistisch ausgewertet. Die IC₅₀-Werte des Griess-Assays wurden halbgraphisch durch Auftragung der Hemmung der Nitritmenge [%] gegen die Konzentration der Testsubstanz [µM] ermittelt.

Dazu wurde mit Hilfe von Excel die zugehörige Funktionsgleichung erstellt, nach der x-Variablen (zugehörige Konzentration bei 50% Hemmung) aufgelöst und für die y-Variable der Wert 50 eingesetzt.

B.2.2.3.4 *Modifizierter Griess-Assay*

Im modifiziertem Griess-Assay sollte der zeitliche Einfluss von Matricin und Chamazulen auf die NO-Konzentration im Überstand von RAW 264.7-Zellen untersucht werden. Dazu wurde die eine Hälfte einer 96-well Platte wie oben beschrieben behandelt, der zweite Teil der Platte wurde parallel für 23 h lediglich mit LPS, aber ohne Testsubstanzen inkubiert. Erst 1 h vor der Messung wurden die gleichen Konzentrationen (1, 25, 50 und 75 µM) wie auf der anderen Hälfte der Platte durch Zugabe konzentrierter Lösungen von Matricin und Chamazulen eingestellt. Wegen der sehr kleinen Volumina (0,5-1,25 µl) wurde der Verdünnungseffekt vernachlässigt. Die Messung und Auswertung erfolgte analog zum nicht modifizierten Griess-Assay. Die Experimente wurden in vier Parallelen durchgeführt und dreimal mit Zellen unterschiedlicher Passagen wiederholt. Der Assay wurde nach der von Fang et al. (2003) angewandten Methode durchgeführt.³⁰²

B.2.2.3.5 *Zellzahlbestimmung*

Hintergrund

Um sicher zu gehen, dass die Testsubstanzen in den verwendeten Konzentrationen nicht toxisch für RAW 264.7-Zellen sind und damit falsch positive Testergebnisse im Griess-Assay auszuschließen, wurde die Zellviabilität durch Zellzahlbestimmung gemessen. Um möglichst viele Parameter konstant zu halten, wurde dafür auch die gleiche Zellzahl wie im Griess-Assay benutzt. Bei dieser hohen Zellzahl ist, u.a. durch die hohe Stoffwechselaktivität der RAW 264.7-Zellen, der MTT-Assay nicht durchführbar.

³⁰² Fang et al. 2003

Praktische Durchführung

Versuchsdesign

Zur Bestimmung der Viabilität wurden die Zellen mit Testsubstanzen inkubiert und ihre Zellzahl im Vergleich zur Zellzahl der Kontrollgruppe (100% Viabilität), die nur mit Medium behandelt wurde, fluoreszenzmikroskopisch bestimmt. Durch eine Lösungsmittelkontrolle (0,1%) konnte ein Einfluss des Lösungsmittels ausgeschlossen werden.

Aussäen der Zellen und Substanzaufgabe

Es wurden, analog zum Griess-Assay, 8×10^4 Zellen pro Well ausgesät und 24 h im Brutschrank kultiviert. Nach Absaugen des Mediums wurden die Testsubstanzen aufgegeben. Getestet wurden die Konzentrationen 1, 10, 25, 50, 75 und 100 μM oder bei Extrakten in Konzentrationen zwischen 1-100 $\mu\text{g}/\text{ml}$. Nach Aufgabe der Substanzen wurden die Zellen 24 h im Brutschrank inkubiert.

Fixierung und Färben der Zellen

Nach Absaugen des Mediums wurden die Zellen zum Fixieren für 30 min bei RT mit 100 μl 4% Formaldehyd-Lösung inkubiert. Die Lösung wurde abgesaugt und die Zellen zweimal mit 100 μl PBS gewaschen. Danach wurde mit 50 μl Hoechst-Lösung (Hoechst33342 20 mM, 1:1200 in PBS) 10 min bei RT und Dunkelheit inkubiert. Nach Absaugen der Färbelösung wurde zweimal mit 100 μl PBS gewaschen und dann jedes Well mit 150 μl PBS befüllt. Anschließend wurde die jeweilige Zellzahl pro Well mittels Fluoreszenzmikroskopie bestimmt.

Fluoreszenzmikroskopische Bilddurchführung und Auswertung

Die fluoreszenzmikroskopische Bilddurchführung der behandelten Platten erfolgte mit Hilfe eines Carl Zeiss AxioObserver.Z1 (Carl Zeiss, Germany) mit motorisiertem Objekttisch, EC Plan-Neofluar 10x Objektiv und der Software AxioVision 4.8.1 (Carl Zeiss MicroImaging, Germany).

Für die Aufnahmen wurden folgende Einstellungen vorgenommen:

Ch1 = Hoechst33342 (Nukleus), Reflektor 49, Belichtungszeit 130 ms, Autofocus

Positionsliste: 4 Bilder pro Well

Für die Bildauswertung wurde das AxioVision ASSAYbuilder™ Physiology Analyst Modul benutzt. Die Hoechstfärbung diente zur automatischen Objekt- und Zellkernerkennung (CH1 = Primary Object (Nucleus)) und damit zur Bestimmung der Zellzahl. Die Parameter wurden so gesetzt, dass die Auswertungsmaske die größtmögliche Übereinstimmung mit der Aufnahme aufwies. Zur Auswertung wurden die Mittelwerte der Objektzahl (valid object count) aus den Einzelbildern jeder Gruppe (Behandlung) berechnet und prozentual auf die unbehandelte Kontrollgruppe (100%) bezogen.

B.2.2.4 SNP-Assay

B.2.2.4.1 Hintergrund

Im Griess-Assay besteht neben einer Hemmung der NO-Produktion auch die Möglichkeit, dass Testsubstanzen das gebildete NO abfangen bzw. die Griess-Reaktion behindern.

Der oktaedrische Eisenkomplex di-Natriumnitrosylpentacyanoferrat(III) Dihydrat (Abbildung 26) oder auch engl. Sodium nitroprusside (SNP) gibt, gelöst in PBS kontinuierlich NO an die Lösung ab und kann somit verwendet werden, um die NO-Radikalfängereigenschaften von Substanzen zu bestimmen.^{303,304,305,306}

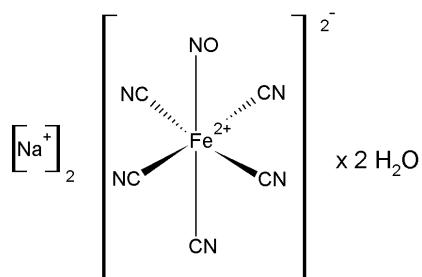


Abbildung 26: Der im SNP-Assay verwendete Eisenkomplex di-Natriumnitrosylpentacyanoferrat(III) Dihydrat oder engl. Sodium nitroprusside (SNP).

Dementsprechend kann der SNP-Assay als Ergänzung zur Aussagekraft des vorher durchgeführten Griess-Assays dienen.

³⁰³ Rao 1997

³⁰⁴ Nakagawa und Yokozawa 2002

³⁰⁵ Sumanont et al. 2004

³⁰⁶ Hazra et al. 2008

B.2.2.4.2 *Praktische Durchführung*

Es wurden je 50 µl einer SNP-Lösung (SNP, Sigma-Aldrich, in PBS) der Konzentration 20 mM (final 10 µM) und je 50 µl der jeweiligen Verdünnung der Testsubstanzen in PBS der Konzentration 200 µM (final 100 µM) in eine 96-well-Platte pipettiert und im Dunkeln bei RT inkubiert. Als Lösungsmittelkontrolle diente DMSO in PBS der finalen Konzentration 100 µM. Es wurden nach 0, 2, 5, 8, 10, und 24 h je Gruppe 4 Proben a 50 µl entnommen und analog zur Prozedur des Griess-Assay (siehe B.2.2.3.3) mit 50 µl Griess-Reagenz versetzt, photometrisch vermessen und ausgewertet.

B.2.3 Statistik

Falls nicht anders erwähnt, wurden die Graphen mit Excel (Microsoft, 2007) bzw. SPSS (SPSS Statistics 19, IBM) erstellt. Statistische Tests auf Signifikanz wurden mit SPSS durchgeführt. Der jeweils benutzte Signifikanztest wird im Ergebnisteil genannt. Ausreißertests wurden mittels SPSS mit einem Konfidenzintervall von 95% durchgeführt.

B.3 Ergebnisse

B.3.1 Präparativ-analytischer Teil

B.3.1.1 Isolierung von Matricin

B.3.1.1.1 Isolierungsschema

Die Masse des DCM-Rohextraktes aus 500 g Kamillenblüten betrug nach Abdestillieren des Lösungsmittels 19,0 g. Nach Eingießen des DCM-Rohextrakts in Petroleumbenzin, Entfernung des Niederschlags und Abdestillieren des Lösungsmittels blieben 12,2 g Rückstand. Nach Entfettung mit MeOH und Abdestillieren des Lösungsmittels betrug die Masse des entfetteten Extrakts noch 8,2 g.

Die Vereinigung der matricinhaltigen Fraktionen nach der Kieselgel-Flash (zwischen 380-900 ml) ergab nach Abdestillieren des Lösungsmittels eine Masse von 848,0 mg. Abbildung 27 zeigt die Übersichts-DC der durchgeführten Kieselgel-Flash-Chromatographie.



Abbildung 27: Übersichts-DC der Fraktionierung des Kamillenblüten DCM-Extraktes mittels einer Kieselgel-Flash-Chromatographie zur Isolierung von Matricin. Aufgetragen sind der Extrakt (1), Fraktionen 10, 15,..., 55 der Kieselgel-Flash (2-11), MeOH-Spülung der Säule (12), nahezu zersetztes Matricin (13) und intaktes Matricin (14). $R_f = 0,32$. Matricinhaltige Fraktionen (20-45) wurden vereinigt. NP-DC, Fließmittel: DCM/tBME 5:1, Laufhöhe: 8 cm, keine Kammersättigung, Derivatisierung: AA-Reagenz, 5 min 100 °C, Dokumentation: vis.

Nach der Al_2O_3 -Flash-Chromatographie wurde durch die Vereinigung der matricinhaltigen Fraktionen (zwischen 40-150 ml) nach Abdestillieren des Lösungsmittels eine Masse von 474,6 mg erhalten. Abbildung 28 zeigt eine Übersicht der Fraktionierung durch die Al_2O_3 -Flashchromatographie



Abbildung 28: Übersichts-DC der Fraktionierung der vereinigten matricinhaltigen Fraktionen aus der Kieselgel-Flash mittels einer Al_2O_3 -Flash-Chromatographie. Aufgetragen sind die vereinigten matricinhaltigen Fraktionen aus der Kieselgel-Flash (1, 2), Fraktionen 5, 7, 10, 15, ..., 45 der Al_2O_3 -Flash (3-12) und (nahezu zersetzes) Matricin (13) $R_F = 0,30$. Matricinhaltige Fraktionen (9-30) wurden vereinigt. NP-DC, Fließmittel: DCM/tBME 5:1, Laufhöhe: 8 cm, keine Kammersättigung, Derivatisierung: AA-Reagenz, 5 min 100 °C, Dokumentation: vis.

Die zuletzt durchgeführte RP-18-Flash-Chromatographie ergab nach Vereinigung der matricinhaltigen Fraktionen (zwischen 200-275 ml) eine Masse von 82,2 g Matricin. Abbildung 29 zeigt eine Übersicht der mittels RP-18-Flash erreichten Fraktionierung.

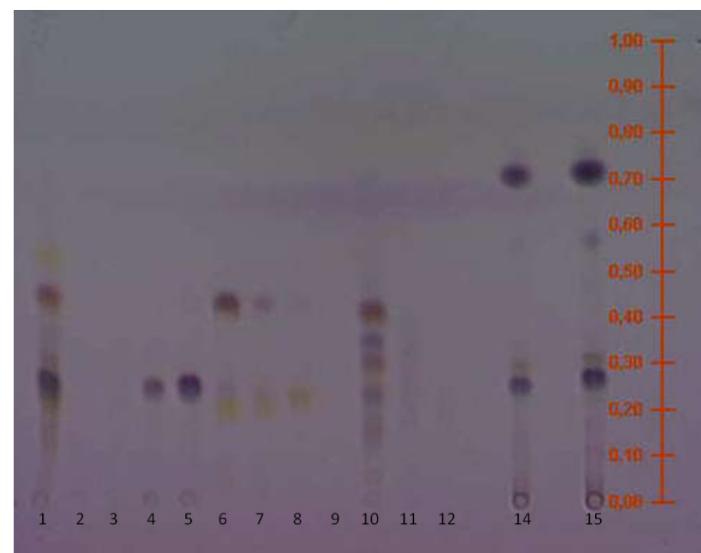


Abbildung 29: Übersichts-DC der Fraktionierung der vereinigten matricinhaltigen Fraktionen aus der Al_2O_3 -Flash mittels RP-18-Flash-Chromatographie. Aufgetragen sind die vereinigten matricinhaltigen Fraktionen aus der Al_2O_3 -Flash (1, 10), Fraktionen 15 (2), 30 (3), 45 (4), 50 (5), 60 (6), 75 (7), 85 (8), 110 (9), 120 (11), 125 (12) der RP-18-Flash und (nahezu zersetzes) Matricin (14, 15) $R_F = 0,28$. Matricinhaltige Fraktionen (41-55) wurden vereinigt. NP-DC, Fließmittel: DCM/tBME 5:1, Laufhöhe: 8 cm, keine Kammersättigung, Derivatisierung: AA-Reagenz, 5 min 100 °C, Dokumentation: vis.

Die oben beschriebene Extraktion von Matricin mit Diethylether aus der wässrigen Phase nach der RP-18-Flash gelang quantitativ, was durch DC der beiden Phasen nach Ausschütteln bestätigt wurde (DC nicht gezeigt). Abbildung 30 zeigt ein Übersichtsschema der etablierten Isolierung von Matricin.

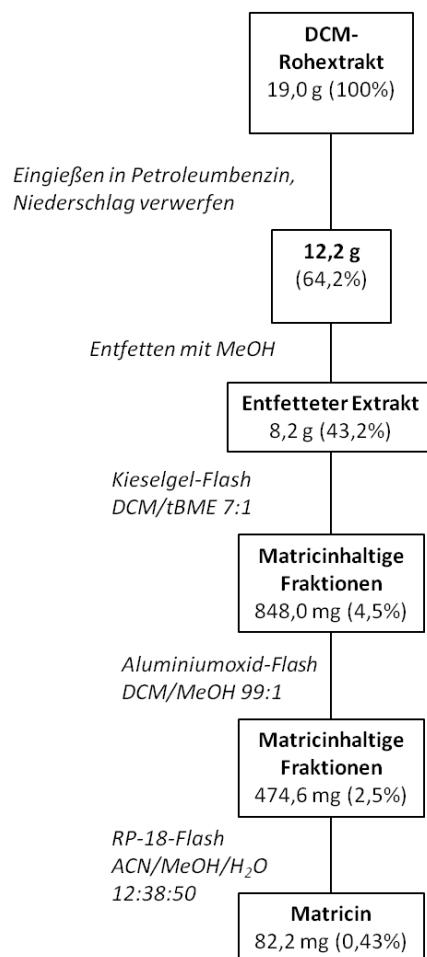


Abbildung 30: Schematische Darstellung der in der vorliegenden Arbeit etablierten Isolierung von Matricin aus einem DCM-Kamillenblütensextrakt.

Die Ausbeute an Matricin bezogen auf die Drogeneinwage von 500 g betrug 0,016%.

B.3.1.1.2 Reinheitsbestimmung des isolierten Matricins mittels HPLC

Für die pharmakologische Charakterisierung des Matricins wurde die eben beschriebene Isolierung mehrmals durchgeführt (V3, V5, V6). Die chromatographische Reinheit des isolierten Matricins betrug für V3 92,9%, für V5 98,6% und für V6 87,8% (nach Isolierung

teilweise zerfallen). Abbildung 31 zeigt exemplarisch einen Ausschnitt des Chromatogramms von V3 bei 242 nm.

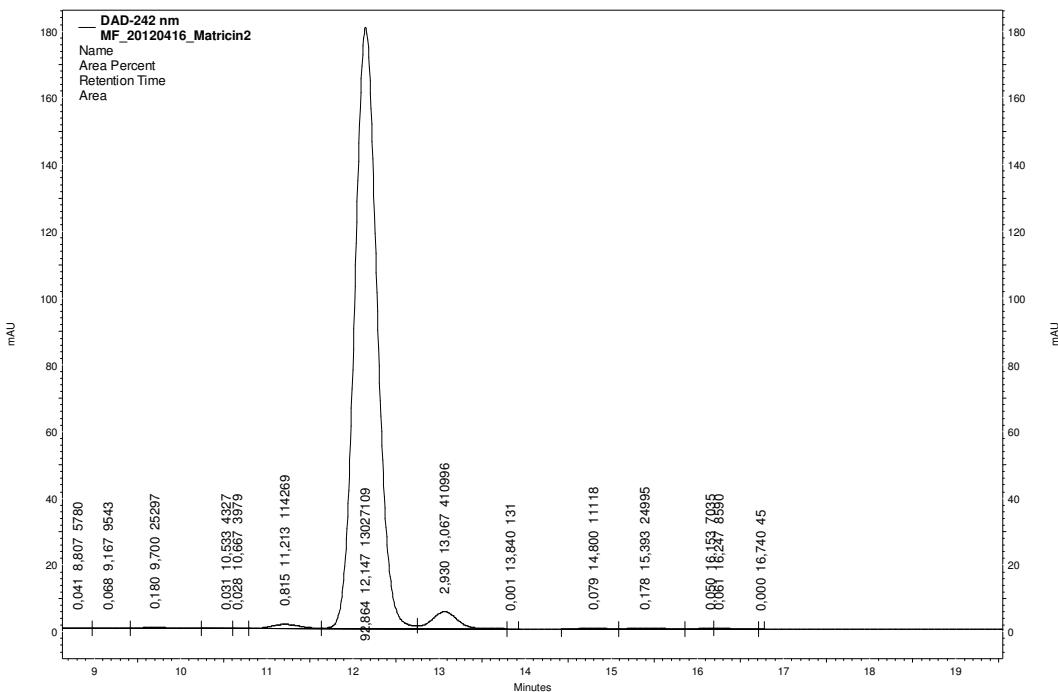


Abbildung 31: Exemplarisches HPLC-Chromatogramm zur Bestimmung der chromatographischen Reinheit des in Versuch 3 (V3) isolierten Matricins. Es wurde eine chromatographische Reinheit von 92,8% ermittelt.

B.3.1.1.3 Identifizierung des Matricins

Dünnschichtchromatographie

Die isolierte Substanz zeigte bei Tageslicht eine blau-violette Färbung nach Derivatisierung der entwickelten DC-Platten mit AA-Reagenz (Abbildung 34, Bahn 1) bzw. blaue Färbung mit EP-Reagenz (Abbildung 36, Bahn 10) und anschließendem Erhitzen für 5 min auf 100 °C, was den Literaturangaben für Matricin entsprach.^{307,308} Die ermittelten R_F-Werte für die Fließmittel DCM/tBME 5:1 von 0,2 - 0,3 bzw. von 0,3 - 0,4 für DCM/Aceton 9:1 lagen im Bereich der in der Literatur angegebenen R_F-Werte für Matricin (Abbildung 29, Abbildung 32, Abbildung 34 und Abbildung 36).^{309, 310, 311, 312, 313}

³⁰⁷ Ramadan 2005

³⁰⁸ Stahl und Schild 1986

³⁰⁹ Ramadan 2005

³¹⁰ Glasl et al. 2001a

³¹¹ Glasl et al. 2001b

³¹² Glasl et al. 1999a

³¹³ Glasl et al. 1999b

Tabelle 17 zeigt eine Übersicht der in der Literatur angegebenen R_F -Werte für Matricin.

Tabelle 17: Gewählte DC-Methoden zur Identifizierung des Matricins.

	Ramadan (2005)	Glasl et al. (1999a,b); Glasl et al. (2001a,b)
Stationäre Phase	NP-DC	NP-DC
Fließmittel	DCM/tBME 5:1	DCM/Aceton 9:1
Sprühreagenz	AA-Reagenz	EP-Reagenz/EtOH
Farbreaktion	Blau	Blau
R_F -Wert (Literatur)	0,2	0-0,50 bzw. 0,4, bzw. 0,36

DC-MS

Das niedrig aufgelöste Massenspektrum der DC-Bande (1) in Abbildung 32 bei $R_F = 0,3$ (DCM/tBME 5:1) ergab 2 Hauptsignale der Quasi-Molekülionen von m/z (% relative Intensität): 630,3 $[2M + 18]^+$ (100%) NH₄-Auflagerung und 324,1 $[M + 18]^+$ (63%) NH₄-Auflagerung, was auf eine Molekülmasse von 306,13 g/mol schließen ließ (Matricin berechnet = 306,35 g/mol). Das niedrig aufgelöste Massenspektrum der DC-Bande (2) in Abbildung 32 bei $R_F = 0,7$ ergab 3 Hauptsignale der Quasi-Molekülionen von m/z (% relative Intensität): 289,0 $[M + 1]^+$ (53%) Protonenaufklagerung, 594,2 $[2M + 18]^+$ (91%) NH₄-Auflagerung und 599,2 $[2M + 23]^+$ (100%) Na-Auflagerung, was auf eine Molekülmasse von 288,06 schließen ließ (Matricin (306,35) - H₂O (18,02) = 288,34 g/mol) (vgl. auch Flaskamp et al. 1982 und Ness et al. 1996).^{314,315} Abbildung 32 zeigt das zur MS verwendete DC. Tabelle 18 zeigt die Daten der DC-MS-Analyse.

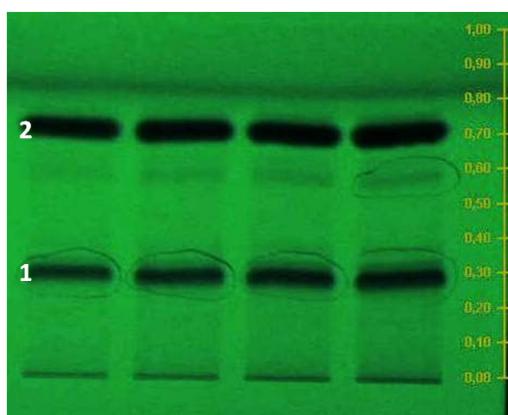


Abbildung 32: Die für die DC-MS verwendete NP-DC. Es wurden 4 Banden des (mutmaßlich) bereits teilweise zersetzen, isolierten Matricins aufgetragen. Nach Entwicklung ergaben sich 2 Hauptspots: (1) $R_F = 0,3$ (vermutlich Matricin), (2) $R_F = 0,7$ (vermutlich dehydratisiertes Matricin). NP-DC, Fließmittel: DCM/tBME 5:1, Laufhöhe: 8 cm, keine Kammersättigung, Derivatisierung: keine, Dokumentation: 254 nm.

³¹⁴ Flaskamp et al. 1982

³¹⁵ Ness et al. 1996

Tabelle 18: Daten der DC-MS (ESI) zur Identifizierung des isolierten Matricins.

	m/z	relative Intensität [%]	Quasi-Molekülion (Auflagerung)	Molekülmasse (M)
Band 1	630,3	100	[2M + 18] ⁺ (NH ₄)	306,15
	324,1	63	[M + 18] ⁺ (NH ₄)	306,1
Band 2	599,2	100	[2M + 23] ⁺ (Na)	288,1
	594,2	91	[2M + 18] ⁺ (NH ₄)	288,1
	289,0	53	[M + 1] ⁺ (H)	288,0

¹H-NMR-Spektroskopie

Das ¹H-NMR-Spektrum der isolierten Substanz wurde mit Daten aus der Literatur verglichen. Trotz der Verwendung eines anderen Lösungsmittels (CD₃OD statt CDCl₃, wegen der erhöhten Instabilität des Matricins in CDCl₃), kann davon ausgegangen werden, dass es sich bei der isolierten Verbindung um Matricin handelt, da die Werte mit den Literaturwerten weitgehend übereinstimmen. Tabelle 19 stellt die ermittelten ¹H-NMR-Daten den Literaturwerten gegenüber.^{316,317,318}

Tabelle 19: ¹H-NMR Daten von Matricin im Vergleich mit ¹H-NMR Daten von Immig et al. (2001), Ramadan et al. (2006) und Flaskamp et al (1982). I. = Integral, mult. = Multiplizität, J = Kopplungskonstante.

Eigene Messung (300 MHz, CD₃OD, T = 295 K)	Immig et al. (2001) (500 MHz, CDCl₃)	Ramadan et al. (2006) (500 MHz, CDCl₃)	Flaskamp et al. (1982) (270 MHz, CDCl₃)
H δH (I., mult., J [Hz])	δH (mult., J [Hz])	δH (I., mult., J [Hz])	δH (I., mult., J [Hz])
2-H 6,38 (1H, d, 5,8)	6,25 (d, 5,7)	6,32-6,31 (1H, d, 5,7)	6,32 (1H, d, 5,8)
3-H 5,85 (1H, d, 5,8)	5,86 (d, 5,7)	5,94-5,93 (1H, d, 5,7)	5,93 (1H, br d)
8-H 4,85 (überlagert H ₂ O in CD ₃ OD)	4,87 (dt, 10,3, 3,6)	4,96-4,94 (1H, dt, 11,5, 10,3, 3,6)	4,94 (1H, ddd, 10,3, 4,1, 10,3)
6-H 4,15 (1H, dd, 10,9, 10,2)	4,02 (t, 11,0, 11,0)	4,11-4,07 (1H, t, 11,0)	4,09 (1H, dd, 11,1, 10,1)
5-H 2,88 (1H, dquint, 11,0, 1,9)	2,84 (dquint, 11,0, 2,1, 2,0)	2,92-2,90 (1H, dquint, 11,0, 2,1, 2,0)	2,91 (1H, m, 2,2)
11-H 2,68 (1H, dq, 11,5, 6,9)	2,50 (dq, 11,5, 6,9)	2,57-2,56 (1H, dq, 11,5, 6,9)	2,57 (1H, dq, 11,5, 7,0)
9a-H 2,37 (1H, dd, 15,1, 3,4)	2,39 (br dd, 15,8, 10,3, 2,0)	2,47-2,45 (1H, br dd, 15,8, 10,3, 2,0)	2,48 (1H, m, 15,6, 1,2)
9e-H 2,33-2,27 (1H, m)	2,32 (dd, 15,8, 3,6)	2,41-2,40 (1H, dd, 15,8, 10,3)	2,39 (1H, m)
7-H überlagert 17-H	2,15 (q, 11,5, 11,5, 11,5)	2,22-2,02 (1H, dt, 11,5, 11,5)	2,2 (1H, bs)
17-H 2,10-2,06 (4H, m (s))	2,04 (s)	2,11 (1H, s)	2,21 (1H, m) 2,11 (3H, s)
14-H 1,87 (3H, s)	1,78 (t, 2,0, 2,0)	1,85 (3H, t, 2,0)	1,85 (3H, m)
15-H 1,40 (3H, s)	1,34 (s)	1,41 (3H, s)	1,41 (3H, s)
13-H 1,32 (3H, 7,0)	1,28 (d, 6,9)	1,34-1,32 (3H, d, 6,9)	1,35 (3H, d, 7,0)

³¹⁶ Immig et al. 2001³¹⁷ Ramadan et al. 2006³¹⁸ Flaskamp et al. 1982

Abbildung 33 zeigt das vollständige ^1H -NMR-Spektrum und die Strukturformel von Matricin.

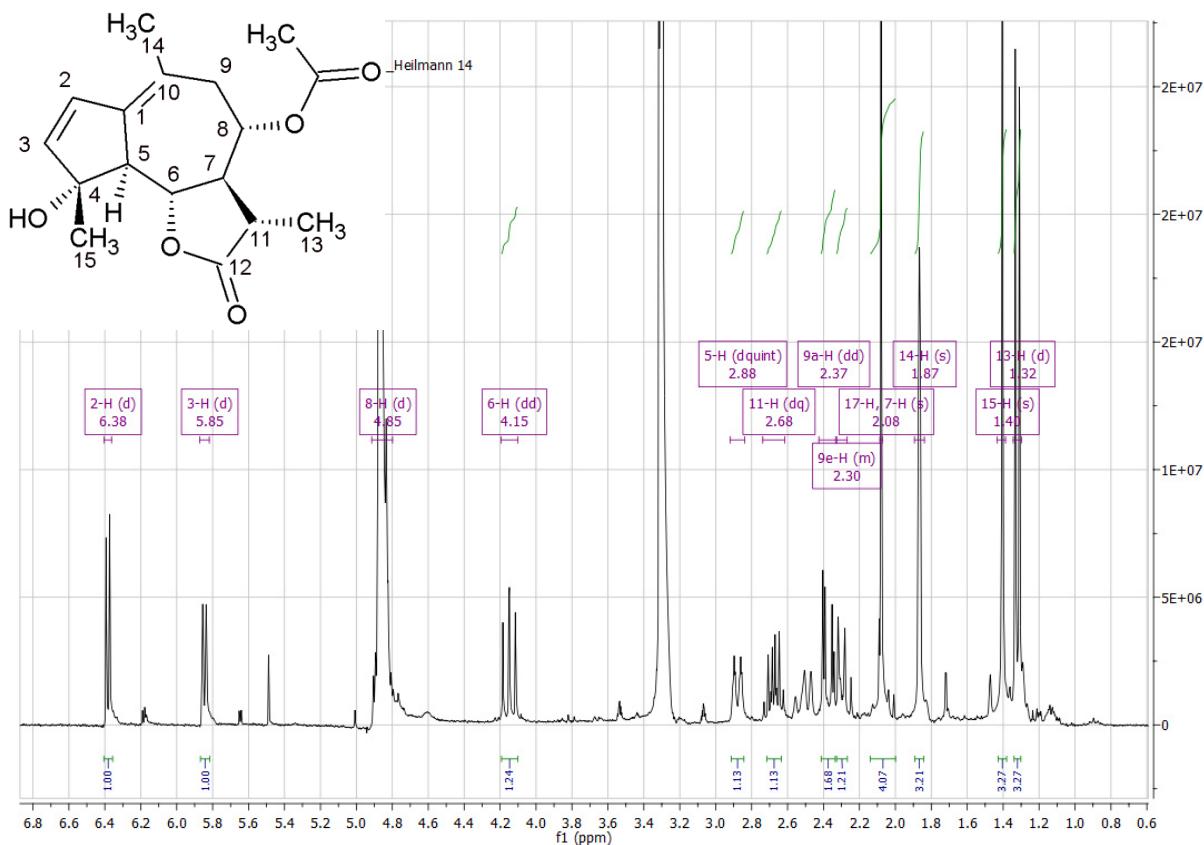


Abbildung 33: ^1H -NMR-Spektrum (300 MHz, in CD_3OD , T = 295 K) und die Strukturformel von Matricin.

B.3.1.1.4 Problematik der Matricinisolierung

Matricin erwies sich in kristalliner und gelöster Form als sehr instabil v.a. gegenüber Säuren. Allein durch die Nähe von H_2SO_4 -haltigen Sprühreagenzien und deren Vernebelung im Laborabzug zersetzte sich das in den Flash-Fraktionen gelöste Matricin (deutliche Blaufärbung). Auch durch Lösen in CDCl_3 für die NMR-Messungen verfärbte sich die anfangs klare Lösung gelblich-grün und später blau. Dies zeigte sich auch dünnenschichtchromatographisch. Abbildung 34 verdeutlicht die Instabilität von Matricin in CDCl_3 . Spur 1 zeigt frisch isoliertes Matricin in MeOH, Spur 2 Matricin der gleichen Isolierung in CDCl_3 und Spur 3 altes, bereits teilweise zersetzes Matricin. Die Zersetzung von Matricin (wahrscheinlich eine Dehydratisierung, vgl. DC-MS) in CDCl_3 ist deutlich erkennbar. In MeOH, EtOH bzw. in DMSO gelöst und Lagerung bei -80 °C wurde allerdings keine Zersetzung beobachtet.

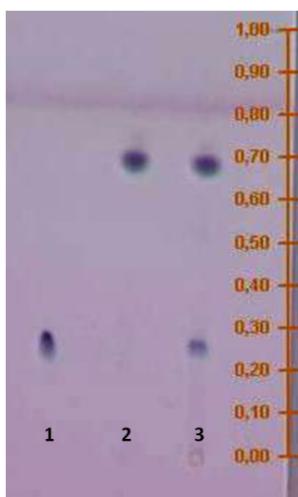


Abbildung 34: Instabilität von Matricin in CDCl_3 . Aufgetragen sind frisch isoliertes Matricin in MeOH gelöst (1), das gleiche Matricin in CDCl_3 gelöst (2) und altes, bereits teilweise zersetzes Matricin. NP-DC, Fließmittel: DCM/tBME 5:1, Laufhöhe: 8 cm, keine Kammersättigung, Derivatisierung: AA-Reagenz, 5 min 100 °C, Dokumentation: vis.

Auch im $^1\text{H-NMR}$ -Spektrum wurde die Instabilität von Matricin sichtbar. Abbildung 35 zeigt einen charakteristischen Ausschnitt eines Spektrums von frisch isoliertem Matricin (hellblau) in CDCl_3 . Nach Abblasen des Lösungsmittels im Stickstoffstrom war bereits eine gelbliche Verfärbung der Kristalle erkennbar. Nach 2 Tagen Lagerung bei -20 °C wurde nochmals ein Spektrum in CDCl_3 vermessen (rot). Die Lösung war bereits gelb-grün verfärbt. Die Signale des Matricins waren verschwunden.

Feb29-2012
Flemming,Matricin_Kath.2
rau_PROTONLF_64 CDCl₃ {C:\Bruker\TOPSPIN2.1PL3} AK_Heilmann 19
1 1

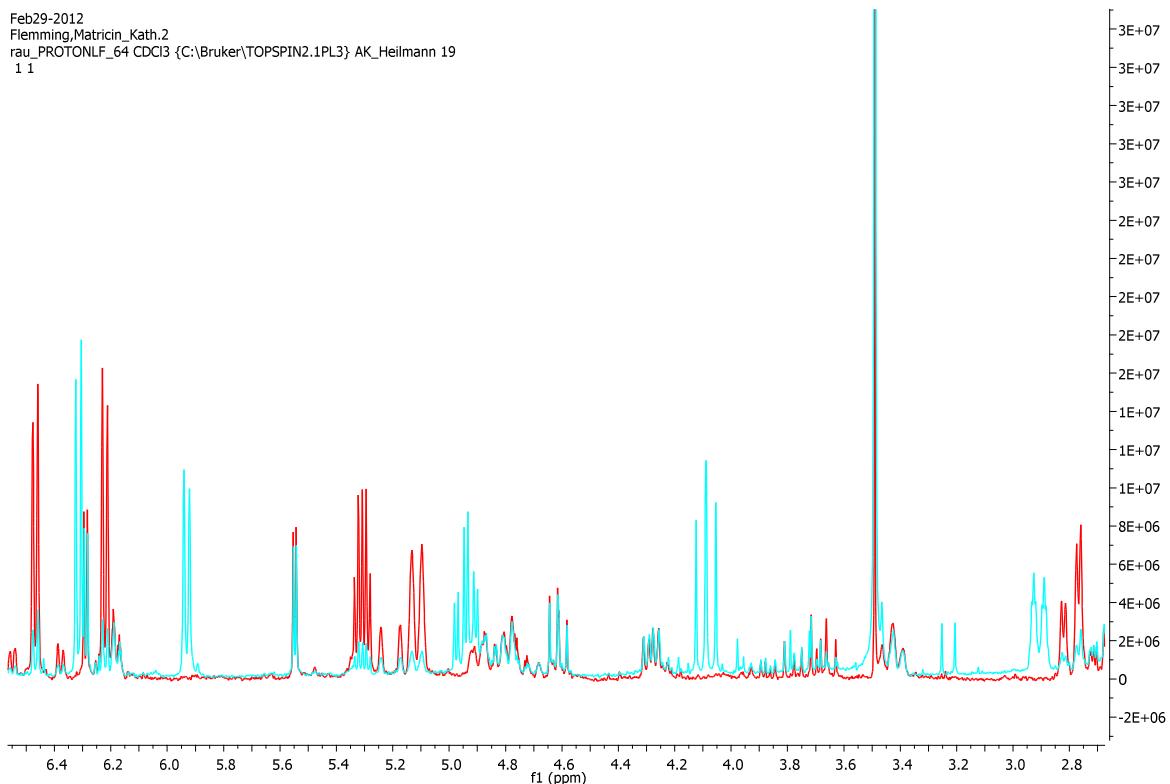


Abbildung 35: Vergleich je eines Ausschnitts der ¹H-NMR-Spektren (300 MHz, in CD₃OD, T = 295 K) von Matricin (blau) und der gleichen Lösung nach 2 Tagen Alterung (rot).

B.3.1.2 Isolierung von 8-Desacetyl-8-angeloyl-4-*epi*-matricin

B.3.1.2.1 Chromatographische Isolierung von 8-Desacetyl-8-angeloyl-4-*epi*-matricin

Die Extraktion von 200 g Schafgarbenkraut mit Et₂O ergab nach Abdestillieren des Lösungsmittels 4,1 g Rohextrakt (100%). Nach Entfetten mit MeOH und Abdestillieren des Lösungsmittels verblieben 3,3 g (8,5%). Die Fraktionierung des entfetteten Extraks mit einer offenen Kieselgelsäule ergab 8 Fraktionen (B-KI bis B-KVI, B-KR1 und B-KR2). Abbildung 36 zeigt eine Übersichts-DC der Fraktionierung. EP-positive, blaue Banden zeigen Proazulene an.³¹⁹

³¹⁹ Stahl und Schild 1986

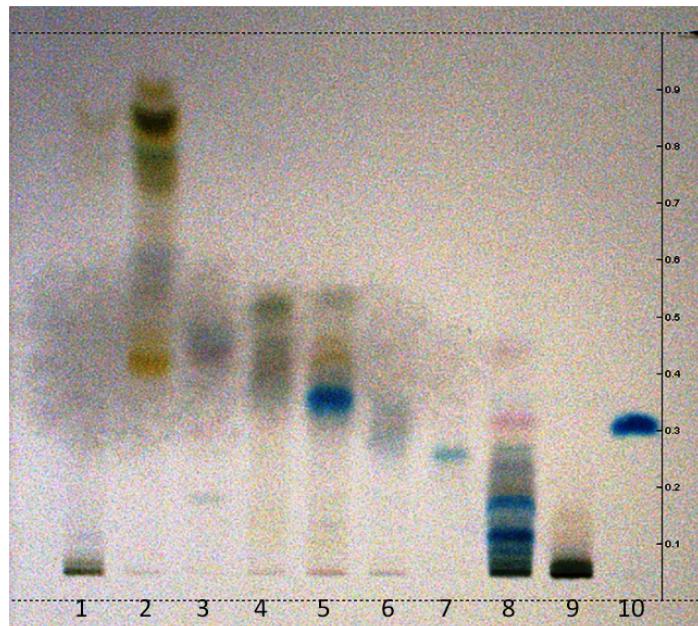


Abbildung 36: Übersichts-DC der Fraktionierung des Schafgarbenkrautextrakts mittels offener Kieselgelsäule. Aufgetragen sind der entfettete Extrakt (1), die Fraktionen B-KI bis B-KVI (2-7), B-KR1 (8), B-KR2 (9) und Matricin (10). NP-DC, Fließmittel: DCM/Aceton 9:1, Laufhöhe: 8 cm, keine Kammersättigung, Derivatisierung: EP-Reagenz, 3 min 100 °C anschließend EtOH, Dokumentation: vis.

Fraktion B-KIV (120 mg, vereinigt aus K1: 390-480 ml und K2: 330-418 ml) (5. Spur) wurde mittels Al_2O_3 -Säulenchromatographie weiter aufgetrennt. Dabei ergaben sich 5 Fraktionen (B-KIV-AI bis B-KIV-AIV und ein Rest B-KIV-AR). Abbildung 37 zeigt die DC der Fraktionierung.

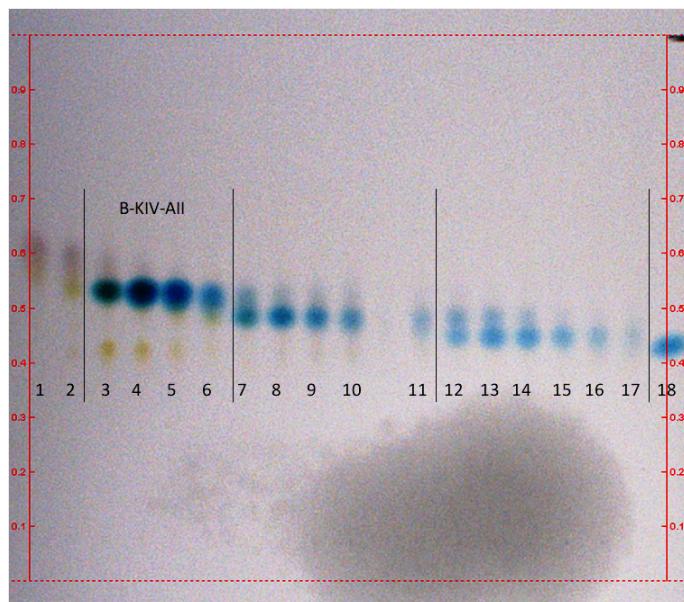


Abbildung 37: Übersichts-DC der Fraktionierung der Fraktion B-KIV mittels offener Al_2O_3 -Säule. Aufgetragen sind die Fraktionen 26, 28, ..., 58 (1-17) und Matricin (18). Eingetragen sind außerdem die Grenzen der vereinigten Fraktionen. Die Fraktionen 29-36 ergaben B-KIV-AII. Stationäre Phase: NP, Fließmittel: Hexan/Aceton 6:4, Laufhöhe: 8 cm, keine Kammersättigung, Derivatisierung: EP-Reagenz, 3 min, 100 °C anschließend EtOH, Dokumentation: vis.

EP-positive Fraktionen wurden vereinigt zu B-KIV-AII (Fr. 29-36, ca. 29-36 ml) 9 mg, B-KIV-AIII (Fr. 37-46, ca. 37-46 ml) 7 mg und B-KIV-AIV (Fr. 47-60, ca. 47-60 ml) 13 mg. Die Fraktion B-KIV-AII wurde mittels präparativer HPLC weiter aufgereinigt. Abbildung 38 zeigt exemplarisch ein Chromatogramm bei $\lambda = 238$ nm. Die Substanz, welche bei 27 min eluierte, wurde als Hauptkomponente abgetrennt und ergab eine Masse von 7,8 mg (B-KIV-AII-HPLC).

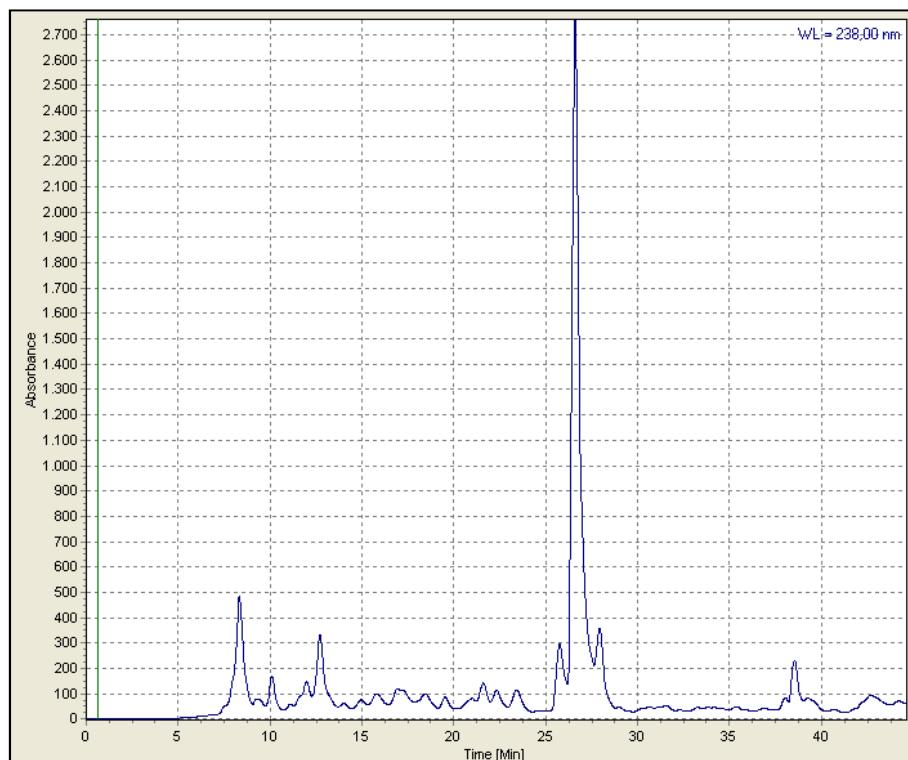


Abbildung 38: Chromatogramm der Aufreinigung der Fraktion B-KIV-AII mittels präparativer HPLC. Die Substanz der Retentionszeit von 27 min wurde abgetrennt. $\lambda = 238$ nm.

Abbildung 39 gibt eine schematische Übersicht über die Fraktionierung des Et₂O-Schafgarbenkrautextrakts bzw. die Isolierung von B-KIV-AII-HPLC.

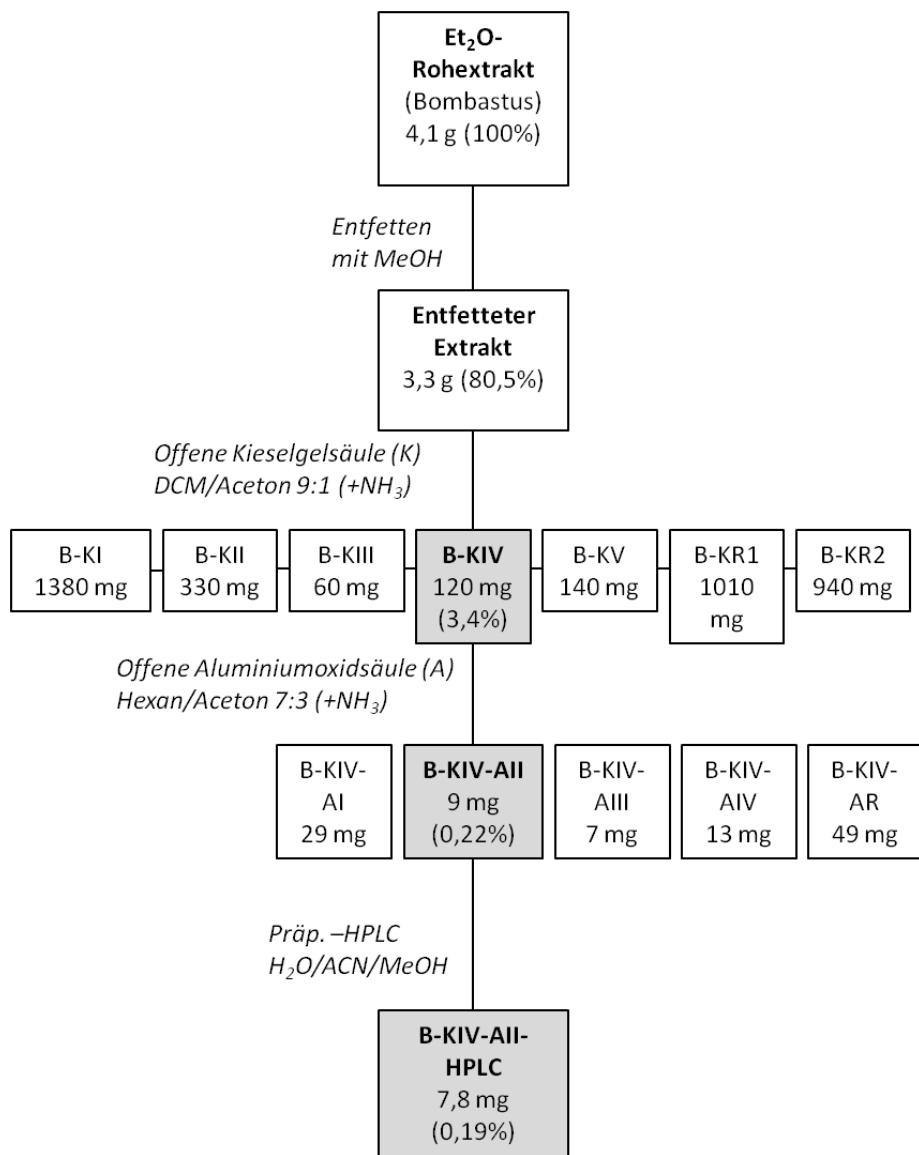


Abbildung 39: Schematische Darstellung der Fraktionierung eines Et₂O-Schafgarbenkrautextrakts mittels Kieselgel- und Aluminiumoxid-Säulenchromatographie und präparativer HPLC.

B.3.1.2.2 Identifizierung von Fraktion B-KIV-AII-HPLC als 8-Desacetyl-8-angeloyl-4-epi-matricin

Ergebnis der DC-MS des Schafgarbenkrautextrakts

Das niedrig aufgelöste Massenspektrum (EI, 70 eV) der in Abbildung 40 markierten DC-Bande (entspricht B-KIV) bei R_F = 0,38 des entfetteten Schafgarbenkrautextrakts zeigte ein Signal von m/z (% relative Intensität): 346,3 [M]⁺ (8,03%), mit Basispeak m/z (% relative Intensität): 55,1 (100%). Dies gab einen ersten Hinweis auf das Vorhandensein von 8-Desacetyl-8-

angeloyl-4-*epi*-matricin (berechnet $M = 346,417$ g/mol). Abbildung 40 zeigt die zur MS verwendete DC.

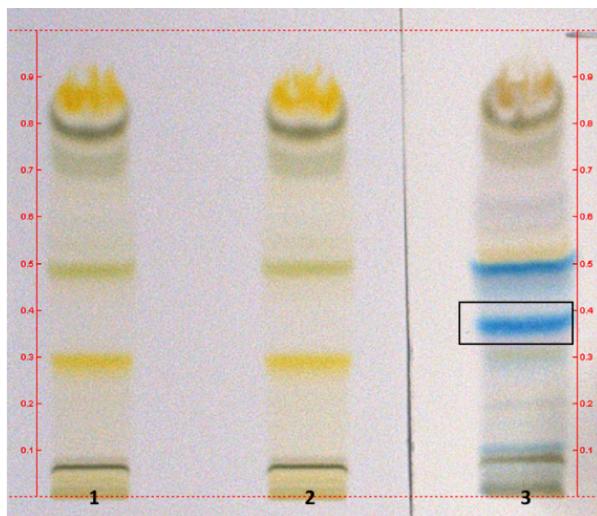


Abbildung 40: Die für die DC-MS verwendete DC. Es wurden 3 Spuren des entfetteten Et₂O-Schafgarbenkrautextrakt (1-3) aufgetragen. Stationäre Phase: NP-DC, Fließmittel: DCM/Aceton 9:1, Laufhöhe: 8 cm, keine Kammersättigung, Derivatisierung: keine (1,2); EP-Reagenz, 3 min, 100 °C anschließend EtOH (3), Dokumentation: vis.

Ergebnisse des hochauflösenden Massenspektrums von B-KIV-AII-HPLC

Das hochaufgelöste ESI-Massenspektrum der Substanz B-KIV-AII-HPLC ergab folgende Hauptsignale der Quasi-Molekülionen von m/z (% relative Intensität): Fragment 229,1222 [$M + H$]⁺ (100%) der Masse 228,1149 mit der berechneten Summenformel C₁₅H₁₆O₂ (Score: 99,74); Quasi-Molekülion 364,2112 [$M + NH_4$]⁺ (1,71%) der Molekülmasse 346,1733 ; Quasi-Molekülion 369,1670 [$M+Na$]⁺ (9,75%) der Masse 346,1779 mit der berechneten Summenformel C₂₀H₂₆O₅ (Score: 98,67); Quasi-Molekülion 392,2428 [$M + 2Na$]⁺ (8,43%) der Molekülmasse 346,2644; Quasi-Molekülion 405,2384 [$M + NH_4 + ACN$]⁺ (5,34%) der Molekülmasse 346,1486; Quasi-Molekülion 715,345 [2M + Na]⁺ (12,51%) der Molekülmasse 346,1779. Tabelle 20 fasst die Ergebnisse zusammen.

Tabelle 20: Übersicht der Daten des ESI-Massenspektrums von B-KIV-AII-HPLC.

m/z	relative Intensität [%]	Quasi-Molekülion (Auflagerung)	Molekülmasse	Summenformel
229,1222	100	[M + 1] ⁺ (H)	228,1149	C ₁₅ H ₁₆ O ₂
364,2112	1,71	[M + 18] ⁺ (NH ₄)	346,1733	
369,1670	9,75	[M + 23] ⁺ (Na)	346,1779	C ₂₀ H ₂₆ O ₅
392,2428	8,43	[M + 46] ⁺ (2Na)	346,2644	
405,2384	5,34	[M + 59] ⁺ (NH ₄ + ACN)	346,1486	
715,3450	12,51	[2M + 23] ⁺ (Na)	346,1779	

Abbildung 41 zeigt eine mögliche Fragmentierung von 8-Desacetyl-8-angeloyl-4-*epi*-matricin.

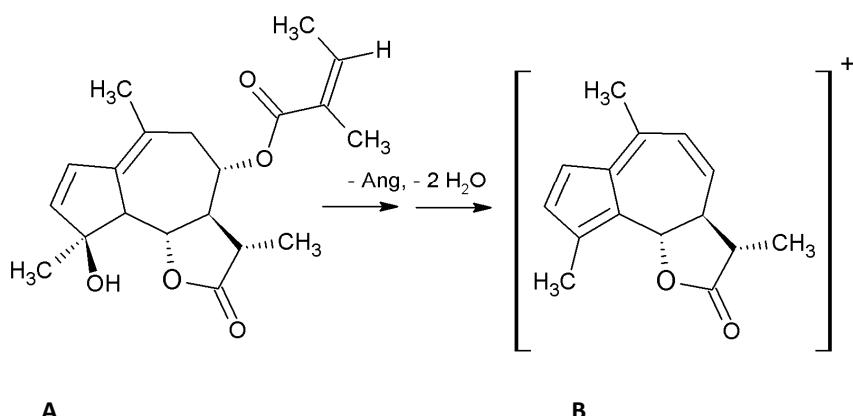


Abbildung 41: Mögliche Fragmentierung von (A) 8-Desacetyl-8-angeloyl-4-*epi*-matricin ($C_{20}H_{26}O_5$, Masse berechnet: $M = 346,417$ g/mol) zum (B) Fragment $C_{15}H_{16}O_2$ (Masse berechnet: $M = 228,28634$ g/mol). Beide Massen fanden sich im Massenspektrum von B-KIV-AII-HPLC.

Die MS Daten stehen im Einklang mit der Summenformel und die Fragmentierung mit der Struktur von 8-Desacetyl-8-angeloyl-4-*epi*-matricin.

¹H-NMR-Spektroskopie

Das ^1H -NMR-Spektrum der isolierten Substanz B-KIV-AII-HPLC wurde mit Daten aus der Literatur verglichen. Trotz des unterschiedlichen Lösungsmittels, kann davon ausgegangen werden, dass es sich bei der isolierten Verbindung um 8-Desacetyl-8-angeloyl-4-*epi*-matricin handelt, da die Werte mit den Literaturwerten weitgehend übereinstimmen. Tabelle 21 stellt die ermittelten Daten den Literaturwerten von 8-Desacetyl-8-angeloyl-4-*epi*-matricin und seinem strukturverwandten Tigloyl-Derivat gegenüber.^{320,321}

³²⁰ Todorova et al. 2006

³²¹ Kastner et al. 1991b

Tabelle 21: ^1H -NMR Daten von B-KIV-AII-HPLC im Vergleich mit ^1H -NMR Daten von 8-Desacetyl-8-angeloyl-4-*epi*-matricin (Todorova et al. 2006) und ^1H -NMR Daten vom strukturverwandten 8-Desacetyl-8-tigloyl-4-*epi*-matricin (Kastner et al. 1991b). I. = Integral, mult. = Multiplizität, J = Kopplungskonstante, Ang = Angeloyl, Tig = Tigloyl.

<i>Eigene Messung von B-KIV-AII-HPLC (600 MHz, CD_3OD, T = 295 K)</i>		<i>Todorova et al. (2006) ($^1\text{H-NMR}, 250 \text{ MHz, TMS, } \text{CDCl}_3$)</i>		<i>Kastner et al. (1991b) ($^1\text{H-NMR}, 400 \text{ MHz, } \text{CDCl}_3$)</i>	
H	δ_{H} (I., mult., J [Hz])	H	δ_{H} (mult., J [Hz])	H	δ_{H} (J [Hz])
2	6.51 (1H, d, 5,7)	2	6,46 (d, 5,8)	2	6,45 (5,8)
3	5.88 (1H, d, 5,6)	3	5,91 (d, 5,8)	3	5,91 (5,8)
5	2.71 (1H, d, 10,8)	5	2,67 (br d, 10,5)	5	2,67 (10,5)
6	4.25 (1H, t; 10,5)	6	4,23 (t, 10,5)	6	4,20 (10,5)
7	2.36 (1H, dd, 15,1, 2,9)	7	2,25 (m)	7	2,28 (10,5, 10,6, 11,7)
8	5.00 (1H, td, 10,7, 2,9)	8	5,00 (ddd, 2,7, 10,5, 10,5)	8	4,97 (10,6, 3,6)
9α	2,63 (1H, m)	9α	-	9α	2,54 (10,6, 15,1)
9β	2,40 (1H, m)	9β	-	9β	2,32 (15,1, 3,6)
11	2,67 (1H, dd, 11,6, 6,9)	11	2,60 (dq, 6,9, 11,0)	11	2,58 (11,7, 7,0)
13	1.27 (3H, d, 6,9)	13	1,31 (d, 6,9)	13	1,31 (7,0)
14, Ang-CH₃	1.91 – 1.89 (6H, m)	14	1,83 (s)	14	1,89
15	1.52 (3H, s)	15	1,58 (s)	15	1,57
Ang-CH ₃	2.00 (3H, dq, 7,2, 1,3)	Ang-CH ₃	2,00 (dq, 7,0, 1,5)	Tig-CH ₃	1,83
		Ang-CH ₃	1,87 (dq, 1,5, 1,5)	Tig-CH ₃	1,86

Abbildung 42 zeigt das gesamte ^1H -NMR-Spektrum von B-KIV-AII-HPLC und die Strukturformel von 8-Desacetyl-8-angeloyl-4-*epi*-matricin.

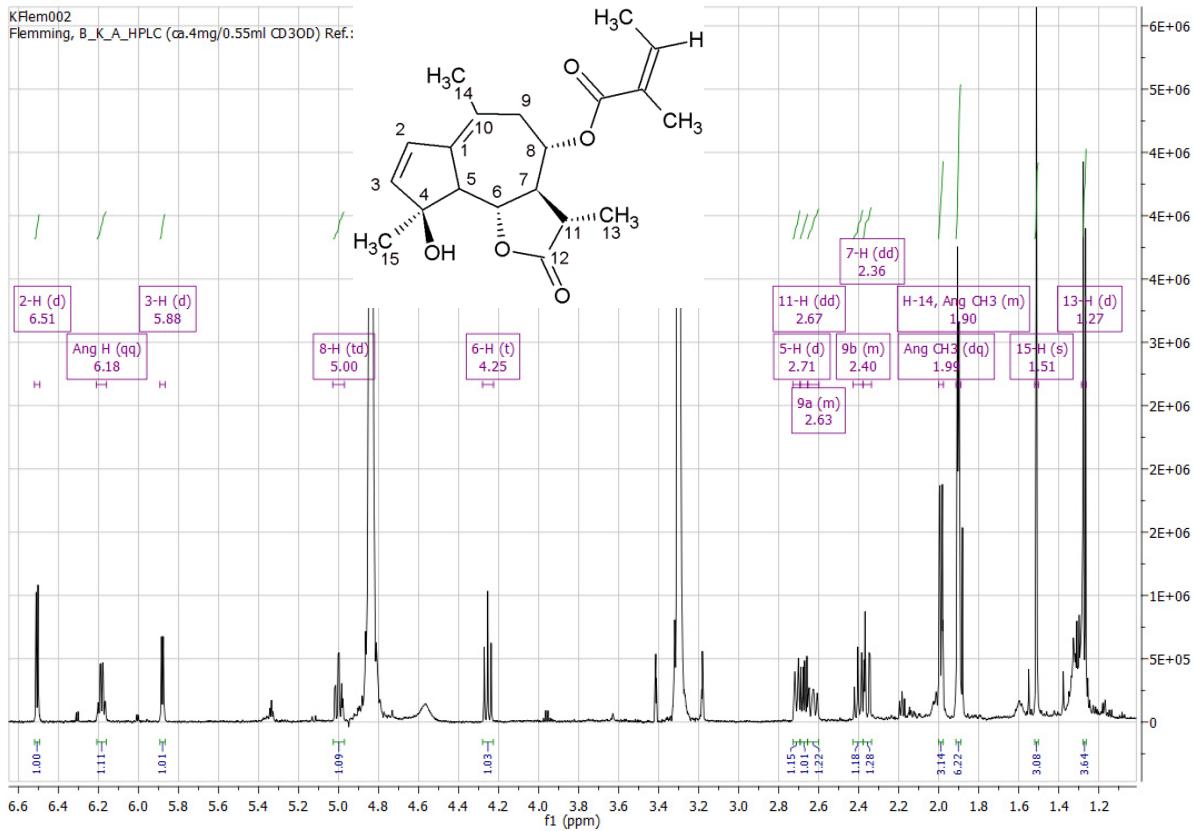


Abbildung 42: ¹H-NMR-Spektrum (600 MHz, CD₃OD, T = 295 K) von B-KIV-AII-HPLC (8-Desacetyl-8-angeloyl-4-*epi*-matricin) und zugehörige Strukturformel.

B.3.2 Pharmakologischer Teil

B.3.2.1 Pharmakologische Untersuchung des Matricins

Bei allen zellbasierten Tests wurden Lösungsmittelkontrollen durchgeführt. Bei keinem der verwendeten Tests konnte ein Einfluss des Lösungsmittels (EtOH oder DMSO) festgestellt werden. Wegen größerer Übersichtlichkeit sind die Daten der Lösungsmittelkontrollen nicht in den Graphen aufgeführt.

B.3.2.1.1 Stabilität von Matricin in ECGM

Wiederfindung

Die Peakflächen der HPLC-Analyse der beiden aufgearbeiteten Lösungen A (Matricin in PBS, 100 µM) und B (Matricin in ECGM, 100 µM) wurden verglichen. Die Wiederfindung von Matricin in B betrug 106,4% im Vergleich zu A (Tabelle 22). (Vgl. auch unter Methoden B.2.2.1.1)

Tabelle 22: Ergebnisse der Wiederfindung von Matricin in ECGM.

	Lösung A (PBS)	Lösung B (ECGM)
Gemittelte Peakfläche (n = 2)	2095430	2229007
Prozentual	100%	106,4% (zu A)

Es kann also angenommen werden, dass durch die verwendete Methode eine ausreichende Wiederfindung bei der Extraktion von Matricin aus ECGM gewährleistet ist.

Degradationskontrolle

Die Degradationskontrolle von Matricin in ECGM unter Zellkulturbedingungen (Inkubator, 37 °C) ergab einen Matricingehalt von $89,8\% \pm 3,3$ nach 24 h bezogen auf den Ausgangswert bei $t = 0$. Über einen Zeitraum von 24 h, was der Inkubationszeit der Zellen mit Matricin in den durchgeföhrten pharmakologischen Assays entspricht, ist Matricin also zu $\geq 90\%$ im Medium enthalten und stabil. Abbildung 43 zeigt den zeitlichen Verlauf der Abnahme des Matricingehalts über 30 h. Die Versuche wurde zweimal wiederholt ($n = 3$).

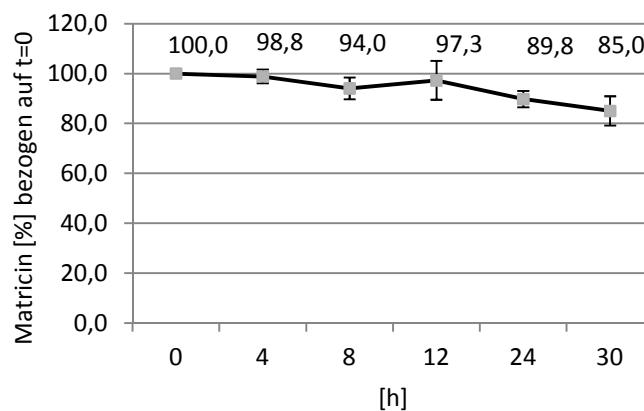


Abbildung 43: Degradationskontrolle von Matricin in ECGM über 30 h im Inkubator. $n = 3$, gezeigt sind Mittelwerte \pm Standardabweichung. (Vgl. auch unter Methoden B.2.2.1.1)

B.3.2.1.2 Einfluss von Matricin auf die Zellviabilität von HMEC-1 (MTT-Assay)

Der MTT-Assay ergab nach 24 h Inkubation keinen signifikanten, negativen Einfluss der Matricinkonzentrationen von 1, 10, 50, 75 und 100 µM auf die Zellviabilität von HMEC-1 Zellen (90.000 Zellen/Well) bezogen auf die Kontrollgruppe (100% Viabilität) (Abbildung 44). Bei Matricinkonzentrationen von 75 und 100 µM konnte sogar eine leichte Zunahme der Viabilität (auf 108,9 bzw. 107,8%) beobachtet werden. Experimente wurden in 6 Parallelen

durchgeführt und zweimal wiederholt ($n = 3$). Die Daten wurden einer einfaktoriellen ANOVA und anschließenden Post hoc Tests (Scheffé-Prozedur) unterzogen.

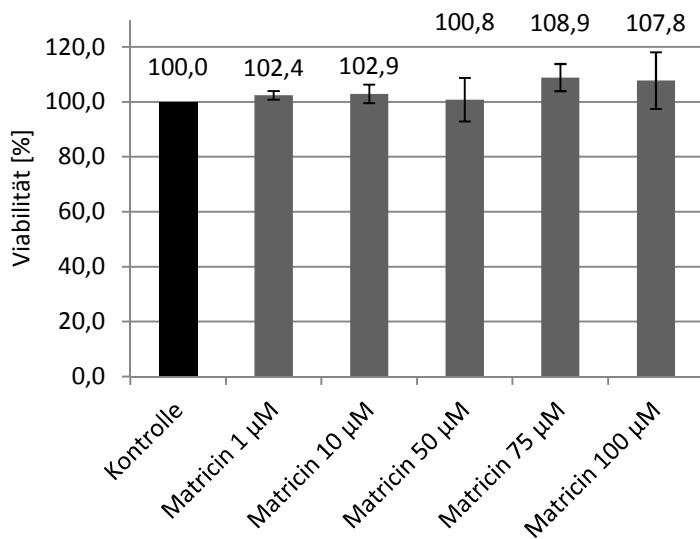


Abbildung 44: MTT-Assay durchgeführt mit HMEC-1 (90.000 Zellen/Well) und Matricinkonzentrationen von 1, 10, 50, 75 und 100 μM . Als Kontrollgruppe dienten unbehandelte Zellen. $n = 3$, 6 Parallelen, gezeigt sind Mittelwerte \pm Standardabweichung.

Der analog durchgeführte MTT-Assay mit einer Zellzahl von 15.000/Well ergab eine signifikante Abnahme der Viabilität bei einer Matricinkonzentration von 100 μM auf 82,5% bezogen auf die Kontrollgruppe (100% Viabilität) (Abbildung 45). Experimente wurden in 6 Parallelen durchgeführt und zweimal wiederholt ($n = 3$). Die Daten wurden einer einfaktoriellen ANOVA ($p \leq 0,001$) und anschließenden Post hoc Tests unterzogen (Scheffé-Prozedur). Eine Zellzahl von 15.000/Well entspricht der bei der immunfluoreszenzmikroskopischen Untersuchung der Translokation von NF- κB verwendeten Zellzahl. Es ist also eine von der Zellzahl abhängige Toxizität von Matricin bei 100 μM anzunehmen.

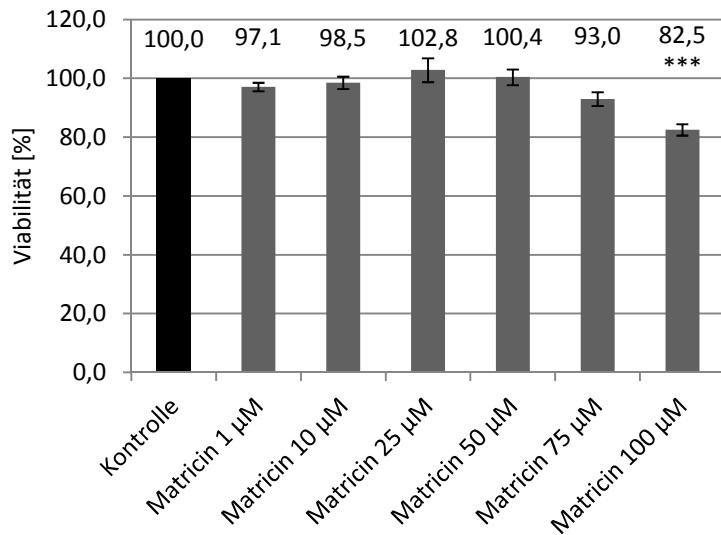


Abbildung 45: MTT-Assay durchgeführt mit HMEC-1 (15.000 Zellen/Well) und Matricinkonzentrationen von 1, 10, 50, 75 und 100 μ M. Als Kontrollgruppe dienten unbehandelte Zellen. n = 3, 6 Parallelen, *** $P \leq 0,001$, gezeigt sind Mittelwerte \pm Standardabweichung.

B.3.2.1.3 Einfluss von Matricin auf die ICAM-1-Expression bei HMEC-1

Einfluss von Matricin auf die TNF- α induzierte ICAM-1-Expression

Die durch TNF- α induzierte ICAM-1 Expression der behandelten HMEC-1 Zellen wurde von Matricin konzentrationsabhängig verringert (Abbildung 46). Parthenolid diente als Positivkontrolle (5 μ M, $p \leq 0,001$). Die Werte beziehen sich auf unbehandelte, mit TNF- α stimulierte Zellen (100%). Die Negativkontrolle zeigte einen Basiswert von 3,0% der ICAM-1-Expression. Bei einer Matricinkonzentration von 10 μ M war bereits eine leichte Inhibierung der ICAM-1-Expression zu beobachten (90,6%). Bei den Matricinkonzentrationen 50 μ M und 75 μ M zeigte sich eine signifikante Hemmung der ICAM-1-Expression von 58,3 bzw. 52,7% ($p \leq 0,001$). Im Vergleich dazu senkte Parthenolid (5 μ M) die ICAM-1-Expression auf 36,6%. Die Versuche wurden in Duplicaten durchgeführt und zweimal wiederholt (n = 3). Die Daten wurden einer einfaktoriellen ANOVA ($p \leq 0,001$) und anschließenden Post hoc Tests unterzogen (Scheffé-Prozedur).

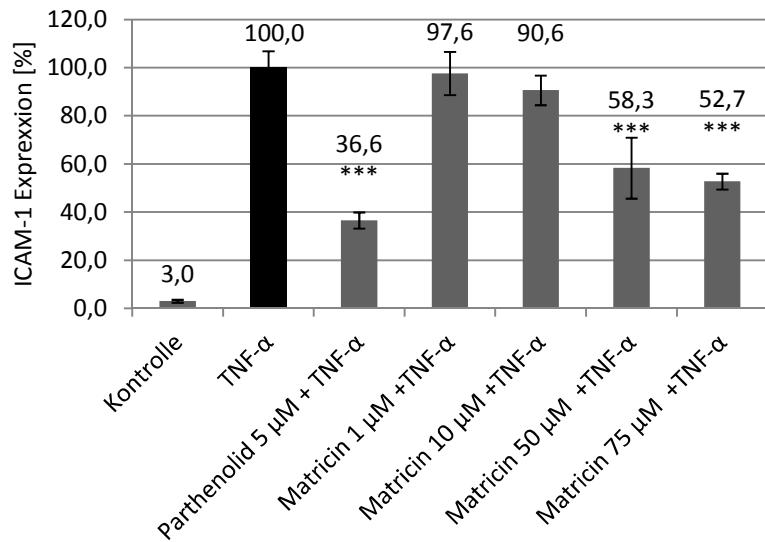


Abbildung 46: Einfluss verschiedener Matricin-Konzentration auf die TNF- α (10 ng/ml) induzierte ICAM-1-Expression bei HMEC-1. Die Kontrollgruppe (Negativkontrolle) bestand aus nicht behandelten, nicht stimulierten Zellen. Parthenolid 5 μ M diente als Positivkontrolle. Die Werte beziehen sich auf unbehandelte, mit TNF- α stimulierte Zellen (100%). n = 3, Duplikate, ***P \leq 0,001, gezeigt sind Mittelwerte \pm Standardabweichung.

Einfluss von Matricin auf die LPS induzierte ICAM-1-Expression

Die LPS induzierte ICAM-1 Expression der behandelten HMEC-1 wurde von Matricin konzentrationsabhängig verringert. Parthenolid (5 μ M, p \leq 0,001) diente als Positivkontrolle (Abbildung 47). Die Werte beziehen sich auf unbehandelte, mit LPS stimulierte Zellen (100%). Die Negativkontrolle zeigte einen Basiswert der ICAM-1-Expression von 9,9%. Bei einer Matricinkonzentration von 10 μ M war bereits eine signifikante Inhibition der ICAM-1-Expression von 73,4% zu beobachten (p \leq 0,01). Bei den Matricinkonzentrationen 25, 50 und 75 μ M sank die ICAM-1-Expression hochsignifikant (p \leq 0,001) bis auf 20,4% und damit unter den Wert der Postivkontrolle (25,9%). Die Experimente wurden zweimal, jeweils in Duplikaten wiederholt (n = 3). Die Daten wurden einer einfaktoriellen ANOVA (p \leq 0,001) und anschließenden Post hoc Tests (Scheffé-Prozedur) unterzogen.

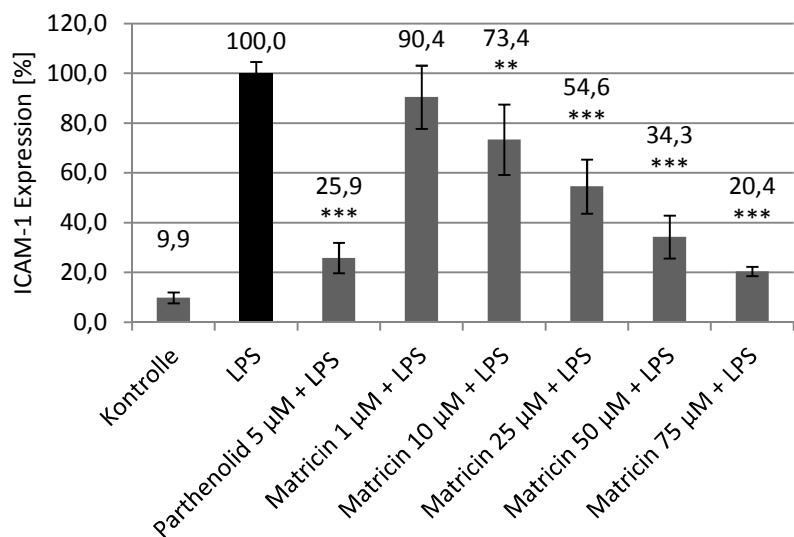


Abbildung 47: Einfluss verschiedener Matricin-Konzentration auf die LPS (1 μ g/ml) induzierte ICAM-1-Expression in HMEC-1. Die Kontrollgruppe (Negativkontrolle) bestand aus nicht behandelten, nicht stimulierten Zellen. Parthenolid 5 μ M diente als Positivkontrolle. Die Werte beziehen sich auf unbehandelte, mit LPS stimulierte Zellen (100%). n = 3, Duplikate, ** $P \leq 0,01$, *** $P \leq 0,001$, gezeigt sind Mittelwerte \pm Standardabweichung.

Einfluss von Matricin auf die IFN- γ induzierte ICAM-1-Expression

Es konnte in einem Experiment zur Ermittlung der idealen Konzentration zur Aktivierung mit IFN- γ (n = 3) gezeigt werden, dass die ICAM-1-Expression mit IFN- γ konzentrationsabhängig stimuliert werden kann (Abbildung 48). Ab einer IFN- γ -Konzentration zwischen 20-50 ng/ml war eine leichte Sättigung der Aktivierung zu beobachten. Zur Durchführung des folgenden Experiments mit Testsubstanzen wurde daher eine Konzentration von 40 ng/ml IFN- γ zur Aktivierung gewählt. Die Kontrollgruppe blieb unbehauptet. Das Experiment wurde in Duplikaten durchgeführt und zweimal wiederholt. Durch die erfolgreiche Stimulierung der ICAM-1-Expression mit IFN- γ eröffnet sich die Möglichkeit den STAT-Signalweg zu untersuchen, da die ICAM-1-Expression durch IFN- γ ausschließlich über den JAK/STAT-Signalweg vermittelt wird. (vgl. B.1.4.1).

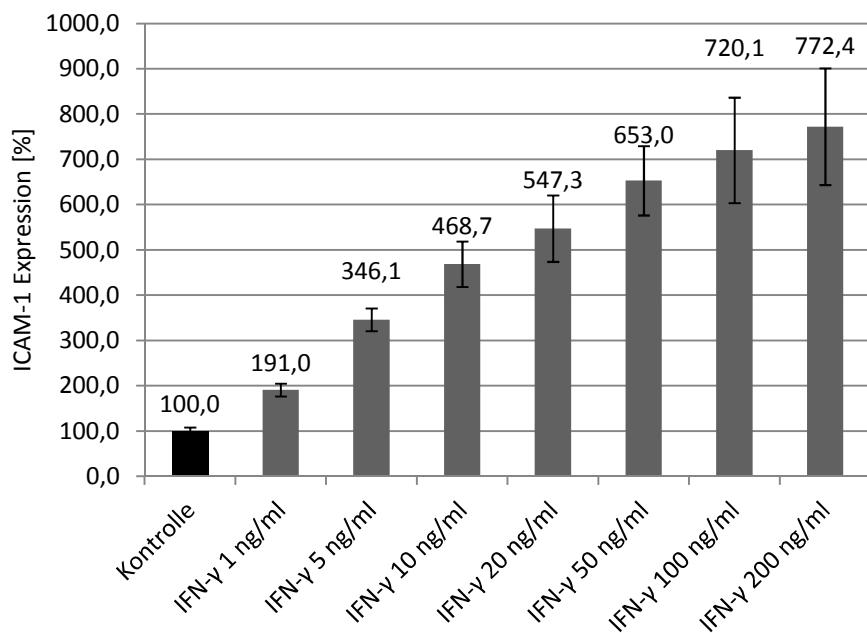


Abbildung 48: Konzentrationsabhängigkeit der ICAM-1-Expression in HMEC-1 durch Stimulierung mit IFN- γ . Als Kontrolle dienten unbehandelte Zellen (100%). n = 3, Duplikate, angegeben sind die Mittelwerte \pm Standardabweichung.

Die IFN- γ induzierte ICAM-1 Expression konnte durch die Testsubstanzen Matricin und Chamazulen (je 75 μ M) nicht vermindert werden (Abbildung 49). Parthenolid hemmte in einer Konzentration von 5 μ M die ICAM-1-Expression signifikant (85,7%). Die Werte beziehen sich auf unbehandelte, mit IFN- γ stimulierte Zellen (100%). Die Negativkontrolle zeigte einen Basiswert von 18,6% der ICAM-1-Expression. Das Experiment wurde in Duplikaten durchgeführt und zweimal wiederholt (n = 3). Die Daten wurden einer einfaktoriellen ANOVA und anschließenden Post hoc Tests (LSD-Test) unterzogen.

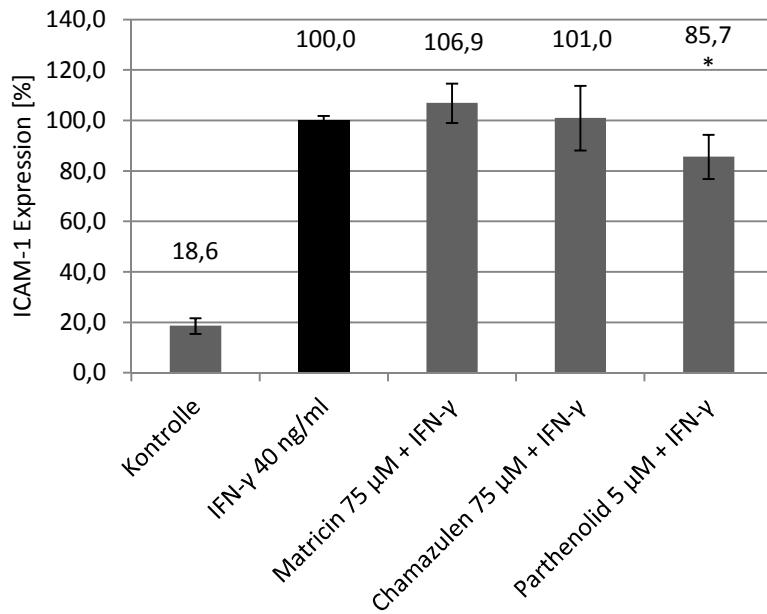


Abbildung 49: Einfluss von Matricin und Chamazulen der Konzentration 75 µM auf die IFN- γ (40 ng/ml) induzierte ICAM-1-Expression von HMEC-1. Die Kontrollgruppe (Negativkontrolle) bestand aus nicht behandelten, nicht stimulierten Zellen. Parthenolid 5 µM diente als Positivkontrolle. Die Werte beziehen sich auf unbehandelte, mit IFN- γ stimulierte Zellen (100%). n = 3, Duplikate, *P ≤ 0,05, angegeben sind die Mittelwerte ± Standardabweichung .

B.3.2.1.4 *Einfluss von Matricin auf die TNF- α induzierte NF- κ B-Translokation bei HMEC-1*

Die Stimulierung von HMEC-1 mit TNF- α einer finalen Konzentration von 20 ng/ml für 1 h bewirkte eine deutlich erhöhte Translokation von NF- κ B in den Zellkern. Die Translokation von NF- κ B bei den nicht mit TNF- α stimulierten Zellen unterblieb. Matricin verringerte die Translokation von NF- κ B in den Konzentrationen 50 µM und 75 µM signifikant (p ≤ 0,05) auf 74,0 bzw. 74,4% bezogen auf unbehandelte, mit TNF- α stimulierte Zellen (100%) (Abbildung 50). Bereits eine Matricinkonzentration von 10 µM bewirkte eine signifikante Senkung der NF- κ B-Translokation auf 86,0%. Parthenolid wurde als Vergleichssubstanz mit vermessen und verringerte die NF- κ B-Translokation signifikant in einer Konzentration von 5 µM auf 90,6 %. Die Negativkontrolle wurde auf den Wert Null gesetzt. Die Versuche wurden in Duplikaten durchgeführt und zweimal wiederholt (n = 3). Die Daten wurden einer einfaktoriellen ANOVA (p ≤ 0,001) und anschließenden post hoc Tests unterzogen (LSD-Test).

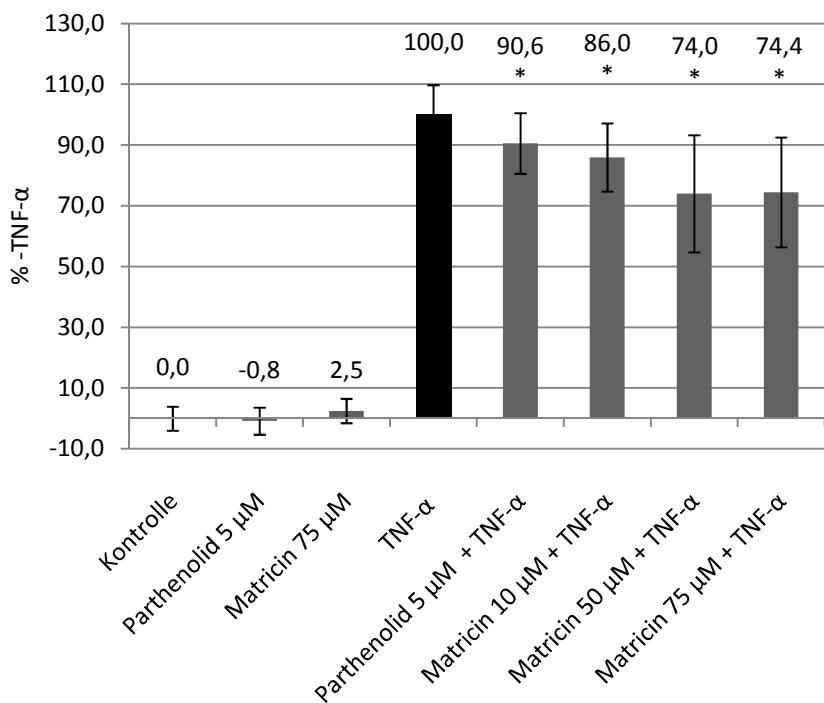


Abbildung 50: Einfluss von Matricin auf die TNF- α aktivierte Translokation von NF- κ B vom Zytoplasma in den Zellkern bei HMEC-1. Die Kontrollgruppe (Negativkontrolle) bestand aus nicht behandelten, nicht stimulierten Zellen. Parthenolid diente als Vergleichssubstanz. Die Werte beziehen sich auf unbehandelte, mit TNF- α stimulierte Zellen (100%). Die Negativkontrolle wurde auf den Wert Null gesetzt. n = 3, Duplikate, * p \leq 0,05, gezeigt sind Mittelwerte \pm Standardabweichung.

Abbildung 51 zeigt exemplarisch einen Vergleich von fluoreszenzmikroskopischen Aufnahmen von unbehandelten, mit TNF- α stimulierten, und stimulierten, mit Parthenolid (5 μ M) bzw. Matricin (75 μ M) behandelten HMEC-1 Zellen. In der Kontrollgruppe (unaktiviert, unbehandelt) ist deutlich zu erkennen, dass sich das fluoreszenzmarkierte NF- κ B so gut wie nur im Zytoplasma der Zellen befindet. Die Zellkerne zeigen keine Fluoreszenz. Dagegen ist in den mit TNF- α stimulierten Zellen eine deutliche Translokation des fluoreszenzmarkierten NF- κ B zu sehen. Die Zellkerne zeigen nun eine hohe Fluoreszenzintensität, wohingegen die Fluoreszenz von NF- κ B im Zytoplasma deutlich abgenommen hat. Bei den mit Parthenolid bzw. Matricin behandelten Zellen ist die Translokation von NF- κ B vom Zytoplasma in den Zellkern deutlich vermindert. Dies kann man, wenn man diese Zellen mit den nur mit TNF- α aktivierten Zellen vergleicht, an der verminderten Fluoreszenzintensität von NF- κ B im Zellkern bzw. der erhöhten Fluoreszenzintensität im Zytoplasma erkennen.

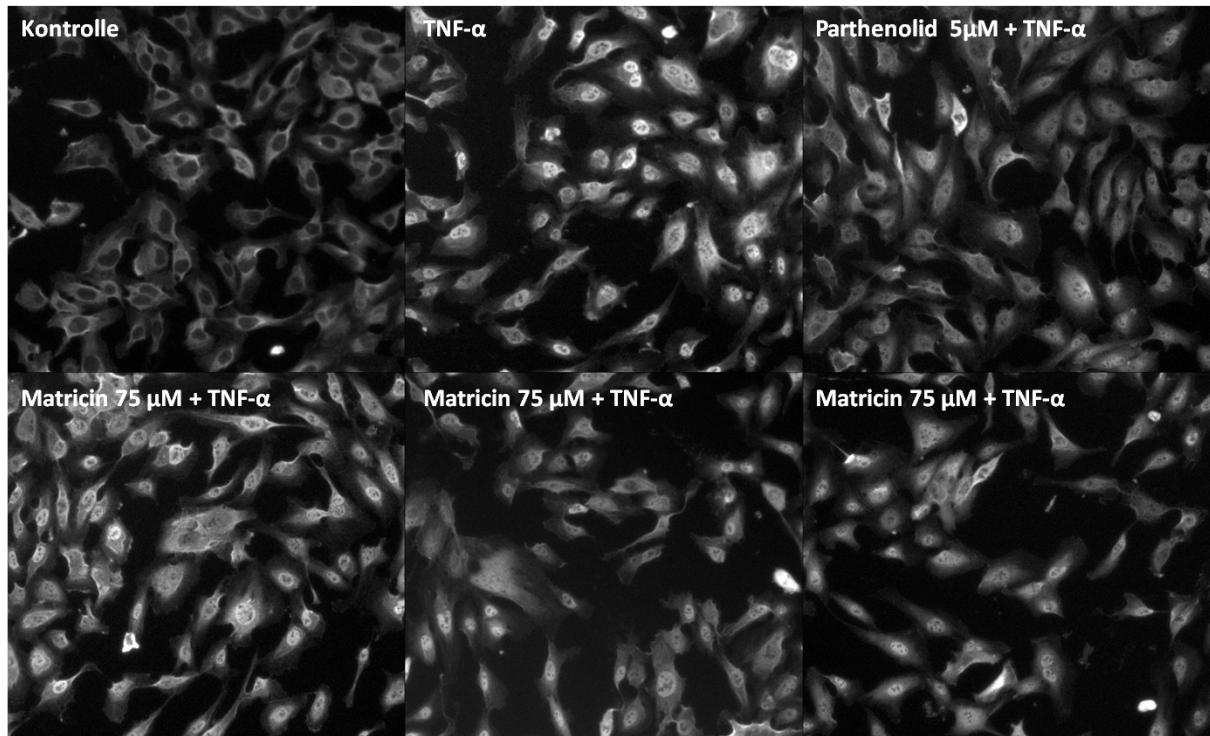


Abbildung 51: Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen von HMEC-1 Zellen nach Immunfluoreszenzfärbung mit gelabelten Antikörpern gegen NF-κB (hell im Bild), 100-fache Vergrößerung. Zu erkennen sind die Intensitätsunterschiede der Fluoreszenz zwischen Zytoplasma und Zellkern. In der Kontrollgruppe befindet sich NF-κB v.a. im Zytoplasma und wird durch TNF-α Stimulierung in den Kern transloziert. Die Translokation ließ sich mit Parthenolid und Matricin teilweise inhibieren.

B.3.2.1.5 Einfluss von Matricin auf die NF-κB-Promotoraktivität (Reportergen-Assay)

Um einen möglichen Einfluss von Matricin auf die NF-κB-Promotoraktivität zu untersuchen wurde ein Reportergen-Assay in HUVEC durchgeführt. Matricin hemmte in den Konzentrationen 10, 30 und 100 μM nach insgesamt 6 h Inkubation (davon 30 min Vorinkubation ohne TNF-α) die NF-κB-Promotoraktivität im Luciferase-Assay signifikant ($p \leq 0,05$) (Abbildung 52). Es ist eine klare Dosisabhängigkeit zu erkennen. Bereits eine Matricinkonzentration von 30 μM senkte die NF-κB-Promotoraktivität auf unter 50%, eine Matricinkonzentration von 100 μM sogar auf unter 25%. Die Werte beziehen sich auf unbehandelte, mit TNF-α stimulierte Zellen (100%). Die Versuche wurden dreimal wiederholt ($n = 4$) und die Daten einer einfaktoriellen ANOVA und einem anschließenden Newman-Keuls multiple comparison Test unterzogen.

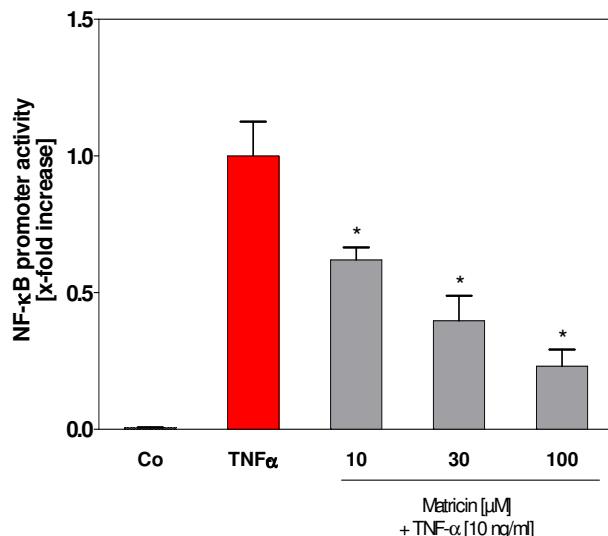


Abbildung 52: Hemmung der NF-κB-Promotoraktivität durch Matricin im Dual-Luciferase®NF-κB reporter Assay durchgeführt an HUVEC. Die Kontrollgruppe Co (Negativkontrolle) bestand aus nicht behandelten, nicht stimulierten Zellen. Die Werte beziehen sich auf unbehandelte, mit TNF- α stimulierte Zellen (100%). n = 4, *P ≤ 0,05, gezeigt sind Mittelwerte ± Standardabweichung. (Mit freundlicher Genehmigung von Simone Fuchs, Lehrstuhl Pharmazeutische Biologie, Goethe-Universität Frankfurt am Main).

B.3.2.1.6 Einfluss von Matricin auf die Zellviabilität von RAW 264.7 Zellen

Die durch Zellzahlbestimmung ermittelte Viabilität der RAW-Zellen ergab eine signifikante Abnahme der Viabilität bei einer Matricinkonzentration von 100 μ M (p ≤ 0,05) im Vergleich zur Kontrollgruppe (100%) von 12,5%. Geringere Konzentrationen hatten keine signifikanten Änderungen der Zellzahl zur Folge (Abbildung 53). Die Versuche wurden in 6 Parallelen durchgeführt und zweimal wiederholt (n = 3). Die Daten wurden einer einfaktoriellen ANOVA (p ≤ 0,001) und anschließenden Post hoc Tests unterzogen (Scheffé-Prozedur). Die Zahl der ausgesäten Zellen entsprach der des Griess-Assays.

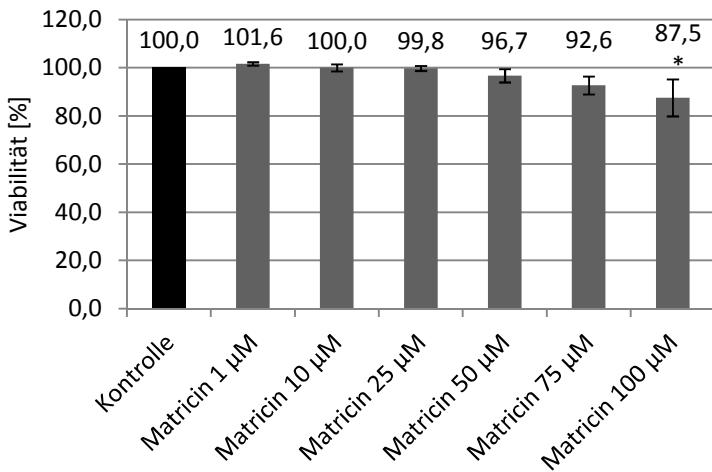


Abbildung 53: Einfluss verschiedener Matricinkonzentrationen auf die Zellzahl von RAW 264.7. Als Kontrolle dienten unbehandelte Zellen (100%). n = 3, je 6 Parallelen, * $p \leq 0,05$, gezeigt sind Mittelwerte \pm Standardabweichung.

B.3.2.1.7 Einfluss von Matricin auf die NO-Produktion bei RAW 264.7 Zellen (Griess-Assay)

Mit dem Griess-Assay wurde die Fähigkeit von Matricin ermittelt, die NO-Produktion von Makrophagen (RAW 264.7) bzw. die daraus resultierende Nitritakkumulation im Zellüberstand, zu beeinflussen. Die Nitrit-Konzentration wurde im Zellüberstand nach 24 h Inkubation durch Matricin in den Konzentrationen 25, 50, 75 und 100 μM signifikant und konzentrationsabhängig verringert (Abbildung 54). Bereits eine Matricinkonzentration von 25 μM senkte die Nitritmenge im Zellüberstand signifikant auf 46,1%. Bei einer Konzentration von 100 μM Matricin kann man bei einer Senkung auf 1,9% praktisch von einer totalen Inhibierung der Nitritakkumulation sprechen. Als Kontrolle dienten unbehandelte, mit LPS stimulierte Zellen (100%). Die Versuche wurden in 8 Parallelen durchgeführt und zweimal wiederholt (n = 3). Die Daten wurden einer einfaktoriellen ANOVA ($p \leq 0,001$) und anschließenden Post hoc Tests unterzogen (Scheffé-Prozedur).

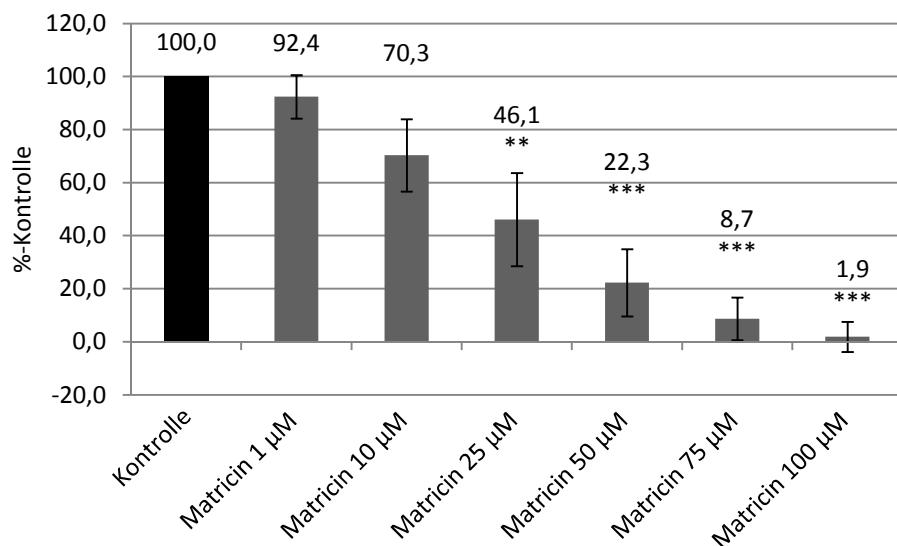


Abbildung 54: Verringerung der NO-Konzentration im Überstand von mit LPS stimulierten RAW 264.7 Zellen durch Matricin (Griess-Assay). Als Kontrolle dienten LPS stimulierte, unbehandelte Zellen (100%). n = 3, je 8 Parallelen, ** p ≤ 0,01, *** p ≤ 0,001, gezeigt sind Mittelwerte ± Standardabweichung.

Der halbgraphisch bestimmte IC₅₀-Wert für Matricin im Griess-Assay betrug 20,9 µM (Formel zur Berechnung siehe Abbildung 55). Die Funktionsgleichung wurde nach der Variablen x aufgelöst und der entsprechende Wert für y = 50 berechnet.

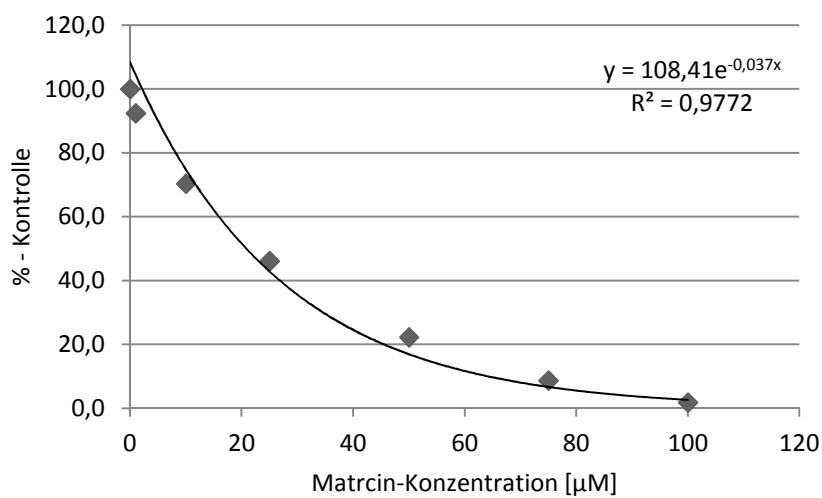


Abbildung 55: Halbgraphische Bestimmung des IC₅₀-Wertes von Matricin im Griess-Assay. Angegeben sind die Funktionsgleichung und das Bestimmtheitsmaß R².

B.3.2.2 Pharmakologische Untersuchung des Chamazulens

B.3.2.2.1 Einfluss von Chamazulen auf die Zellviabilität von HMEC-1 (MTT-Assay)

Der MTT-Assay ergab nach 24 h Inkubation keinen signifikanten Einfluss der Chamazulenkonzentrationen von 1, 10, 25, 50, 75 und 100 µM auf die Zellviabilität von HMEC-1 (15.000 Zellen/Well) bezogen auf die Kontrollgruppe (Abbildung 56). Die Zellzahl entsprach der im NF-κB Translokations-Assay verwendeten Anzahl. Experimente wurden in 6 Parallelen durchgeführt und zweimal wiederholt ($n = 3$). Die Daten wurden einer einfaktoriellen ANOVA und anschließenden Post hoc Tests (Scheffé-Prozedur) unterzogen.

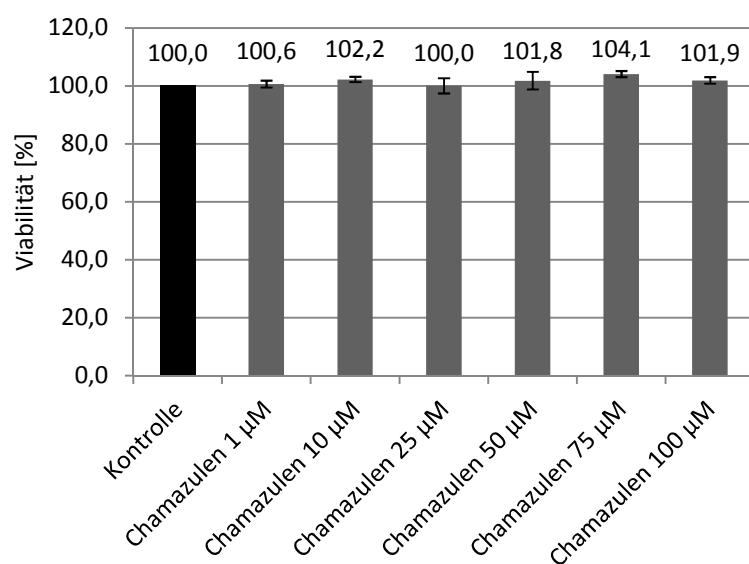


Abbildung 56: MTT-Assay durchgeführt mit HMEC-1 (15.000 Zellen/Well) und Chamazulenkonzentrationen von 1, 10, 25, 50, 75 und 100 µM. Als Kontrolle dienten unbehandelte Zellen. $n = 3$, je 6 Parallelen, angegeben sind Mittelwerte \pm Standardabweichung.

B.3.2.2.2 Einfluss von Chamazulen auf die ICAM-1-Expression bei HMEC-1

Analog zum Matricin wurde auch für Chamazulen ein ICAM-1-Assay durchgeführt. Die TNF-α (10 ng/ml) induzierte ICAM-1 Expression der behandelten HMEC-1 wurde von Parthenolid signifikant (5 µM, $p \leq 0,001$) auf 25,8% im Vergleich zu mit TNF-α stimulierten Zellen verringert während für die getesteten Chamazulenkonzentrationen 1, 10, 50 und 75 µM keine signifikante Veränderung beobachtet werden konnte (Abbildung 57). Im Gegensatz dazu zeigte Matricin für die Konzentrationen 50 und 75 µM eine Inhibition der ICAM-1-Expression (vgl. B.3.2.1.3). Die Werte beziehen sich auf unbehandelte, mit TNF-α stimulierte Zellen (100%). Die Versuche wurden in Duplicaten durchgeführt und zweimal wiederholt

(n = 3). Die Daten wurden einer einfaktoriellen ANOVA ($p \leq 0,001$) und anschließenden Post hoc Tests unterzogen (Scheffé-Prozedur).

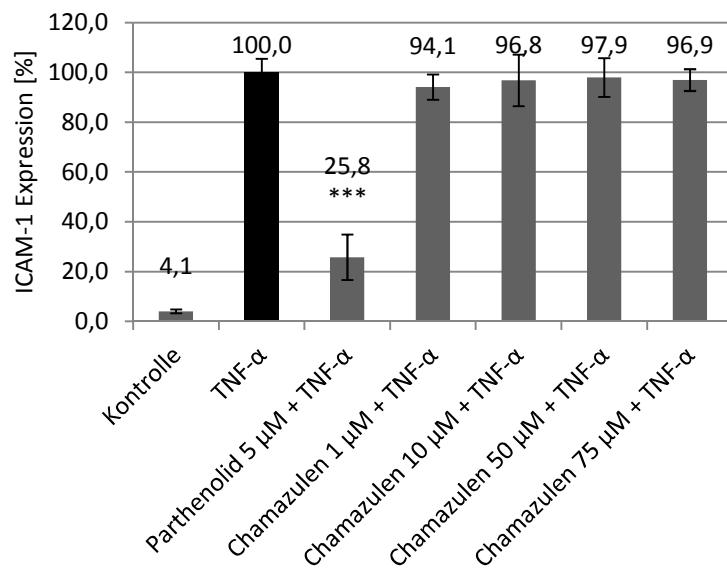


Abbildung 57: Einfluss verschiedener Chamazulen-Konzentration auf die TNF- α (10 ng/ml) induzierte ICAM-1-Expression bei HMEC-1. Die Kontrollgruppe (Negativkontrolle) bestand aus nicht behandelten, nicht stimulierten Zellen. Parthenolid 5 μ M diente als Positivkontrolle. Die Werte beziehen sich auf unbehandelte, mit TNF- α stimulierte Zellen (100%). n = 3, Duplikate, ***P $\leq 0,001$, angegeben sind Mittelwerte \pm Standardabweichung.

B.3.2.2.3 Einfluss von Chamazulen auf die TNF- α induzierte NF- κ B-Translokation bei HMEC-1

Analog zum Matricin wurde auch für das Chamazulen dessen potentieller Einfluss auf die NF- κ B-Translokation untersucht. Auch hier führte die Stimulierung von HMEC-1 mit TNF- α zu einer deutlich erhöhten Translokation von NF- κ B in den Zellkern (vgl. Matricin Abbildung 50). Chamazulen hatte im Gegensatz zum Matricin (vgl. B.3.2.1.4) in keiner der getesteten Konzentrationen (10, 50 und 75 μ M) nach einer Inkubationszeit von 1 h (davon 30 min Vorinkubation ohne TNF- α) einen signifikanten Einfluss auf die Translokation von NF- κ B im Vergleich zur unbehandelten, mit TNF- α stimulierten Zellen (100%). Parthenolid 5 μ M wurde als Vergleichssubstanz mit vermessen und zeigte eine signifikante Verringerung der Translokation von NF- κ B auf 84,9% ($p \leq 0,05$) (Abbildung 58). Die Versuche wurden in Duplikaten durchgeführt und zweimal wiederholt (n = 3). Die Negativkontrolle wurde auf den Wert Null gesetzt. Die Daten wurden einer einfaktoriellen ANOVA ($p \leq 0,001$) und anschließenden Post hoc Tests unterzogen (LSD-Test).

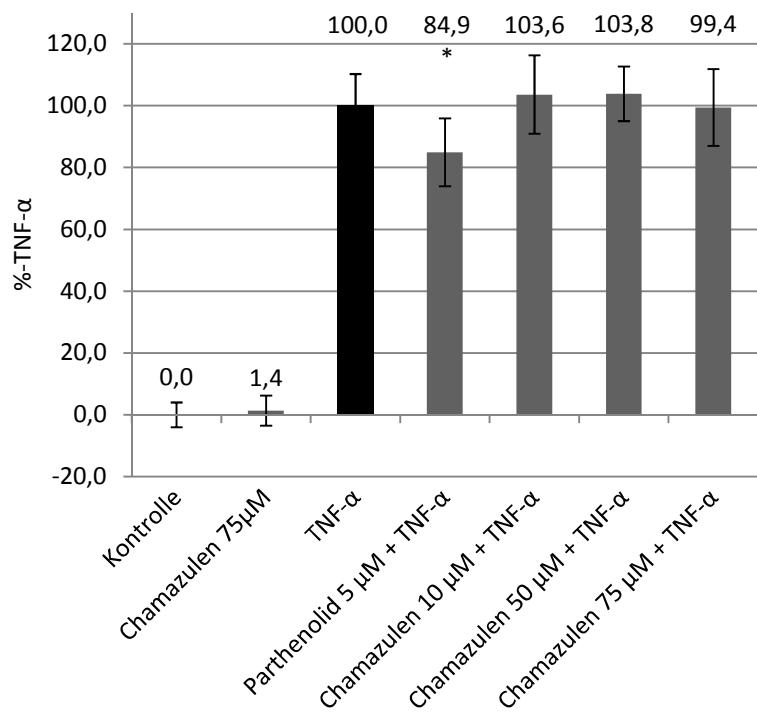


Abbildung 58: Einfluss von Chamazulen auf die TNF- α induzierte Translokation von NF- κ B vom Zytosol ins Zellkern bei HMEC-1. Die Kontrollgruppe (Negativkontrolle) bestand aus nicht behandelten, nicht stimulierten Zellen. Parthenolid diente als Vergleichssubstanz. Die Werte beziehen sich auf unbehandelte, mit TNF- α stimulierte Zellen (100%). n = 3, Duplikate, * p \leq 0,05, gezeigt sind Mittelwerte \pm Standardabweichung.

B.3.2.2.4 Einfluss von Chamazulen auf die Zellviabilität von RAW 264.7 Zellen

Die durch Zellzahlbestimmung ermittelte Viabilität der RAW 264.7-Zellen unterschied sich bei keiner der untersuchten Chamazulenkonzentrationen (1, 10, 25, 50, 75 und 100 μ M) signifikant von der der unbehandelten Kontrollgruppe (100%) (Abbildung 59). Die Versuche wurden in 6 Parallelen durchgeführt und zweimal wiederholt (n = 3). Die Daten wurden einer einfaktoriellen ANOVA und anschließenden Post hoc Tests unterzogen (Scheffé-Prozedur). Die Zahl der ausgesäten Zellen entsprach der des Griess-Assays.

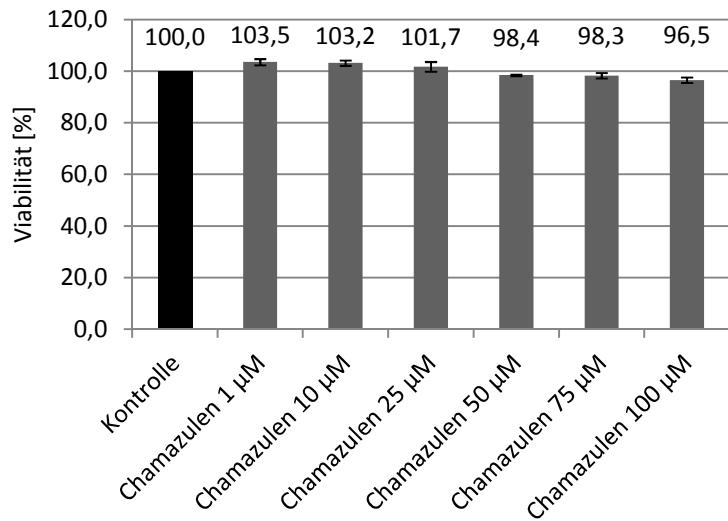


Abbildung 59: Einfluss verschiedener Chamazulenkonzentrationen auf die Zellzahl von RAW 264.7. Als Kontrolle dienten unbehandelte Zellen. $n = 3$, je 6 Parallelren, gezeigt sind Mittelwerte \pm Standardabweichung.

B.3.2.2.5 Einfluss von Chamazulen auf die NO-Produktion bei RAW 264.7 Zellen

Analog zum Matricin wurde mit dem Griess-Assay die Fähigkeit von Chamazulen ermittelt, die NO-Produktion von Makrophagen (RAW 264.7) bzw. die daraus resultierende Nitritakkumulation im Zellüberstand zu beeinflussen. Die Nitrit-Konzentration im Zellüberstand nach 24 h Inkubation wurde von Chamazulen in den Konzentrationen 50, 75 und 100 μM signifikant und konzentrationsabhängig verringert (Abbildung 60). Bereits eine Chamazulenkonzentration von 10 μM senkte die Nitritmenge auf 88,3% und 100 μM Chamazulen auf 30,2% im Vergleich zur Kontrolle. Matricin erwies sich im gleichen Experiment ähnlich konzentrationsabhängig, jedoch deutlich aktiver (vgl. B.3.2.1.7). Als Kontrollgruppe dienten unbehandelte, mit LPS stimulierte Zellen (100%). Die Versuche wurden in 8 Parallelren durchgeführt und zweimal wiederholt ($n = 3$). Die Daten wurden einer einfaktoriellen ANOVA ($p \leq 0,001$) und anschließenden Post hoc Tests unterzogen (Scheffé-Prozedur).

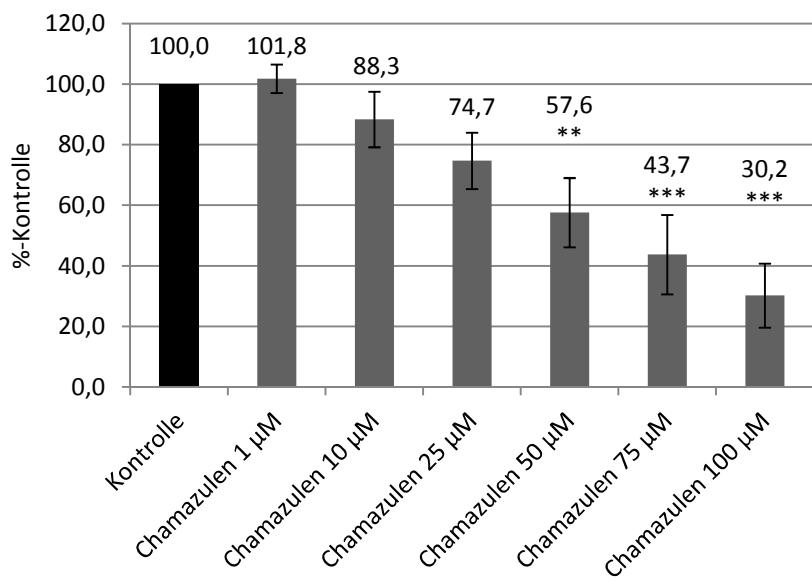


Abbildung 60: Verringerung der NO-Konzentration im Überstand von mit LPS stimulierten RAW 264.7 Zellen (Griess-Assay) durch Chamazulen. Als Kontrolle dienten LPS stimulierte aber unbehandelte Zellen (100%). n = 3, je 8 Parallelen, ** p \leq 0,01, *** p \leq 0,001, angegeben sind Mittelwerte \pm Standardabweichung.

Der halbgraphisch bestimmte IC₅₀-Wert für Chamazulen im Griess-Assay betrug 59,3 μ M (Zur Berechnung verwendete Formel siehe Abbildung 61). Die Funktionsgleichung wurde nach der Variablen x aufgelöst und der entsprechende Wert für y = 50 berechnet.

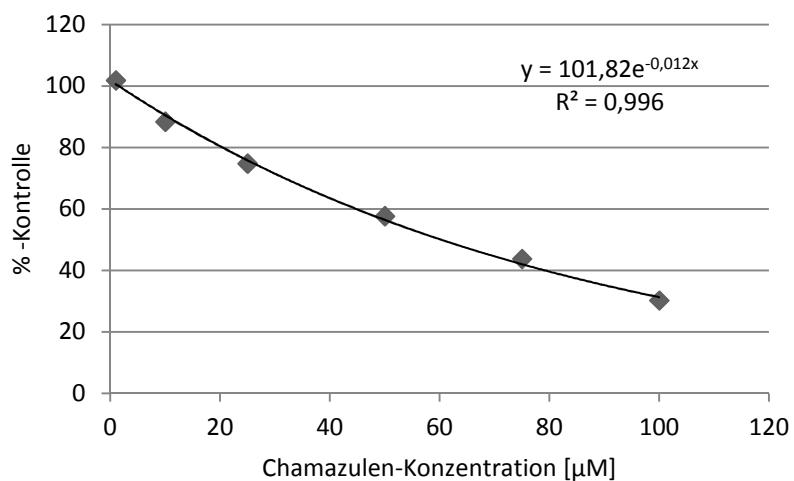


Abbildung 61: Halbgraphische Bestimmung des IC₅₀-Wertes von Chamazulen im Griess-Assay. Angegeben sind die Funktionsgleichung und das Bestimmtheitsmaß R².

B.3.2.3 Direkt vergleichende Untersuchungen von Matricin und Chamazulen

B.3.2.3.1 Einfluss von Matricin und Chamazulen auf die NO-Konzentration im SNP-Assay

Im SNP-Assay sollten Matricin und Chamazulen auf die Fähigkeit hin untersucht werden, die von SNP freigesetzten NO-Radikale bzw. die daraus entstehenden Nitritionen abzufangen. Aus Abbildung 62 ist ersichtlich, dass die Konzentration von NO bzw. daraus entstandenem Nitrit (freigesetzt aus 10 mM SNP in PBS) über einen Zeitraum von 24 h von Chamazulen (100 µM), im direkten Vergleich mit der Kontrolle und Matricin (100 µM), deutlich verringert wurde. Während die Kurven der Kontrolle und Matricin weitgehend parallel verlaufen, bleibt die Chamazulenkurve zeitweise sogar unter dem Ausgangsniveau (2 h). So sank die Kurve nach 2 h für die Kontrollgruppe und Matricin auf 92% bzw. 93,6% im Vergleich zum Ausgangswert t_0 , für Chamazulen aber auf 46,9%. Die Differenz zum Zeitpunkt t_0 ist möglicherweise durch die hohe Reaktionsgeschwindigkeit von Chamazulen mit NO zu erklären. Die Mittelwerte der Kontrollgruppe und Matricin unterschieden sich nach 24 h nicht signifikant voneinander (182,2% bzw. 178,3%), während sich beide signifikant vom Mittelwert von Chamazulen unterschieden (95,3%) (ANOVA, Scheffé-Prozedur, $p \leq 0,001$).

Das Experiment wurde in 4 Parallelen durchgeführt und dreimal wiederholt.

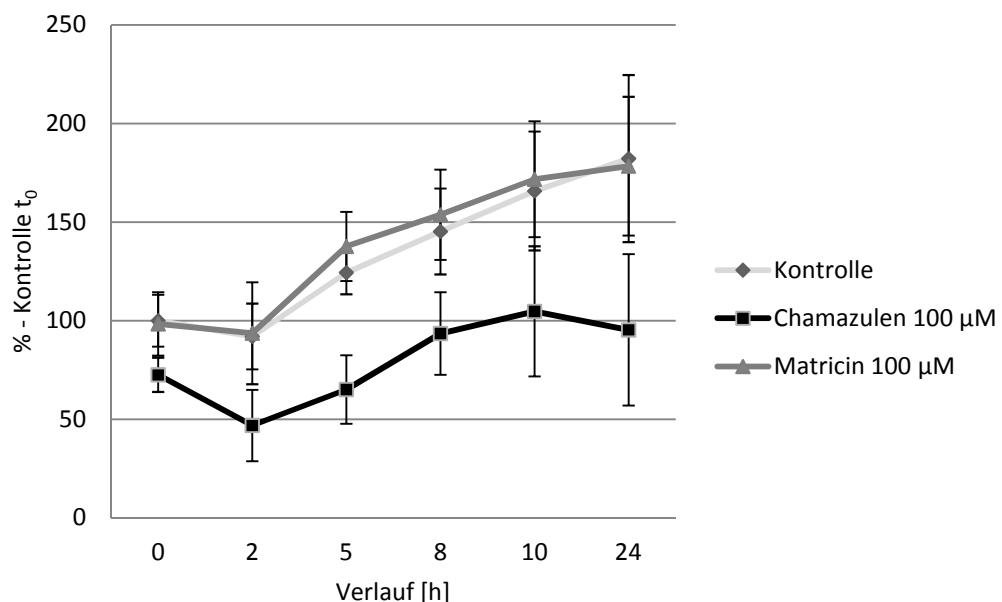


Abbildung 62: Zeitlicher Verlauf des Einflusses von Chamzulen (100 µM) und Matricin (100 µM) auf die NO-Konzentration (freigesetzt aus 10 mM SNP in PBS) prozentual zur Kontrolle zum Zeitpunkt $t = 0$ h. $n = 3$, 4 Parallelen, angegeben sind Mittelwerte \pm Standardabweichung.

B.3.2.3.2 Modifizierter Griess-Assay, Matricin und Chamazulen im Vergleich

Im modifizierten Griess-Assay konnte der zeitliche Einfluss von Matricin und Chamazulen auf die Nitritakkumulation im Zellüberstand von mit LPS stimulierten RAW 264.7-Zellen ermittelt werden. Matricin und Chamazulen senkten, im Einklang mit den oben gezeigten Ergebnissen (vgl. B.3.2.1.7 und B.3.2.2.5) bei einer Inkubationszeit von 24 h konzentrationsabhängig die LPS-induzierte Nitrit-Konzentration im Überstand von RAW 264.7-Zellen. Die Wirkung von Matricin im Vergleich zu Chamazulen war dabei deutlich stärker. Nach einer Inkubationszeit von 1 h war für Matricin keine Senkung der NO-Konzentration erkennbar, wohingegen für Chamazulen eine leicht dosisabhängige Senkung der NO-Konzentration beobachtet werden konnte (Abbildung 63). Beim Vergleich der 1 h-Werte ergab sich zwischen Matricin und Chamazulen ein signifikanter Unterschied der Konzentrationen 50 und 75 µM ($p \leq 0,05$). Während Chamazulen (75 µM) nach 1 h die Nitritkonzentration auf 65,9% reduzierte, blieb der entsprechende Matricin-Wert bei 93,5%. Chamazulen senkte also bereits nach 1 h die Nitrit-Konzentration im Griess-Assay, Matricin jedoch nicht. Als Kontrollgruppe dienten unbehandelte, mit LPS stimulierte Zellen (100%). Die Versuche wurden in 4 Parallelen durchgeführt und zweimal wiederholt ($n = 3$). Die Daten wurden einer einfaktoriellen ANOVA und anschließenden Post hoc Tests unterzogen (Scheffé-Prozedur).

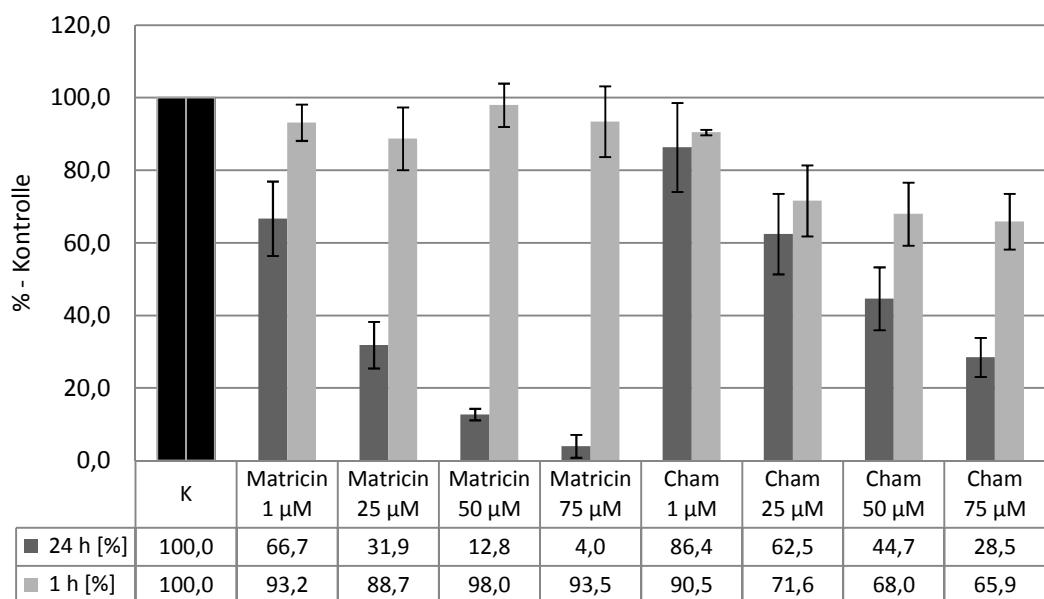


Abbildung 63: Einfluss verschiedener Konzentrationen von Matricin und Chamazulen (Cham) auf die LPS-induzierte Nitrit-Konzentration im Überstand von RAW 264.7-Zellen nach einer Inkubationszeit von 24 h bzw. 1 h im Vergleich zu unbehandelten, mit LPS stimulierten Zellen (K). $n = 3$, 4 Parallelen, angegeben sind die Mittelwerte \pm Standardabweichung (prozentual bezogen auf die Kontrollgruppe).

B.3.2.4 Aktivitätsgeleitete Fraktionierung eines Schafgarbenblütenextrakts

B.3.2.4.1 *Fraktionierung des Extrakts*

Die Entfettung von 19,4 g DCM-Rohextrakt ergab 14,1 g entfetteten Extrakt, welcher durch eine Kieselgel-Flash-Chromatographie in 5 Fraktionen (I-V) und einen Rest (Spülen der Säule mit MeOH) aufgetrennt wurde. Abbildung 64 zeigt das Schema der Fraktionierung.

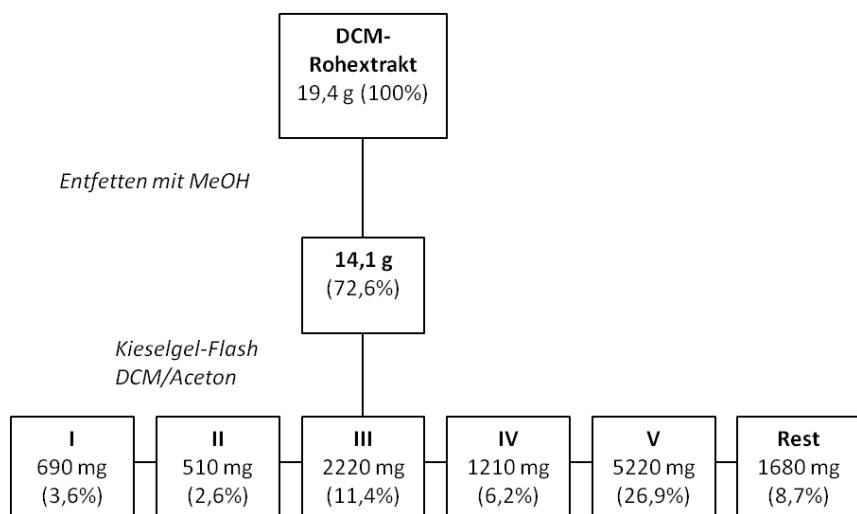


Abbildung 64: Schema der Fraktionierung des Schafgarbenblütenextrakts mittel Kieselgel-Flash-Chromatographie.

Abbildung 65 zeigt eine DC-Übersicht der Fraktionierung des Extrakts, der Fraktionen I-V und dem Rest. Es ist eine Auftrennung in lipophile Fraktionen (I, II und evtl. III) und hydrophile Fraktionen (IV, V und R) erfolgt.

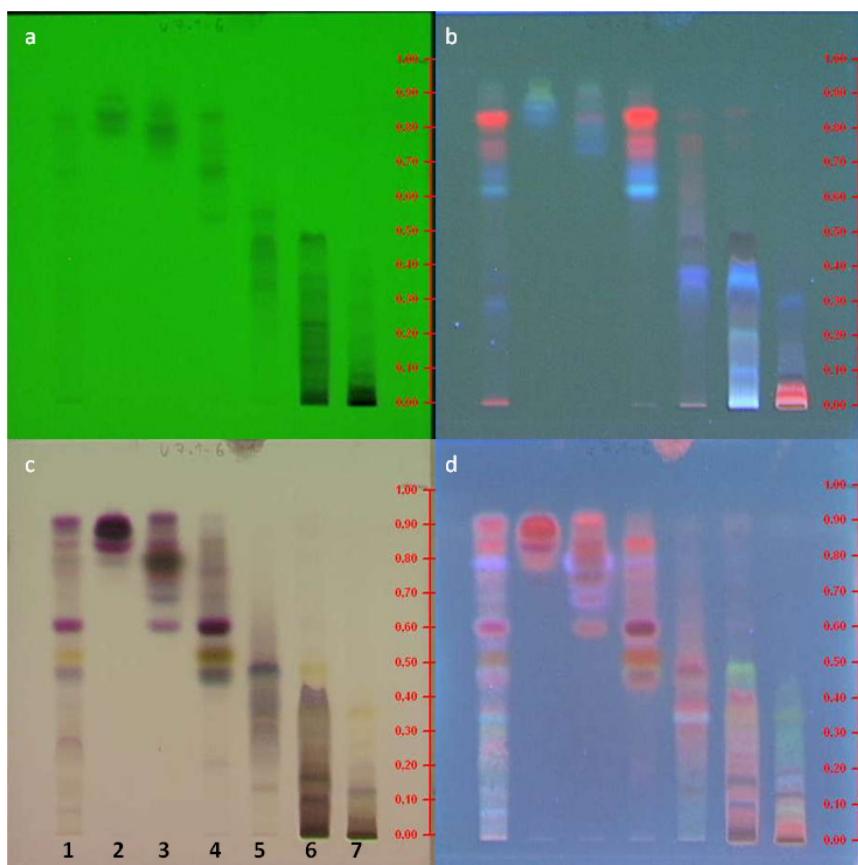


Abbildung 65: Übersichts-DC der Fraktionierung des entfetteten Schafgarbenblütenextrakts mittels Kieselgel-Flash-Chromatographie. Aufgetragen wurden der entfettete Extrakt (1), die Fraktionen I-V (2-6) und der Rest (7) (Spülen der Säule mit MeOH). NP-DC, Fließmittel: DCM/Aceton 9:1, Laufhöhe: 8 cm, keine Kammersättigung, Derivatisierung: a, b keine; c, d mit AA-Reagenz, 5 min 100 °C, Dokumentation: a bei 254 nm; b, d bei 366 nm; c bei vis.

Abbildung 66 zeigt eine Übersichts-DC (mit EP-Reagenz derivatisiert) der Fraktionen I-V und R mit Matricin als Referenzsubstanz. Blaue Banden sind kennzeichnend für azulenogene Verbindungen. Außer in Fraktion I und II finden sich also Proazulene in allen Fraktionen, besonders deutlich in Fraktionen III, und V.

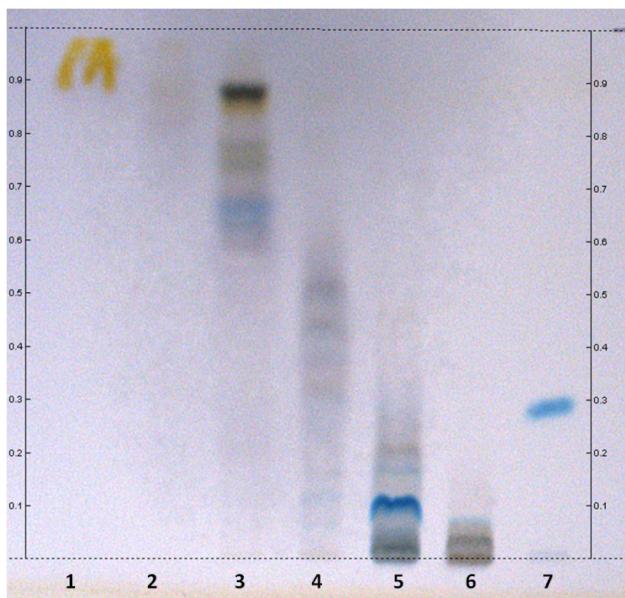


Abbildung 66: Übersichts-DC der Fraktionierung des entfetteten Schafgarbenblütenextrakts mittels Kieselgel-Flash-Chromatographie. Aufgetragen wurden die Fraktionen I-V (1-5) und der Rest (6) (Spülen der Säule mit MeOH) und Matricin als Referenzsubstanz (7). Stationäre Phase: NP-DC, Fließmittel: DCM/Aceton 9:1, Laufhöhe: 8 cm, keine Kammersättigung, Derivatisierung: EP-Reagenz, 5 min 100 °C, anschließend EtOH, Dokumentation: vis.

B.3.2.4.2 *Einfluss des Extrakts und der Fraktionen auf die Zellviabilität von HMEC-1 (MTT-Assay)*

Um die Zytotoxizität der Fraktionen und des Extrakts auf HMEC-1 zu ermitteln wurde ein MTT-Assay durchgeführt. Der MTT-Assay ergab nach 24 h Inkubation mit den entsprechenden Konzentrationen einen deutlichen negativen Einfluss auf die Zellviabilität von HMEC-1 (20.000 Zellen/Well) bezogen auf die Kontrolle (unbehandelte Zellen, 100%) für den entfetteten Extrakt der Konzentration 25 µg/ml, für Fraktion IV der Konzentration 25 µg/ml und für Fraktion V der Konzentration 25 und 10 µg/ml (Abbildung 67). Am deutlichsten toxisch erwies sich Fraktion V, die bereits bei einer Konzentration von 10 µg/ml die Viabilität der Zellen auf 64,8% und bei einer Konzentration von 25 µg/ml auf 37,9% reduzierte. In den Konzentrationen 1 und 5 µg/ml konnten jedoch alle Fraktionen und der Extrakt als nicht toxisch angesehen werden. Der Versuch wurde in 6 Parallelen und als Screening lediglich einmal durchgeführt ($n = 1$).

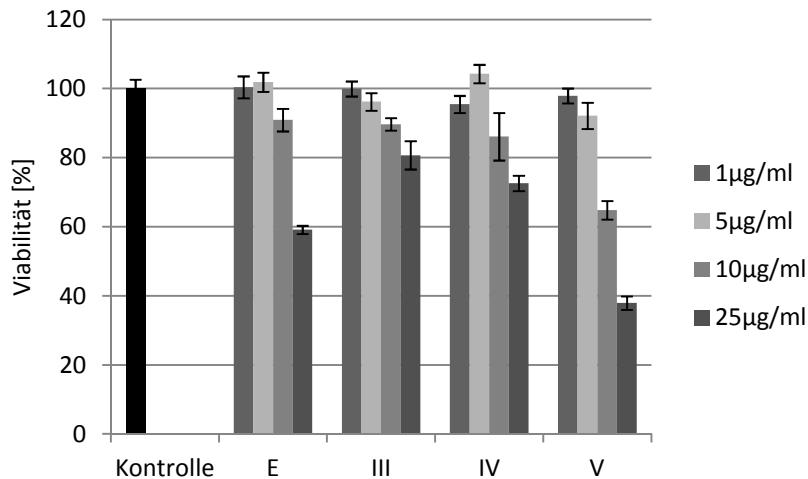


Abbildung 67: MTT-Assay durchgeführt mit HMEC-1 (20.000 Zellen/Well) und Konzentrationen von 1, 5, 10 und 25 µg/ml des entfetteten Schafgarbenblütenextrakts (E) und der Fraktionen der Kieselgel-Flashchromatographie III-V. Als Kontrolle dienten unbehandelte Zellen. n = 1, 6 Parallelen. Gezeigt sind die Standardabweichungen der 6 Einzelwerte einer Messung.

B.3.2.4.3 Einfluss des Extrakts und der Fraktionen auf die TNF- α induzierte ICAM-1-Expression bei HMEC-1

Analog zu den Experimenten mit Matricin und Chamazulen wurde auch für die Fraktionen und den Schafgarbenblütenextrakt ein ICAM-1-Assay durchgeführt. Ziel dieses bioaktivitätsgeleiteten Ansatzes war es potentiell entzündungshemmende Fraktionen bzw. Substanzen in der Schafgarbe zu identifizieren. Die TNF- α induzierte ICAM-1-Expression wurde deutlich vom entfetteten Extrakt selbst (E) und v.a. von den Fraktionen IV und V verringert (Abbildung 68). So senkte die Fraktion IV (12,5 µg/ml) die ICAM-1 Expression signifikant auf 43,2%, Fraktion V (6,25 µg/ml) sogar auf 18,1%. Der Extrakt (12,5 µg/ml) senkte die ICAM-1 Expression auf 21,1%. Die Werte beziehen sich auf unbehandelte, mit TNF- α stimulierte Zellen (100%). Die Negativkontrolle zeigte einen Basiswert von 6,3% der ICAM-1-Expression. Die Versuche wurden dreimal in Duplicaten durchgeführt (n = 3). Die Daten wurden einer einfaktoriellen ANOVA ($p \leq 0,001$) und anschließenden Post hoc Tests unterzogen (Scheffé-Prozedur).

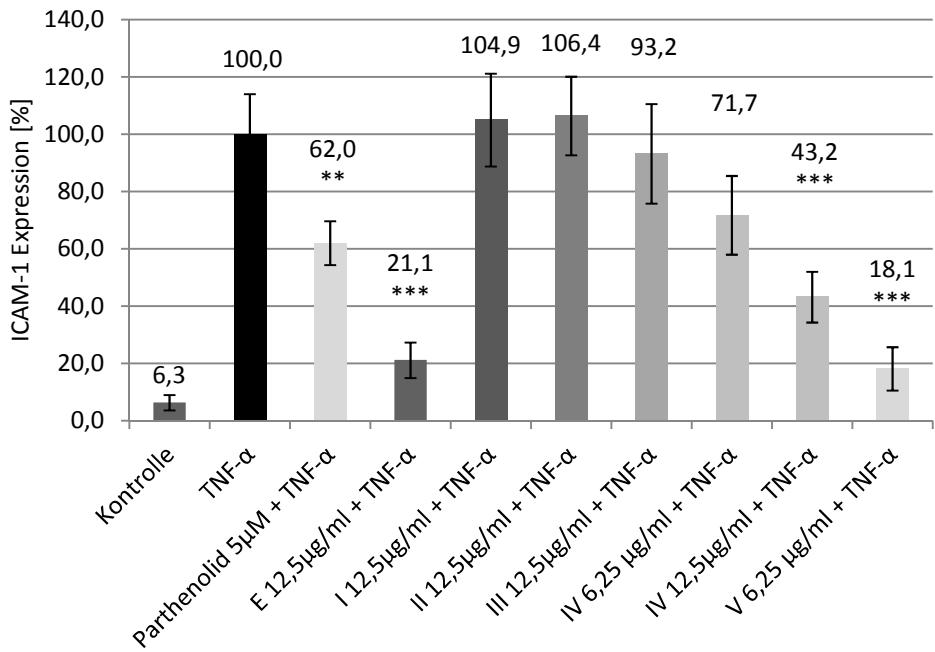


Abbildung 68: Einfluss der Fraktionen (I-V) des Schafgarbenblütenextrakts (E) und des Extrakts selbst auf die TNF- α (10 ng/ml) induzierte ICAM-1-Expression bei HMEC-1. Die Kontrollgruppe (Negativkontrolle) bestand aus nicht behandelten, nicht stimulierten Zellen. Mit Parthenolid (5 μ M) behandelte Zellen dienten als Positivkontrolle. Die Werte beziehen sich auf unbehandelte, mit TNF- α stimulierte Zellen (100%). n = 3, Duplikate, ** p \leq 0,01, *** p \leq 0,001, angegeben sind Mittelwerte \pm Standardabweichung.

B.3.2.4.4 Einfluss des Extrakts und der Fraktionen auf die Zellviabilität von RAW 264.7 Zellen

Zur Bestimmung der Zytotoxizität des Extrakts und der Fraktionen auf RAW 264.7-Zellen wurde eine Zellzahlbestimmung unter Einfluss der Testsubstanzen durchgeführt. Es zeigte sich für den entfetteten Schafgarbenblütenextrakt (E) und die Fraktionen IV und V lediglich für die jeweils höchste Konzentration (25 μ g/ml) eine verminderte Viabilität im Vergleich zur un behandelten Kontrollgruppe (Abbildung 69). Auch hier erwiesen sich die Fraktionen IV und V bei einer Konzentration von 25 μ g/ml als am stärksten toxisch (70,5 bzw. 52,0% Viabilität im Vergleich zur Kontrolle). Geringere Konzentrationen zeigten keinen Einfluss auf die Zellzahl. Fraktion III erwies sich in den getesteten Konzentrationen als nicht toxisch. Die Versuche wurden in 6 Parallelen durchgeführt und als Screening lediglich einmal durchgeführt (n = 1).

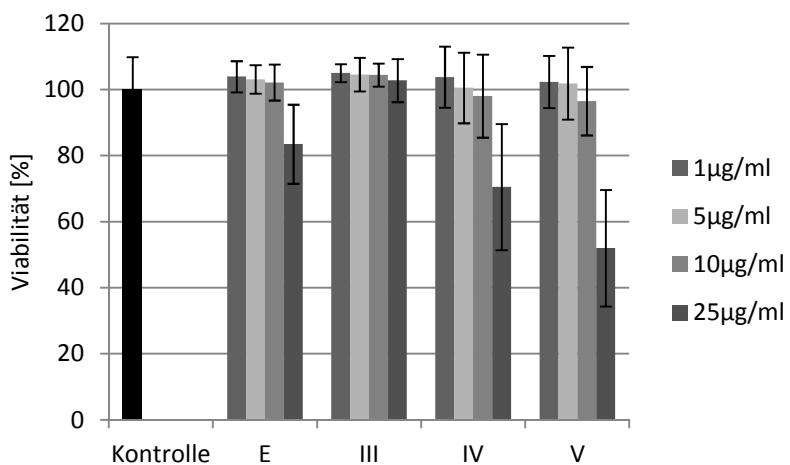


Abbildung 69: Einfluss verschiedener Konzentrationen des entfetteten Schafgarbenblütenextrakts (E) und der Fraktionen III-V der Kieselgel-Flasch-Chromatographie auf die Zellzahl von RAW 264.7. Als Kontrolle dienten unbehandelte Zellen. n = 1, 6 Parallelen. Gezeigt sind die Standardabweichungen der 6 Einzelwerte einer Messung.

B.3.2.4.5 Einfluss des Extraks und der Fraktionen auf die NO-Produktion bei RAW 264.7 Zellen (Griess-Assay)

Ebenfalls analog zu den Experimenten mit Matricin und Chamazulen wurde auch für den Schafgarbenblütenextrakt und dessen Fraktionen ein Griess-Assay durchgeführt. Dadurch sollten potentiell entzündungshemmende Fraktionen bzw. Substanzen in der Schafgarbe aufgespürt werden. Außer Fraktion I zeigten alle Fraktionen und der Extrakt in allen getesteten Konzentrationen im Griess-Assay mit RAW 264.7 Zellen eine signifikante Senkung der Nitritmenge im Zellüberstand nach 24 h Inkubation. Als besonders aktiv erwiesen sich dabei die Fraktionen IV und V und der Extrakt selbst. So senkte Fraktion V bereits bei einer Konzentration von 1 µg/ml die Nitritmenge im Überstand signifikant auf 66,4% Im Vergleich zur Kontrolle. Der Extrakt und Fraktion IV senkten bei einer Konzentration von 5 µg/ml die Nitritmenge auf unter 40% (Abbildung 70). Die in mehreren Konzentrationen verwendeten Fraktionen zeigten alle in ihrer Aktivität eine starke Konzentrationsabhängigkeit. Alle Testkonzentrationen bewegten sich im nicht toxischen Bereich. Als Kontrolle dienten unbehandelte, mit LPS stimulierte Zellen (100%). Die Versuche wurden in 8 Parallelen durchgeführt und zweimal wiederholt (n = 3). Die Daten wurden einer einfaktoriellen ANOVA ($p \leq 0,001$) und anschließenden Post hoc Tests unterzogen (Scheffé-Prozedur).

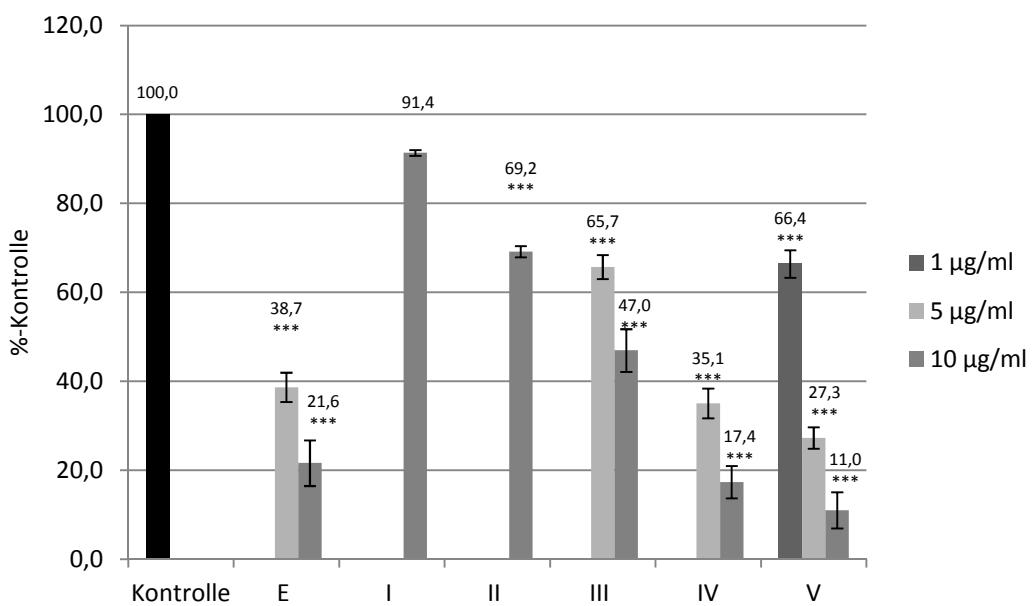


Abbildung 70: Einfluss verschiedener Konzentrationen des entfetteten Schafgarbenblütenextrakts (E) und der Fraktionen I-V der Kieselgel-Flashchromatographie auf die Nitirt-Konzentration im Überstand von RAW 264.7 Zellen (Griess-Assay). Als Kontrolle dienten unbehandelte, mit LPS stimulierte Zellen. n = 3, 8 Parallelen, *** p ≤ 0,001, angegeben sind Mittelwerte ± Standardabweichung.

B.4 Diskussion

B.4.1 Optimierung der Matricinisolierung aus Kamillenblüten

Die Isolierung von Matricin ist zwar gut dokumentiert, jedoch nach wie vor methodisch aufwendig und aufgrund der Instabilität von Matricin schwierig.³²² Besonders der von Cekan et al. (1954), Stahl & Schild (1981), Flaskamp et al. (1982), und von Schmidt & Ness (1993) beschriebene Schritt des Ausschüttelns der Petroletherphase mit Kaliumhydrogencarbonatlösung ist sehr zeitraubend, v.a. wegen der schlechten Phasentrennung (siehe auch B.3.1.1.4.).^{323,324,325,326} In dieser Arbeit wurde daher versucht Matricin durch rein chromatographische Methoden zu isolieren, was in drei Schritten mittels Flash-Chromatographie gelungen ist. Die Ausbeute ist mit 0,016% bezogen auf die Droge (0,16 mg/g) zwar geringer als z.B. bei Ramadan et al. (2006), die eine Ausbeute von 0,087% (0,87 mg/g) vorweisen konnten, allerdings ist die in der vorliegenden Arbeit beschriebene Isolierung methodisch weniger aufwendig.³²⁷ Auch die erzielte Reinheit von maximal 98,6% war zufriedenstellend. Es ist also durchaus praktikabel die Isolierung des Matricins nach der hier beschriebenen Methode durchzuführen.

B.4.2 Isolierung von 8-Desacetyl-8-angeloyl-4-*epi*-matricin

Die Isolierung von 8-Desacetyl-8-angeloyl-4-*epi*-matricin (Ang-Ma) gelang in 3 Schritten durch die Kombination von Kieselgel-Säulenchromatographie, darauf folgender Säulenchromatographie mit Aluminiumoxid als stationärer Phase und anschließender Aufreinigung über semipräparative HPLC an RP-18-Material. Die Zugabe einiger Tropfen NH₃-Lösung bei der Extraktion und den beiden Säulenchromatographieschritten verminderte die Gefahr der säurekatalysierten Zersetzung der instabilen Verbindung und ist auch für die Isolierung weiterer Proazulene zu empfehlen. Todorova et al. (2006) isolierten die Verbindung aus *Achillea asplenifolia* (aus Bulgarien), welche zum *A. millefolium* Aggregat gezählt wird. Bezuglich der Chemotaxonomie wurde diskutiert, dass das Vorkommen von Guaianoliden vom Matricin- und Achillicin-Typ typisch für die diploiden Spezies *A. asplenifolia* und *A.*

³²² Jakovlev et al. 1983

³²³ Cekan et al. 1954

³²⁴ Stahl und Schild 1981

³²⁵ Flaskamp et al. 1982

³²⁶ Schmidt und Ness 1993

³²⁷ Ramadan et al. 2006

roseo-alba und für die tetraploide Art *A. collina* sei.³²⁸ Dies wurde zuvor auch von der Arbeitsgruppe um W. Kubelka gezeigt. Sie fanden in *A. roseo-alba* u.a. das zu Ang-Ma strukturverwandte 8-Desacetyl-8-tigloyl-4-*epi*-matricin und das isomere 8-Desacetyl-8-tigloyl-matricin.³²⁹ Ebenfalls in *A. roseo-alba* wurden die Achillicin-Derivate 8 α -Tigloyl-10-*epi*-artabsin und 8 α -Angeloyl-10-*epi*-artabsin gefunden.³³⁰ Aus *A. collina* wurde neben Matricin und Achillicin eine Bandbreite an Proazulenen isoliert, u.a. 8 α -Angeloxyartabsin, und dessen Tigloylderivat, auch Ang-Ma und das entsprechende Tigloylderivat.³³¹ Da in *A. asplenifolia* Proazulene mit Angeloxy-Seitenketten dominieren und in *A. roseo-alba* und *A. collina* u.a. Proazulene mit Angeloxy- und Tigloxy-Seitenketten vorkommen, wären diese Arten, sofern erhältlich, ergiebige Quellen zur Isolierung und anschließender Testung dieser Proazulene.³³² Diese wären pharmakologisch sehr interessant, denn sie besitzen kein Michael-System im Grundgerüst, dafür aber in der Seitenkette, was einen Vergleich bezüglich Struktur-Wirkungs-Beziehung zum Matricin ermöglichen würde, welches kein Michael-System besitzt. Das Vorkommen von Ang-Ma in der hier verwendeten Droge weißt außerdem auf die schwierige Abgrenzung der Arten des Aggregats hin, denn in der hexaploiden, proazulenfreien *A. millefolium* s.s. sollte Ang-Ma nicht vorkommen.³³³ Eine pharmakologische Testung konnte wegen der geringen isolierten Menge und des baldigen Zerfalls des isolierten Ang-Ma leider nicht durchgeführt werden. Der hier beschrittene Weg kann aber als Anleitung zur Isolierung größerer Mengen dienen.

B.4.3 Pharmakologische Untersuchungen von Matricin und Chamazulen

Im Folgenden sollen die in dieser Arbeit generierten pharmakologischen Resultate bezüglich Matricin und Chamazulen unter Einbeziehung der aus der Literatur bekannten Ergebnisse vergleichend diskutiert werden.

Die Kamille gehört zu den „großen Drogen“ in der Phytotherapie. Die Anwendungen und Wirkungen sind vielfältig.³³⁴ Neben der innerlichen Anwendung, meist in Form von Tee, ist für diese Arbeit v.a. die äußerliche Anwendung von Interesse, da man davon ausgehen kann, dass das säurelabile Matricin bei der Magenpassage vollständig zersetzt wird und somit nur

³²⁸ Todorova et al. 2006

³²⁹ Kastner et al. 1991b

³³⁰ Kastner et al. 1991c

³³¹ Trendafilova et al. 2006

³³² Todorova et al. 2006

³³³ Jurenitsch 2007

³³⁴ Dingermann et al. 2004

bei topischer Anwendung als potentieller Wirkstoff in Betracht kommt.^{335,336} Auszüge der Kamille werden äußerlich z.B. bei Haut- und Schleimhautentzündungen, auch in der Mundhöhle sowie im Anal- und Genitalbereich und zur Wundheilung eingesetzt.^{337,338} Die Datenlage zu den hier untersuchten Inhaltsstoffen Matricin und Chamazulen ist relativ spärlich und die meisten Forschungsergebnisse, v.a. zur Pharmakologie von Matricin, stammen aus den 1980er und 1990er Jahren. Chamazulen wurde schon weit früher untersucht. Bereits in den 30er Jahren des 20. Jahrhunderts gab es *in vivo* Belege zur entzündungshemmenden Wirkung von Chamazulen.^{339,340} Doch schon kurz darauf gab es auch Widerspruch. So konnten Oettel & Wilhelm-Kollmannsperger (1955) weder für Kamilleninfus, Guajazulen, 4 synthetische Azulene, noch für das Chamazulen eine entzündungshemmende Wirkung *in vivo* feststellen.³⁴¹ Dafür vermuteten andere Autoren eine antiphlogistische Wirkung des Proazulens.³⁴² Diese heute noch aktuelle Widersprüchlichkeit bezüglich der entzündungshemmenden Aktivität von Chamazulen und Matricin, nahm also damals schon ihren Anfang. Im ersten Teil der Diskussion soll daher vorerst das aktuell Bekannte zu Matricin und Chamazulen bestmöglich zusammengefasst werden, woraufhin dann die eigenen Ergebnisse dargestellt und interpretiert werden.

Die Berichte über die für die entzündungshemmende Wirkung verantwortlichen, in Kamillenblütenzubereitungen vorkommenden Inhaltsstoffe setzen unterschiedliche Schwerpunkte. Häufig wird neben dem Apigenin und dem Bisabolol dem Chamazulen und nicht dem Proazulen Matricin die entzündungshemmende Wirkung der Kamille zugeschrieben, wie Jakolev et al. (1983) zusammenfassen.³⁴³ Eine wichtige Rolle im Enzündungsgeschehen spielen beispielsweise die Metabolite der Arachidonsäure, wie Prostaglandine, Thromboxane und Leukotriene die durch Cyclooxygenasen (COX) und Lipoxygenasen (LOX) gebildet werden und als Entzündungsmediatoren agieren.³⁴⁴ In einer Untersuchung von Safayhi et al. (1994) wurde die Wirkung von Chamazulen und Matricin auf diese Systeme untersucht. Sie konnten zeigen, dass Chamazulen dosisabhängig die

³³⁵ Ramadan 2005

³³⁶ Ramadan et al. 2006

³³⁷ Hänsel und Sticher 2007

³³⁸ Dingermann et al. 2004

³³⁹ Heubner und Grabe 1933

³⁴⁰ Heubner und Albath 1939

³⁴¹ Oettel und Wilhelm-Kollmannsperger 1955

³⁴² Jakovlev et al. 1983

³⁴³ Jakovlev et al. 1983

³⁴⁴ Hänsel und Sticher 2007

Leukotrien B₄-Synthese in Kalzium und Ionophor A 23187 stimulierten Ratten-Granulocyten (*in vitro*) mit einem IC₅₀-Wert von 15 µM hemmte, wohingegen Matricin bis 200 µM keinen Effekt zeigte. Chamazulen verminderte außerdem die Bildung von 5-Lipoxygenaseprodukten (5-LO) aus exogen zugeführter Arachidonsäure (IC₅₀ = 10 µM) im Überstand neutrophiler Granulocyten (Ratte). Darüber hinaus hemmte Chamazulen mit einem IC₅₀ von 2 µM, in einem zellfreien Peroxidierungsmodell, die Bildung von Arachidonsäuremetaboliten nicht jedoch das Matricin. Für Matricin konnte in dieser Untersuchung außerdem kein Effekt auf die Aktivität der Cyclooxygenase und der 12-Lipoxygenase in humanen Thrombozyten beobachtet werden. Die Autoren schreiben also klar dem Chamazulen und nicht dem Matricin antiphlogistische Wirkung zu. Da für die Aktivierung der 5-LO Radikale und Peroxide essentiell sind und eine Aktivität von Chamazulen in zellfreien Systemen beobachtet werden konnten, schlussfolgern die Autoren, dass Chamazulen einen antioxidativen Wirkmechanismus aufweist.³⁴⁵ Die gleiche Arbeitsgruppe konnte außerdem zeigen, dass Chamazulen die Bildung von 5-HETE (5-Hydroxyeicosatetraensäure, Produkt der 5-LO) in neutrophilen Granulozyten der Ratte hemmte, Matricin hingegen nicht. Außerdem hatte Matricin keinen Einfluss auf die Bildung von Hydroxyheptadecatriensäure (12-HHT, Produkt der COX) und 12-HETE (Produkt der 12-LOX) in stimulierten humanen Thrombozyten und zeigte kaum antioxidative Aktivität. Hier wird die Wirkung von Chamazulen ebenfalls auf mögliche antioxidative Effekte zurückgeführt.³⁴⁶

Auch der Transkriptionsfaktor NF-κB spielt im Entzündungsgeschehen eine wichtige Rolle, da er nach Translokation in den Zellkern die Transkription von Genen wie iNOS, COX-2 oder ICAM-1 auslösen kann, die im Entzündungsgeschehen relevant sind (vgl. B.1.4.1 und B.1.4.2). Bei einer Untersuchung mittels EMSA (electrophoretic mobility shift assay) konnte für Matricin und seine Strukturverwandten Tigloyl- und Angeloylartabsin keine Inhibierung der DNA-Bindung von NF-κB festgestellt werden.³⁴⁷ Ramadan et al. (2006) sprechen dem Matricin ebenfalls die Wirksamkeit ab und zeigten im Gegenzug die anti-inflammatoryische Wirkung (COX-2, Mausohr-Ödem) von Chamazulencarbonsäure, einem Zwischenprodukt des Abbauweges vom Matricin zum Chamazulen.³⁴⁸ In einem aktuellen Review wird Matricin im

³⁴⁵ Safayhi et al. 1994

³⁴⁶ Ammon et al. 1996

³⁴⁷ Lyss et al. 2000

³⁴⁸ Ramadan et al. 2006

Zusammenhang mit der anti-inflammatoryischen Wirkung der Kamille nicht einmal erwähnt.³⁴⁹

Andere Quellen belegen wiederum eine antiphlogistische Aktivität von Matricin. Della Loggia et al. (1990) testeten drei verschiedene Kamillenzubereitungen, die sich hauptsächlich im Gehalt an Matricin und Chamazulen unterschieden, am Crotonöl-induzierten Mausohr-Ödem. Die Präparation aus frischen und getrockneten Kamillenblüten enthielten beide ähnliche Mengen an Apigenin und Bisabolol. Matricin war im Vergleich zur Zubereitung aus getrockneten Blüten in etwa doppelter Menge in der Zubereitung aus frischen Blüten enthalten. Beide enthielten jedoch kein Chamazulen, welches lediglich in der dritten Zubereitung mit ätherischem Öl zu finden war. Diese enthielt im Gegenzug aber kein Matricin, da dieses ja bei der Wasserdampfdestillation zu Chamazulen zerfällt und auch kein Apigenin. Alle drei Zubereitungen wiesen jedoch in etwa gleiche Mengen an Bisabolol auf. Am Mausohr-Ödem zeigte sich nun eine abnehmende Entzündungshemmung angefangen von der Zubereitung mit frischen (31,6%), über die mit getrockneten Blüten (23,7%) hin zu der mit ätherischem Öl (6,6%). Daraus wurde die Schlussfolgerung gezogen, dass Matricin stärker antiphlogistisch wirkt als Chamazulen, beide jedoch weniger wirksam sind als Apigenin.³⁵⁰

Zittler-Eglseer et al. (1991) zeigten am Crotonöl-induzierten Mausohr-Ödem, dass Matricin neben Rupicolin B (14,3% Hemmung), 11,13-Dehydrodesacetylmatricarin (45,5% Hemmung) und Apigenin (54,5% Hemmung) mit 61,0% Ödemhemmung die stärkste Aktivität aufwies.³⁵¹ Kastner et al. (1993) fanden einen antiödematischen Effekt (59,1%) für Matricin (und andere Proazulene) bei einer Konzentration von 1 µM.³⁵² Auch Zidorn et al. (1999) testeten neben anderen Substanzen aus *Leontodon hispidus* Achillicin, Chamazulen und Matricin am Crotonöl-induzierten Mausohr-Ödem und beobachteten eine Ödemhemmung von nur 3% für Chamazulen, 23% für Achillicin und von 58% für Matricin. Auch hier war also Matricin am stärksten wirksam.³⁵³ In jüngeren Publikationen wie z.B. bei Hitziger et al. (2003) wird jedoch die beschriebene antiphlogistische Wirkung des Matricins auf wirksame Zwischenprodukte, wie z.B. die Chamazulencarbonsäure zurückgeführt, welche bei der Umwandlung von Matricin in Chamazulen entstehen. Für Chamazulencarbonsäure konnte eine Hemmung der

³⁴⁹ Petronilho et al. 2012

³⁵⁰ Della Loggia et al. 1990

³⁵¹ Zitterl-Eglseer et al. 1991

³⁵² Kastner et al. 1993

³⁵³ Zidorn et al. 1999

Aktivität der proinflammatorischen COX-2 gezeigt werden.³⁵⁴ Auch Ramadan et al. (2006) schreiben der Chamazulencarbonsäure, wie oben bereits erwähnt, wegen seiner Profen-Struktur eine antiphlogistische Wirkung zu.³⁵⁵

Andere Untersuchungen hingegen legten den Fokus mehr auf das Chamazulen. Safayhi et al. (1994) beobachteten, wie oben erwähnt, eine anti-inflammatorye Aktivität von Chamazulen und führten dies auf seine antioxidative Eigenschaften zurück.³⁵⁶ Rekka et al. (1996) testeten Chamazulen direkt auf seine Radikalfängereigenschaften. Sie konnten zeigen, dass Chamazulen die Lipidperoxidation konzentrationsabhängig verringert und bei einer Konzentration von 50 µM vollständig hemmte. Darüber hinaus stellten sie fest, dass Chamazulen die Oxidation von DMSO verringerte und ab einer Konzentration von 5 µM signifikante Hydroxyl-Radikalfängereigenschaften aufwies. Außerdem zeigte Chamazulen eine zeitabhängige Reaktion mit dem stabilen freien Radikal DPPH (2,2'-Diphenyl-1-picrylhydrazyl).³⁵⁷ Ornano et al. (2013) berichteten, dass das Chamazulen reiche ätherische Öl von *Artemisia arborescens* L. effektive Radikalfängereigenschaften gegenüber dem ATBS-Radikalkation (2,2'-Azino-di-(3-ethylbenzthiazolin-6-sulfonsäure)) aufwies.³⁵⁸ Wegen der Beteiligung von Radikalen an Entzündungsprozessen, u.a. auch über den oben erwähnten Arachidonsäurestoffwechsel, liegt die Vermutung nahe, dass Chamazulen seine entzündungshemmende Wirkung also dadurch entfaltet, indem es als Radikalfänger fungiert. Zusammenfassend lässt sich sagen, dass viele Autoren den Abbauprodukten des Matricins, sei es Chamazuelincarbonsäure oder Chamazulen selbst, eine anti-inflammatorye Wirkung zuschreiben und weniger dem Matricin. Auch wenn in einigen Untersuchungen Matricin antiphlogistische Aktivität zeigte, wurden dann häufig die allmählich daraus entstehenden Abbauprodukte dafür verantwortlich gemacht.³⁵⁹ Dieser These widerspricht allerdings die Beobachtung, dass unterschiedlich substituierte Proazulene auch unterschiedlich stark wirken, so wie u.a. Kastner et al. (1993) und Zidorn et al. (1999) zeigten. Denn wäre lediglich ein für alle Proazulene einheitliches Abbauprodukt für die Wirkung verantwortlich, müssten sich die verschiedenen Proazulenen in ihrer Wirkung sehr ähneln, was nicht der Fall ist.

³⁵⁴ Hitziger et al. 2003

³⁵⁵ Ramadan et al. 2006

³⁵⁶ Safayhi et al. 1994

³⁵⁷ Rekka et al. 1996

³⁵⁸ Ornano et al. 2013

³⁵⁹ Hitziger et al. 2003

(Ödemhemmung Achillicin: 23%, Matricin: 58%, bzw. 61%, 8 α -Angeloxy-10-*epi*-artabsin: 53,4%).^{360,361,362}

Im Kontext der oben zusammenfassend beschriebenen Ergebnisse früherer Forschungsvorhaben, sollen nun die in dieser Arbeit ermittelten Daten bezüglich der Pharmakologie von Matricin und Chamazulen vergleichend dargestellt werden. Sie stehen teilweise in Opposition zu den Ergebnissen und deren Interpretation anderer Untersuchungen.

Nachdem die Zytotoxizität von Matricin und Chamazulen auf die beiden verwendeten Zelllinien HMEC-1 und RAW 264.7 im untersuchten Konzentrationsbereich ausgeschlossen werden konnte (vgl. B.3.2) und für Matricin die Stabilität unter *in vitro*-Bedingungen belegt war (vgl. Abbildung 43), wurde versucht, die pharmakologischen Targets und die damit verbundenen Wirkmechanismen von Matricin und Chamazulen genauer zu ergründen.

Aufgrund der durchgeführten Degradationskontrolle unter Assay-Bedingungen konnten die beobachteten Ergebnisse direkt dem Matricin zugeschrieben werden und mussten nicht mit einem seiner Abbauprodukte in Zusammenhang gebracht werden. Es stellt sich jedoch die Frage, ob in einem Ansatz mit Zellen eventuell vorhandene Esterasen mit dem Abbau von Matricin beginnen. Hier müssten weitere Versuche in Anwesenheit von Zellen durchgeführt werden. Durch Testung im nicht-toxischen Bereich konnten außerdem falsch positive bzw. falsch negative Ergebnisse in den Assays weitgehend ausgeschlossen werden. Hierbei wurde auch auf einen möglichen Einfluss der Zellzahl geachtet, indem die Zellzahl der Zytotoxizitätstests an die der Assays angeglichen wurde. Zuerst konnte festgestellt werden, dass Matricin, nicht aber Chamazulen, die TNF- α induzierte ICAM-1-Expression bei HMEC-1 dosisabhängig reduzierte (auf 52,7% bei 75 μ M) (vgl. Abbildung 46). ICAM-1 wird von Endothelzellen als Antwort auf Entzündungsmediatoren wie TNF- α und IFN- γ oder auch als Antwort auf Bestandteile der bakteriellen Zellmembran (LPS) vermehrt exprimiert und ist an der Migration weißer Blutkörperchen aus den Blutgefäßen ins entzündete Gewebe beteiligt.^{363,364,365} Da die ICAM-1-Expression ein zentrales Ereignis im Entzündungsgeschehen darstellt und Matricin diese offensichtlich inhibieren kann, legte dies die Vermutung nahe, dass Matricin zumindest Anteil an der anti-inflammatoryischen Aktivität von

³⁶⁰ Zitterl-Eglseer et al. 1991

³⁶¹ Kastner et al. 1993

³⁶² Zidorn et al. 1999

³⁶³ Cronstein und Weissmann 1993

³⁶⁴ Roebuck und Finnegan 1999

³⁶⁵ Ley et al. 2007

Kamillenzubereitungen haben kann. Einen Hinweis darauf lieferten auch Shipochliev et al. (1981). Sie konnten bei Ratten, bei denen durch Carrageen und Prostaglandin E1 Entzündungen ausgelöst wurden, mit Kamillenextrakt die Leukozytenmigration hemmen.³⁶⁶ Da diese Migration u.a. ICAM-1-vermittelt abläuft, steht deren Ergebniss im Einklang mit dem dieser Arbeit. Allerdings ist nicht klar, welche Bestandteile des von Shipochliev et al. (1981) verwendeten Extraks den Effekt erzielten. Die Wirkung könnte auch mit der Aktivität von Apigenin erklärt werden, welches ebenso in der Lage ist, die ICAM-1-Expression im Tiermodell zu reduzieren (wobei kein Mechanismus über Radikalfängereigenschaften angenommen wurde).³⁶⁷ Auch an mit IL-1- α , TNF- α und LPS stimulierten HUVEC (human umbilical vein endothelial cells) konnte für Apigenin *in vitro* eine dosisabhängige Reduktion der ICAM-1-Expression gezeigt werden. Für Matricin allerdings wurde die Hemmung der ICAM-1-Expression hier zum ersten Mal beobachtet.

Der ICAM-1-Assay lässt jedoch keinen Rückschluss auf den genauen Wirkmechanismus einer aktiven Substanz zu. Es ist aber bekannt, dass das Cytokin TNF- α die ICAM-1-Expression über den NF- κ B-Weg aktiviert.³⁶⁸ Dabei wird der durch Phosphorylierung aktivierte Transkriptionsfaktor NF- κ B vom Zytoplasma in den Zellkern transloziert (vgl. B.1.4.1, B.1.4.2), wodurch dann nach Bindung von NF- κ B an die zugehörige Promotorregion auf der DNA eine vermehrte Transkription proinflammatorischer Gene, wie z.B. der von ICAM-1, VCAM, iNOS und COX-2, stattfindet.^{369,370} Vom Sesquiterpenlacton Parthenolid, das hier als Positivkontrolle verwendet wurde, ist beispielsweise bekannt, dass es den NF- κ B-Signalweg hemmt. Das Parthenolid bindet dabei an eine Untereinheit des I- κ B-Kinase-Komplexes, welche den DNA-bindenden Teil von NF- κ B im Zytoplasma zurückhält. Damit wird die Translokation von NF- κ B in den Kern verhindert.³⁷¹ In einer anderen Studie zeigte sich, dass Parthenolid sowohl die Bindung von NF- κ B an die DNA als auch den für die Translokation wichtigen Abbau von I- κ B hemmt. Die DNA-Bindung wird wahrscheinlich durch die Alkylierung eines Cysteinrests an der NF- κ B-Untereinheit p65 behindert.³⁷² NF- κ B ist also ein prominentes Target, um die Hemmung der ICAM-1-Expression zu erklären. Um sich dem Wirkmechanismus von Matricin weiter zu nähern, wurde ein NF- κ B-Reportergen-Assay durchgeführt, mit dem Ergebnis, dass Matricin ab einer Konzentration von 10 μ M (bis

³⁶⁶ Shipochliev et al. 1981

³⁶⁷ Panés et al. 1996

³⁶⁸ Roebuck und Finnegan 1999

³⁶⁹ Tak und Firestein 2001

³⁷⁰ Luo et al. 2005

³⁷¹ Hehner et al. 1999

³⁷² Garcia-Pineres et al. 2004

75 µM) signifikant die Expression des down-stream vom NF-κB-Promotor gelegenen Reportergens (Luciferase) verringerte (vgl. Abbildung 52). Dass es sich bei NF-κB um das vermutete Target von Matricin handeln könnte, wurde außerdem dadurch unterstützt, dass für Matricin, aber nicht für Chamazulen, eine Verminderung der Translokation von NF-κB vom Zytoplasma in den Kern gezeigt werden konnte (vgl.B.3.2.1.4, B.3.2.2.3). Anderes zeigen die bereits erwähnten Ergebnisse von Lyss et al. (2000), die für Matricin keine Inhibierung der DNA-Bindung von NF-κB (EMSA) beobachten konnten.³⁷³ Da die DNA-Bindung natürlich nur nach der Translokation von NF-κB in den Kern erfolgen kann, widersprechen diese Ergebnisse denen dieser Arbeit. Für einen methanolischen Schafgarbenextrakt wiederum, dessen wesentliche Sekundärstoffe als Flavonoide und Caffeoylchinasäurederivate angegeben wurden, der aber durchaus Proazulene enthalten könnte, wurde eine Hemmung der IL-1β induzierten NF-κB-Translokation bei HUVEC gezeigt.³⁷⁴ Hier bedarf es also weiterer Untersuchungen.

Zusätzliche Informationen lieferte ein modifizierter ICAM-Assay. Werden HMEC-1 mit LPS stimuliert, löst das ebenfalls eine erhöhte ICAM-1-Expression aus, jedoch wird diese im Fall von LPS-Aktivierung sowohl über den NF-κB-Weg als auch über den JAK/STAT-Signalweg (STAT-1) vermittelt.^{375,376,377,378} Matricin zeigte auch hier dosisabhängig und sogar noch deutlicher als bei der Stimulierung mit TNF-α eine hochsignifikante Verringerung der ICAM-1-Expression (auf 20,4%, 75 µM) (vgl. Abbildung 47). Um zu klären, ob auch der Transkriptionsfaktor STAT-1 an diesem Ergebnis beteiligt ist, wurden HMEC-1 mit IFN-γ stimuliert. IFN-γ hat die Eigenschaft die ICAM-1-Expression über den STAT-1-Weg zu vermitteln.^{379,380,381} Die ICAM-1-Expression konnte zwar mit IFN-γ dosisabhängig gesteigert werden, was die Funktionstüchtigkeit des Assays belegt (vgl. Abbildung 48), jedoch weder mit Matricin noch mit Chamazulen gehemmt werden. Lediglich Parthenolid hemmte die IFN-γ-induzierte ICAM-1-Expression leicht. Das negative Ergebnis gibt Grund zur Annahme, dass der JAK/STAT-Weg nicht an der beobachteten Aktivität von Matricin beteiligt ist (vgl. Abbildung 49). Die Vermutung liegt also nahe, dass Matricin bei humanen Endothelzellen *in vitro* über die Hemmung der Translokation des Transkriptionsfaktors NF-κB anti-

³⁷³ Lyss et al. 2000

³⁷⁴ Dall'Acqua et al. 2011

³⁷⁵ Van de Stolpe und Van der Saag 1996

³⁷⁶ Ebner et al. 2011

³⁷⁷ Sikorski et al. 2011a

³⁷⁸ Sikorski et al. 2011b

³⁷⁹ Roebuck und Finnegan 1999

³⁸⁰ Sikorski et al. 2011a

³⁸¹ Sikorski et al. 2011b

inflammatorisch wirkt. Auch für andere SL mit Guaianolidstruktur ist eine solche Translokationshemmung bekannt. So berichten z.B. Shin et al. (2005) von einer möglichen NF-κB-Translokationshemmung durch Zaluzalin-C und Estafiaton, allerdings bei murinen Makrophagen.³⁸² Ähnliches wird auch von Ergolid berichtet.³⁸³ Allerdings besitzen diese SL ein vermutlich aktivitätsbestimmendes Michael-System, Matricin hingegen nicht. Bezuglich des Wirkmechanismus des Matricins besteht also weiterhin Klärungsbedarf. Im Gegensatz zum Matricin erwies sich das Chamazulen in den durchgeföhrten Experimenten zur ICAM-1-Expression und NF-κB-Translokation als völlig inaktiv.

Um einen anderen Bereich im Entzündungsgeschehen zu beleuchten, nämlich die Aktivität der durch pro-inflammatorische Stimuli induzierbaren NO-Synthase (iNOS), wurden Matricin und Chamazulen an murinen Makrophagen (RAW 264.7) im sog. Griess-Assay getestet. NO hat neben einer immunmodulatorischen Signalwirkung auch direkte, anti-mikrobielle Wirkung bei akuten Entzündungen und Infektionen. Chronische oder übermäßige Produktion von NO kann allerdings zu Gewebeschäden führen und eine Hemmung der iNOS bzw. ein Absenken der NO-Konzentration in chronisch entzündetem Gewebe, kann damit ein Wirkprinzip entzündungshemmender Naturstoffe sein (vgl. B.1.4.3).^{384,385,386}

In den in dieser Arbeit durchgeföhrten Experimenten konnte gezeigt werden, dass Matricin und Chamazulen dosisabhängig die Nitrit-Konzentration im Überstand von LPS-stimulierten RAW 264.7-Zellen verringerten, wobei sich Matricin als deutlich aktiver erwies (Matricin: $IC_{50} = 20,9 \mu M$, Senkung auf 1,9% bei $100 \mu M$; Chamazulen: $IC_{50} = 59,3 \mu M$, Senkung auf 30,2% bei $100 \mu M$, vgl. B.3.2.1.7 und B.3.2.2.5). Matricin und Chamazulen wurden bisher nicht im Griess-Assay getestet, jedoch sind Ergebnisse für Kamillenextrakte bekannt. So konnten Bashkaran et al. (2010) mit einem Heißwasserextrakt von Kamille ebenfalls die NO-Produktion und die iNOS-Expression in RAW 264.7-Zellen hemmen und zeigten außerdem, dass dies durch die Inhibierung von NF-κB vermittelt wurde. Die Autoren halten sich jedoch über das mögliche wirksame Prinzip des verwendeten Extraks bedeckt. Lediglich Apigenin-Glykoside werden als Inhaltsstoffe genannt.³⁸⁷ Srivastava et al. (2009) konnten bei mit LPS stimulierten RAW 264.7-Zellen ebenfalls mit einem Kamillenheißwasserextrakt eine

³⁸² Shin et al. 2005

³⁸³ Han et al. 2001

³⁸⁴ Laroux et al. 2001

³⁸⁵ Dirsch et al. 2000

³⁸⁶ Moilanen und Vapaatalo 1995

³⁸⁷ Bhaskaran et al. 2010

Hemmung der COX-2 Aktivität bewirken.³⁸⁸ Es ist fraglich, ob evtl. auch eine geringe Menge Matricin in diesen Extrakten enthalten war und ob damit die gezeigte Aktivität erklärt werden kann. Ghassemi-Dehkordi (1988) untersuchte u.a. die Löslichkeit und Stabilität von Matricin in heißem Wasser und fand, dass sich beim Übergießen von 1 mg Matricin mit 5 ml kochendem Wasser nach 30 min etwa 56% davon lösten, aber nach 15 h fast alles Matricin zerfallen war. Es ist also fraglich, ob die Ergebnisse der genannten Untersuchungen mit Heißwasserextrakten mit einer möglichen Wirkung des darin enthaltenen Matricins zu erklären sind.³⁸⁹ Kastner et al. (1993) beschreiben jedoch, dass Proazulene sehr wohl in Teezubereitungen übergehen und damit einen Teil ihrer Wirksamkeit erklärt werden kann.³⁹⁰ Auch für die Proazulene (Proazulene des „Grünazulens“) Rupicolin A und B aus *Achillea setacea* konnte deren unzersetzter Übergang in einen Heißwasserauszug gezeigt werden.³⁹¹ Um diese Frage abschließend zu klären, wäre eine Gehaltsbestimmung von Matricin in Tee angebracht.

Da beim Griess-Assay lediglich die Nitrit-Konzentration 24 h nach Stimulierung gemessen wird, bleibt die Aussagekraft über den Wirkmechanismus beschränkt. Von der Erkennung des LPS-Stimulus bis hin zur NO-Synthese in den Zellen und der NO-Abgabe ins Medium liegen viele Schritte und damit auch viele mögliche Targets (vgl. B.1.4.3). Denkbare Angriffspunkte von Substanzen wären z.B. der LPS-Rezeptor, die Signaltransduktion (NF-κB oder JAK/STAT)³⁹², die DNA-Bindung des Transkriptionsfaktors, die Expression des iNOS-Gens, die Hemmung der iNOS selbst oder ganz am Ende der denkbaren Wirkmechanismen, das Abfangen der entstandenen NO-Radikale oder sogar das Stören der Farbreaktion mit dem Griessreagenz. Da für Chamazulen, wie bereits oben erwähnt, eine antioxidative Wirkung bzw. eine Hemmung von Peroxidierungsreaktionen von Lipiden und außerdem Radikalfängeraktivität gegenüber DPPH und Hydroxylradikalen gezeigt wurde, lag die Vermutung nahe, Chamazulen könnte mit den NO-Radikalen im Zellüberstand direkt reagieren.^{393,394} Zur Überprüfung dieser Vermutung wurde der zellfreie SNP-Assay gewählt, in dem die Konzentration der von SNP sukzessive abgegebenen NO-Radikale (in Form von Nitrit) über die Zeit und unter dem Einfluss von Testsubstanzen durch die Reaktion mit Griess-Reagenz (analog zum Griess-Assay mit RAW 264.7-Zellen) gemessen wird. Trotz

³⁸⁸ Srivastava et al. 2009

³⁸⁹ Ghassemi-Dehkordi 1988

³⁹⁰ Kastner et al. 1993

³⁹¹ Zitterl-Eglseer et al. 1991

³⁹² Ebner et al. 2011

³⁹³ Safayhi et al. 1994

³⁹⁴ Rekka et al. 1996

beachtlicher Standardabweichungen der Messwerte, blieb die Kurve des zeitlichen Verlaufs der Nitrit-Konzentration unter dem Einfluss von 100 µM Chamazulen immer deutlich unter der des Matricins (ebenfalls 100 µM), welche nahezu exakt parallel zur Kontrollkurve verlief. Nach 24 h ergab sich damit ein signifikanter Unterschied zwischen dem Mittelwert der Messwerte von Chamazulen und Matricin, während kein signifikanter Unterschied von Matricin und Kontrolle beobachtet wurde. Auch bereits nach 2 h fällt die Chamazulen-Kurve weit unter die Matricin- und Kontroll-Kurve ab (vgl. B.3.2.3.1). Dieses Ergebnis legt nahe, dass Chamazulen, nicht aber Matricin, entweder NO-Radikale abfängt oder die Reaktion der daraus entstandenen Nitrit-Ionen mit dem Griessreagenz stört. Um diese Erkenntnis besser auf die Bedingungen des Griess-Assays mit RAW 264.7-Zellen übertragen zu können, wurde ein modifizierter Griess-Assay, angelehnt an Fang et al. (2003) durchgeführt.³⁹⁵ Dabei konnte die Langzeitwirkung (24 h) mit der Kurzzeitwirkung (1 h) von Matricin und Chamazulen auf mit LPS stimulierten RAW 264.7-Zellen direkt verglichen werden. Während bei einer 24-stündigen Wirkdauer ein Einfluss auf die molekulare Maschinerie der Zellen wahrscheinlicher ist, zeigt eine Wirkzeit von nur einer Stunde eher schnellere Prozesse, wie z.B. das Abfangen von NO-Radikalen, an. Für Matricin konnte, wie durch die Ergebnisse des „normalen“ Griess-Assays erwartet, eine dosisabhängige Verminderung der Nitrit-Konzentration im Zellüberstand nach 24 h beobachtet werden. Nach nur einer Stunde war die Nitrit-Konzentration jedoch nicht verringert. Anders für das Chamazulen, welches sowohl nach 24 h, als auch nach nur einer Stunde, zwar etwas weniger, aber dennoch deutlich, die Nitrit-Konzentration dosisabhängig verringerte (vgl. B.3.2.3.2). Die Aktivität von Chamazulen im 24 h-Griess-Assay kann zwar wahrscheinlich nicht vollständig mit dem Abfangen von NO bzw. der Störung der Griessreaktion erklärt werden, aber zu einem wesentlichen Teil könnte dies die Erklärung für die Aktivität von Chamazulen im Griess-Assay sein. Der genaue Mechanismus der Aktivität von Matricin im Griess-Assay bleibt jedoch noch zu klären, z.B. über die Untersuchung eines möglichen Einflusses von Matricin auf die Transkription der iNOS-mRNA bzw. die Hemmung der iNOS-Aktivität selbst. Zusammen mit dem Ergebnis des SNP-Assays ist es aber sehr wahrscheinlich, dass die Aktivität von Matricin im Griess-Assay auf eine noch näher zu klärende Beeinflussung zellulärer Prozesse, wie z.B. der Hemmung der NF-κB-Translokation zurückzuführen ist. Hierfür sprechen auch die Ergebnisse, die durch die Experimente mit humanen Endothelzellen ermittelt wurden. Chamazulen hingegen fängt

³⁹⁵ Fang et al. 2003

wahrscheinlich vor allem die entstehenden NO-Radikale ab und wirkt nicht oder nur wenig auf die molekularen, zellbiologischen Prozesse wie etwa die Signaltransduktion ein (obwohl sich Radikalfängereigenschaften natürlich auch z.B. über den Arachidonsäure-Stoffwechsel entzündungshemmend auswirken können).³⁹⁶

Betrachtet man die hier präsentierten pharmakologischen Ergebnisse von Matricin und Chamazulen in ihrer Gesamtheit, spricht Vieles dafür, dass Matricin selbst eine anti-inflammatorische Wirkung, vermutlich über die Hemmung der Translokation von NF-κB, besitzt, während das Chamazulen, welches lediglich im Griess-Assay Aktivität zeigte, vermutlich über antioxidative und Radikalfängereigenschaften schwächer entzündungshemmend wirkt.

Die hier dargestellten Ergebnisse zum Matricin sind umso interessanter, als dass die meisten Veröffentlichungen zur entzündungshemmenden Wirkung von SL Strukturen betrachten, die mindestens ein Michael-System besitzen. So berichten Siedle et al. (2004) in einer groß angelegten Studie zur Struktur-Aktivitätsbeziehung bezüglich der NF-κB-Inhibierung von 103 verschiedenen SL, von der Wichtigkeit zweier α,β-ungesättigter Carbonylgruppen. Sie berichten aber auch von der damit verbundenen erhöhten Wahrscheinlichkeit der Zytotoxizität. Außerdem favorisieren die Autoren eine Guaianolidstruktur und eine Acylgruppe nahe einer exozyklischen Methylen-Gruppe. Allerdings besaßen alle der 103 untersuchten SL eine Exomethylen-Gruppe und somit ein Michael-System.³⁹⁷ Bis auf das Fehlen der α,β-ungesättigten Carbonylgruppen kommt Matricin diesen strukturellen Anforderungen nahe. Es besitzt sowohl Guaianolid-Struktur, als auch eine Acylgruppe. Das Michael-System, welches dem Matricin fehlt, wird jedoch als essentielle Strukturkomponente betrachtet. Parthenolid beispielsweise ist ebenfalls ein entzündungshemmendes SL mit Michael-System, von dem bekannt ist, dass seine Aktivität durch eine Alkylierung am Cystein der p65-Untereinheit von NF-κB zustande kommt.^{398,399} Auch für SL vom Helenanolid-Typ, welche ebenfalls mindestens ein Michael-System besitzen, wird von Entzündungshemmung, u.a. via NF-κB, aber auch von Zytotoxizität berichtet.⁴⁰⁰

³⁹⁶ Hänsel und Sticher 2007

³⁹⁷ Siedle et al. 2004

³⁹⁸ Hehner et al. 1999

³⁹⁹ Garcia-Pineres et al. 2004

⁴⁰⁰ Gertsch et al. 2003

Viele Veröffentlichungen zeigen außerdem, dass SL mit Michael-Systemen, die LPS induzierte NO-Produktion an RAW 264.7-Zellen hemmen können. So z.B. das Dehydrocostus-Lacton aus *Saussurea lappa*, welches die iNOS-Expression via NF-κB-Hemmung verminderte.^{401,402} Das ebenfalls u.a. aus *Saussurea lappa* isolierte Cynaropicrin hemmte sowohl die NO- als auch die TNF-α-Konzentration im Überstand von mit LPS und Interferon stimulierten RAW 264.7-Zellen. Die Autoren vermuten auch hier einen Mechanismus über die Bindung von Cynaropicrin an Sulfhydryl-Gruppen von Zielproteinen.⁴⁰³ Auch das aus *Artemisia asiatica* isolierte Artemisolid hemmte die LPS-induzierte NO-Produktion, aber auch die Expression der COX-2 und der iNOS über eine Inhibierung von NF-κB.⁴⁰⁴ Die SL Zaluzanin-C und Estafiaton aus *Ainsliaea acerifolia* zeigten den gleichen Effekt wie Artemisolid via Inhibierung von NF-κB (vermutlich eine Translokationshemmung). Beide Stoffe verminderten sowohl die Proteinmengen von iNOS und COX-2 als auch deren mRNA-Mengen. Die Aktivität konnte mit der Zugabe von Cystein geblockt werden, was eine Aktivität über eine Michael-Addition nahelegt.⁴⁰⁵ Die gleiche Wirkung auf iNOS und COX-2, sowohl auf Protein- als auch auf RNA-Level konnte für das SL Ergolid aus *Inula britannica* gezeigt werden. Auch hier wurde eine Translokationshemmung von NF-κB und eine Inhibierung dessen DNA-Bindung dafür verantwortlich gemacht.⁴⁰⁶ Außerdem zeigten Dirsch et al. (2000) an 10 verschiedenen SL mit α,β-ungesättigten Carbonylgruppen, u.a. Ambrosin, Bipinnatin, Helenalin, Hymenin oder Gaillardin eine z.T. starke Hemmung der LPS-induzierten NO-Synthese ($IC_{50} = 0,5\text{--}36,8 \mu\text{M}$). Auch wenn die Autoren keine Korrelation der Aktivität einer Substanz mit deren Anzahl an α,β-ungesättigten Carbonylgruppen feststellen konnten, zeigten sie doch, dass zumindest die Kombination eines Lactonrings mit einer Exomethylengruppe entscheidend für die Aktivität war, denn die einzige Verbindung, die dieses Strukturelement nicht aufwies (Glaucomid A7), zeigte mit einem IC_{50} von $36,8 \mu\text{M}$ die schwächste Aktivität. Auch Hydrierungsexperimente bestätigten die Wichtigkeit der α-Methylen-γ-lactongruppe. Allerdings konnte in diesem Fall, entgegen der Mehrzahl der restlichen Publikationen, die Aktivität der meisten getesteten SL nicht über die Hemmung von NF-κB erklärt werden. Die Autoren spekulieren mit der möglichen NO-Radikalfängereigenschaft der getestet SL. Sie schlussfolgern, dass die Fähigkeit einer Substanz, die NO-Menge im Überstand von LPS-

⁴⁰¹ Lee et al. 1999

⁴⁰² Jin et al. 2000

⁴⁰³ Cho et al. 2000

⁴⁰⁴ Reddy et al. 2006

⁴⁰⁵ Shin et al. 2005

⁴⁰⁶ Han et al. 2001

stimulierten RAW 264.7-Zellen zu vermindern nicht mit der Fähigkeit korrelieren muss, die NF-κB-Aktivierung zu hemmen, sondern dass neben der potentiellen Radikalfägereigenschaft von SL auch andere Wege der iNOS-Regulierung beeinflusst werden könnten.⁴⁰⁷ Dies steht auch im Einklang mit den hier präsentierten Ergebnissen, die zeigen, dass Matricin und Chamazulen zwar beide aktiv im Griess-Assay sind, jedoch nur Matricin auch auf die NF-κB-Aktivierung Einfluss nimmt.

Abschließend lässt sich sagen, dass die anti-inflammatorische Aktivität von SL bisher hauptsächlich mit dem Vorhandensein eines Michael-Systems erklärt wurde. Matricin fehlt eine solche funktionelle Gruppe. Es besitzt weder eine Cyclopentenon-Struktur noch eine Exomethylengruppierung und zeigt dennoch deutliche entzündungshemmende Aktivität *in vitro*. Andere SL mit α,β-ungesättigten Carbonylgruppen sind zwar deutlich aktiver als Matricin (IC₅₀-Wert im Griess-Assay von 20,9 μM) (vgl. IC₅₀-Werte bei Dirsch et al. 2000), jedoch weisen diese auch höheres zytotoxisches Potential auf. Matricin ist für HMEC-1 und für RAW 264.7 bis 75 μM untoxisch und kann damit als interessantes, entzündungshemmendes Molekül gelten, das keine nennenswerte Zytotoxizität aufweist. Außerdem konnte für Chamazulen *in vitro* gezeigt werden, dass es vermutlich über einen Radikalfängermechanismus und nicht über eine Beeinflussung der Signaltransduktionswege der Zelle antiphlogistisch wirksam ist. Dabei war Matricin in seiner Wirkung stets stärker als Chamazulen. Matricin ist damit, eine weitere Komponente in Kamillenzubereitungen, durch die deren Wirksamkeit erklärt werden könnte.

B.4.4 Bioaktivitätsgeleitete Fraktionierung eines Schafgarbenblütenextrakts

Das Inhaltsstoffspektrum der Schafgarbe ist sehr komplex, v.a. wenn man in Betracht zieht, dass die untersuchte Droge eine Mischung verschiedener Unterarten des *A. millefolium* Aggregats darstellt. Auch die Datenlage zur Pharmakologie von Extrakten, Fraktionen oder Proazulen aus der Schafgarbe ist eher spärlich, vor allem was *in vitro*-Untersuchungen angeht.⁴⁰⁸ Um sich der komplexen Inhaltsstoffzusammensetzung dieser Arzneipflanze pharmakologisch zu nähern, wurde ein Schafgarbenblütenextrakt (DCM) bioaktivitätsgeleitet fraktioniert, um die jeweiligen Aktivitäten des Extrakts zumindest auf einige Fraktionen

⁴⁰⁷ Dirsch et al. 2000

⁴⁰⁸ Jurenitsch 2007

eingrenzen zu können bzw. eventuell anti-inflammatoryisch wirksame Proazulene zu isolieren. Letzteres ist leider nicht gelungen. Die beobachteten Aktivitäten konnten daher nur einzelnen Fraktionen und keinen Reinsubstanzen oder Stoffgruppen zugeordnet werden. Allerdings lassen sich aufgrund der Chromatographiebedingungen und DC Vermutungen über die Zusammensetzung der Fraktionen anstellen. Es muss auch kritisch erwähnt werden, dass die Zytotoxizitäts-assays lediglich einmal durchgeführt wurden, was die Verlässlichkeit der Ergebnisse natürlich einschränkt. Dennoch gab die beobachtete Konzentrationsabhängigkeit der Aktivität, z.B. im Griess-Assay, Grund zur Annahme, dass es sich bei den Ergebnissen nicht nur um Zufallsereignisse handelt.

Wie aus Abbildung 66 ersichtlich ist, enthielten v.a. die Fraktionen III, IV und V der Kieselgel-Flash-Chromatographie Proazulene, was durch die Blaufärbung nach Derivatisierung mit EP-Reagenz angezeigt wurde.⁴⁰⁹ In der hydrophilsten Fraktion V wurde die kräftigste Proazulenbande beobachtet. Im ICAM-1-Assay waren die Fraktionen IV und V bereits bei einer Massenkonzentration von 6,25 µg/ml aktiv, wobei sich Fraktion V am aktivsten erwies (vgl.B.3.2.4.3). Die lipophilen Fraktionen I und II zeigten kaum Aktivität. Allerdings zeigte sich im MTT-Assay auch eine Zytotoxizität der Fraktion V (vgl. B.3.2.4.2), jedoch nicht im getesteten Konzentrationsbereich. Die Fraktion IV allerdings, die ebenfalls die ICAM-1-Expression von HMEC-1 bei einer Testkonzentration von bereits 6,25 µg/ml deutlich senkte , erwies sich im MTT-Assay als kaum toxisch (vgl. B.3.2.4.2). Auch der entfettete Rohextrakt selbst zeigte in der nicht-toxischen Konzentration von 12,5 µg/ml eine starke Hemmung der ICAM-1-Expression, sogar stärker als Parthenolid (5 µM). Es lässt sich also zusammenfassend sagen, dass sowohl der Extrakt als auch die Fraktionen IV und V die ICAM-1-Expression von HMEC-1 im nicht-toxischen Bereich deutlich hemmten (vgl. B.3.2.4.3).

Dies steht im Einklang mit anderen Untersuchungen, bei denen ebenfalls eine anti-inflammatoryische Wirkung der Schafgarbe gezeigt werden konnte. In einer *in vivo*-Studie wurde am Rattenpfotenödem eine entzündungshemmende Wirkung eines wässrigen Extraks aus *A. millefolium* Blüten beobachtet. Die Autoren belegen die Abwesenheit von Flavonoiden, Alkaloiden, Saponinen und reduzierenden Zuckern in der aktivsten Fraktion und schreiben die Aktivität aber nicht näher definierten Protein-Kohlenhydratkomplexen zu.⁴¹⁰ Aufgrund der durch die Autoren vorgenommenen, relativ langwierigen und chemisch eher aggressiven Aufarbeitung des Extrakts ist die Anwesenheit von labilen Proazulen

⁴⁰⁹ Stahl und Schild 1986

⁴¹⁰ Goldberg et al. 1969

zwar eher unwahrscheinlich, jedoch nicht ausgeschlossen. Zittler-Eglseer et al. (1990) konnten eine leichte Ödemhemmung durch das Proazulen (Proazulen des sog. „Grünazulens“) Rupicolin B, isoliert aus *A. setacea*, zeigen und eine starke Ödemhemmung durch Matricin, das ebenfalls in *A. millefolium* agg. vorkommt.⁴¹¹ Della Loggia et al. (1992) konnten am Mausohr-Ödem nachweisen, dass Extrakt und Fraktionen der proazulenreichen Unterart des *A. millefolium* Aggregats *A. asplenifolia* stärkere Ödemhemmung aufwiesen als die der proazulenfreien Unterart *A. pratensis*, was stark für eine Beteiligung der Proazulene an der entzündungshemmenden Wirkung von *A. millefolium* spricht.⁴¹² Kastner et al. (1993) zeigten für 9 verschiedene SL aus unterschiedlichen Taxa der *A. millefolium*-Gruppe eine Ödemhemmung. Dabei erwiesen sich auch die Proazulene Achillicin, 8 α -Tigloxy-10-epi-artabsin, dessen Angeloxy-Derivat und Matricin als mäßig bis stark wirksam.⁴¹³ Auch Zidorn et al. (1999) berichteten u.a., wie oben schon erwähnt, über die entzündungshemmende Wirkung von Matricin und Achillicin.⁴¹⁴ Benedek et al. (2007) fanden eine anti-inflammatorische Wirkung (Protease-Inhibierung) eines methanolischen *A. millefolium* Extraks und zweier Fraktionen, die reich an Flavonoiden bzw. an Caffeoylchinasäurederivaten waren. Zumindest für den Rohextrakt könnten auch Proazulene für die Wirkung mit verantwortlich sein.⁴¹⁵ Ähnliche Ergebnisse erzielten, wie oben schon erwähnt, Dall'Aqua et al. (2011) mit einem Flavonoid- und Caffeoylchinasäure- reichen methanolischen Schafgarbenextrakt. Sie konnten unter anderem zeigen, dass durch den Extrakt, der auch Proazulene enthalten könnte, die IL-1 β induzierte NF- κ B-Translokation bei HUVEC gehemmt wurde.⁴¹⁶

Andere Ergebnisse belegen jedoch, dass auch proazulenfreie Achillea-Extrakte anti-inflammatorisch wirksam waren. So zeigten Maswadeh et al. (2006) eine Ödemhemmung an Ratten für einen ethanolischen Extrakt von *Achillea fragrantissima*.⁴¹⁷ Das ätherische Öl von *A. fragrantissima* enthält jedoch kein Chamazulen und damit ist auch das Vorhandensein von Proazulenen unwahrscheinlich.⁴¹⁸ Die Datenlage zur Wirksamkeit bzw. Unwirksamkeit der Proazulene aus der Schafgarbe ist also ähnlich unsicher, wie beim Matricin. Insgesamt lässt sich jedoch aufgrund der dargestellten Datenlage anderer Projekte und der präsentierten

⁴¹¹ Zitterl-Eglseer et al. 1991

⁴¹² Della Loggia et al. 1992

⁴¹³ Kastner et al. 1993

⁴¹⁴ Zidorn et al. 1999

⁴¹⁵ Benedek et al. 2007b

⁴¹⁶ Dall'Acqua et al. 2011

⁴¹⁷ Maswadeh et al. 2006

⁴¹⁸ Shalaby und Richter 1964

Daten der vorliegenden Arbeit zur entzündungshemmenden Wirkung von Matricin vermuten, dass die beobachtete Aktivität des Schafgarbenblütenextrakts und der Fraktionen III-V im ICAM-1-Assay zumindest teilweise auf deren Gehalt an Proazulenen zurückzuführen ist.

Analog zu den Experimenten mit Matricin und Chamazulen wurden auch bei der Schafgarbe weitere Versuche durchgeführt, um die Aussagekraft zu steigern. Im Griess-Assay zeigte sich, dass die Fraktionen III, IV und V und auch der Extrakt (E) konzentrationsabhängig die Nitrit-Konzentration im Zellüberstand von LPS-stimulierten RAW 264.7-Zellen potent reduzierten (vgl.B.3.2.4.5). So konnten die Fraktionen IV und V noch bei einer Konzentration von 5 µg/ml die Nitrit-Konzentration auf unter 40% bezogen auf die Negativkontrolle senken. Auch der Extrakt selbst vermochte bei einer Konzentration von 5 µg/ml die Nitrit-Konzentration auf unter 40% reduzieren. Bei vergleichbarer Konzentration waren nur die Fraktionen IV und V aktiver. Fraktion I zeigte dagegen keine und Fraktion II lediglich leichte Aktivität. Es zeigten also hauptsächlich die proazulenhaltigen Fraktionen die Eigenschaft, die Nitritkonzentration im Griess-assay zu senken. Die getesteten Konzentrationen bewegten sich in diesem Fall alle im nicht-toxischen Bereich (vgl. B.3.2.4.4). Wenn man bedenkt, dass die Inhaltsstoffe der Fraktionen IV und V nur zu relativ geringem Anteil im Extrakt enthalten sind, könnte das (spekulativ) für einen synergistischen Effekt der Inhaltsstoffe des Extraks sprechen.^{419,420} In einer ähnlichen Untersuchung mit humanen Neutrophilen wurde eine Hemmung des „oxidativen bursts“, eine Reaktion der Immunzellen auf mikrobielle Infektionen, welche bei chronischem Auftreten allerdings Ursache verschiedener entzündlicher Erkrankungen sein kann, durch Extrakte und Fraktionen dreier Spezies aus dem *A. millefolium*-Komplex beobachtet (*A. collina*, *A. asplenifolia* und *A. distans*). Hierbei fällt auf, dass jeweils die SL-reichen (z.T. auch proazulenhaltigen) Fraktionen am aktivsten waren. Dass diese wirksamer waren als die jeweiligen Subfraktionen spricht auch für einen synergistischen Effekt der Inhaltsstoffe der SL-Fraktionen. Jedoch waren auch die Fraktionen der proazulenfreien Art *A. distans* aktiv, was wiederum gegen die Wirksamkeit der Proazulene spricht.⁴²¹ Burk et al. (2010) konnten analog zu den Ergebnissen der vorliegenden Arbeit, eine dosisabhängige Verringerung der Nitrit-Konzentration im Überstand von LPS-stimulierten RAW 264.7 Zellen zeigen und gleichzeitig eine Verringerung der iNOS-Proteinmenge und eine Hemmung der

⁴¹⁹ Wagner 2006

⁴²⁰ Wagner und Ulrich-Merzenich 2009

⁴²¹ Choudhary et al. 2007

Aktivität von NF-κB, allerdings für einen wässrigen Schafgarbenblütenextrakt.⁴²² Der wässrige Extrakt war bis zu einer Konzentration von 300 µg/ml nicht toxisch, im Gegensatz zu dem in dieser Arbeit getesteten DCM-Extrakt, der bereits bei 25 µg/ml Toxizität zeigte. Über die Zusammensetzung des wässrigen Extrakts halten sich die Autoren bedeckt. Es kann aber durchaus angenommen werden, dass sich darin auch Proazulene befanden, wie Zittler-Eglseer et al. (1991) zeigten.⁴²³ Neben der Beeinflussung des NF-κB-Wegs, könnten jedoch auch bei der Schafgarbe, ähnlich wie oben für das Chamazueln gezeigt, antioxidative bzw. Radikalfängereigenschaften für die Verringerung der Nitrit-Konzentration im Griess-Assay verantwortlich sein. So wiesen z.B. das allerdings chamazulenfreie ätherische Öl von *A. millefolium* subsp. *millefolium* und ein methanolischer Extrakt der Pflanze Radikalfängereigenschaften (DPPH) auf.⁴²⁴ Starke antioxidative und Radikalfängerkapazität wurden auch für methanolische Extrakte von *A. millefolium*, *A. distans* und *A. moschata* berichtet, was allerdings mit phenolischen Inhaltsstoffen in Verbindung gebracht wurde.^{425,426} Methanolische Extrakte können jedoch ebenso Proazulene enthalten. Die beobachtete Senkung der Nitrit-Konzentration im Griess-Assay nur einer Stoffgruppe oder gar einer einzelnen Verbindung zuzuschreiben, ist angesichts der unklaren, bisherigen Datenlage nicht möglich. Jedoch scheint eine Beteiligung der Proazulene aus der Schafgarbe an zahlreichen *in vitro* Effekten sehr wahrscheinlich zu sein.

Die beobachtete Zytotoxizität der Fraktion V und auch des Extrakts selbst ist evtl. auf das Vorhandensein zytotoxischer bzw. antiproliferativer, methoxylierter Flavonoide wie Centaureidin oder Casticin zurückzuführen (beide wurden in einer analogen Fraktion eines Schafgarbenkrautextrakts gefunden, Daten nicht veröffentlicht). Es könnte aber auch das zytotoxische seco-Pseudoguaianolid Paulitin dafür verantwortlich sein.⁴²⁷ Auch das aus einem methanolischen Schafgarben Extrakt isolierte, epoxylierte Guaianolid Achillinin A erwies sich als zytotoxisch gegenüber humanen Tumorzelllinien, ebenso wie die von Rücker et al. (1991) isolierten Guaianolid-Peroxide.^{428,429} Wegen der strukturellen Ähnlichkeit dieser Guaianolide mit den Proazulenen wäre ein gemeinsames Vorkommen in einer Fraktion nicht unwahrscheinlich und damit könnten die genannten Verbindungen die Ursache für die

⁴²² Burk et al. 2010

⁴²³ Zitterl-Eglseer et al. 1991

⁴²⁴ Candan et al. 2003

⁴²⁵ Vitalini et al. 2006

⁴²⁶ Vitalini et al. 2011

⁴²⁷ Csupor-Löffler et al. 2009

⁴²⁸ Li et al. 2011

⁴²⁹ Rücker et al. 1991

beobachtete Zytotoxizität sein. Trotz dieser Toxizität sticht die enorme anti-inflammatorische Potenz des Extrakts und der Fraktionen III-V ins Auge, was mit der traditionellen Anwendung von Schafgarbe im Einklang steht.^{430,431}

Abschließend lassen die Ergebnisse, v.a. im Zusammenhang mit den pharmakologischen Ergebnissen zum Matricin, den Schluss zu, dass zumindest ein Teil der Aktivität des Schafgarbenblütenextrakts und v.a. der Fraktionen IV und V auf deren Gehalt an Proazulenen zurückzuführen ist. Jedoch sind weitere bioaktivitätsgeleitete Fraktionierungsschritte nötig, um diese Hypothese zu bestätigen.

B.4.5 Ausblick

Die hier präsentierten Ergebnisse liefern bisher lediglich Vermutungen was den Wirkmechanismus von Chamazulen und v.a. von Matricin angeht. Da für Matricin aus Ermangelung einer α,β -ungesättigten Carbonylgruppe kein Mechanismus nach einer Michael-Addition angenommen werden kann, bleibt zu klären, nach welchem Mechanismus Matricin mit welchen Proteinen der Zelle (v.a. NF- κ B?) wechselwirkt. Dazu wäre z.B. die erneute Durchführung der Assays mit gleichzeitiger Zugabe von Cystein denkbar, um z.B. eine Reaktion mit Sulfhydryngruppen zu untersuchen.⁴³² Außerdem sind weitergehende Experimente nötig, um u.a. den Einfluss von Matricin und Chamazulen auf dem Niveau der mRNA-Expression von ICAM-1, iNOS und anderer interessanter Targets wie z.B. COX-2, zu untersuchen und auf Proteinebene v.a. den Einfluss auf iNOS, COX-2 und STAT-1 zu klären. Dazu müssten quantitative RT-PCR-Experimente, Western-blot-Analysen oder weitere immunfluoreszenzmikroskopische Aufnahmen stimulierter Zellen durchgeführt werden. Außerdem könnte, um den Einfluss von Matricin und Chamazulen auf die DNA-Bindung von Transkriptionsfaktoren wie NF- κ B oder STAT zu untersuchen, ein EMSA (electrophoretic mobility shift assay) durchgeführt werden. Da TNF- α auch über den Transkriptionsfaktor AP-1 Signale in die Zelle transduziert, und ein Crosstalk zwischen NF- κ B- und AP-1-Weg vermutet wird, wäre AP-1 ebenfalls ein Target für weiterführende Untersuchungen.⁴³³ Interessant wäre auch die analoge Testung des aus *Achillea millefolium* L. isolierten 8-Desacetyl-8-angeloyl-4-*epi*-matricins. Dieses besitzt eine α,β -ungesättigte Carbonylgruppe in

⁴³⁰ Benedek und Kopp 2007

⁴³¹ Aplequist und Moerman 2011

⁴³² Shin et al. 2005

⁴³³ Hayden und Ghosh 2004

der Seitenkette und hätte damit alkylierendes Potential. Ein möglicher Unterschied der Aktivität im Vergleich der Daten mit denen des Matricins könnte dann auf den Unterschied der Seitenketten zurückgeführt werden. Wie an den mit EP-Reagenz besprühten DC-Platten gut zu erkennen ist, ist eine große Vielfalt an Proazulen in den untersuchten Extrakten aus Schafgarbenblüten und -kraut enthalten (vgl. Abbildung 37 und Abbildung 66). Es steht also eine relativ große Zahl weiterer proazulener Verbindungen zur Verfügung, die zur Testung herangezogen werden könnten. Bedingt durch deren große strukturelle Verwandtschaft, könnten damit auch Struktur-Wirkungs-Beziehungen beleuchtet werden, um den noch im Dunkeln liegenden Wirkmechanismus von Matricin und strukturverwandten Proazulen weiter aufzuklären. Ein ebenso spannendes Feld ist die Untersuchung der Bioverfügbarkeit, der Membrangängigkeit und der Metabolisierung von Matricin oder strukturverwandten Proazulen.

C Chemoökologische Untersuchungen zu *Arnica montana* L.

C.1 Einleitung

C.1.1 Einführung in die Chemoökologie

Die Interaktionen der verschiedensten Organismen aller taxonomischen Gruppen untereinander sind nicht nur im für uns sichtbaren, makroskopischen Bereich faszinierend, sondern vor allem auch auf der Ebene der Moleküle. Dabei erweist sich das Pflanzenreich als besonders vielfältig, was vor allem damit zu erklären ist, dass sich Pflanzen, als sessile Lebewesen, einem negativen Umweltreiz nicht durch einfachen Ortswechsel entziehen bzw. sich einem postiven nähern können. Sie müssen sich v.a. biochemisch mit ihrer Umwelt auseinandersetzen. Sie locken Bestäuber oder Nützlinge an oder wehren sich gegen Herbivoren, konkurrierende Pflanzen, gegen erhöhte UV-Strahlung oder niedrige Temperaturen.⁴³⁴ Alle Wechselwirkungen auf chemischer oder biochemischer Ebene von Lebewesen untereinander (sog. Allelopathie unter Pflanzen) bzw. von Lebewesen mit ihrer unbelebten Umwelt sind Forschungsgegenstand der relativ jungen Disziplin der Chemoökologie oder auch chemischen Ökologie.⁴³⁵ Ein sehr interessantes Teilgebiet stellt dabei die Beziehung der Pflanzen zu ihren Fraßfeinden dar. Pflanzen haben verschiedene Mechanismen entwickelt, sich vor Herbivoren zu schützen. So reichern sie toxische oder schlecht schmeckende Sekundärmetabolite in ihren Geweben an oder locken durch flüchtige Stoffe, sog. Kairomone, Parasitoide ihrer Fressfeinde an.^{436,437} Vermutlich besitzen alle Pflanzen konstitutive oder induzierbare Mechanismen zur Anreicherung toxischer Sekundärmetabolite.⁴³⁸ Eine große Zahl an verschiedenen Stoffgruppen, praktisch aus dem gesamten Spektrum der Sekundärstoffe, ist an der Abwehr von Herbivoren und Pathogenen beteiligt. Hierzu gehören u.a. phenolische Verbindungen wie beispielsweise das Platiphyllosid oder das als Phytoalexin fungierende Resveratrol, Alkaloide wie das insektizide Nikotin oder die in vielen Asteraceen vorkommenden Pyrrolizidinalkaloide, Gerbstoffe und eine Vielzahl von flüchtigen und nichtflüchtigen Terpenoiden.^{439,440}

⁴³⁴ Harborne 1995

⁴³⁵ Harborne 1995

⁴³⁶ Harborne 1997

⁴³⁷ Schulze et al. 2002

⁴³⁸ Howe und Jander 2008

⁴³⁹ Harborne 1997

⁴⁴⁰ Acamovic und Brooker 2005

Die größte Gruppe sekundärer Pflanzenstoffe ist die der Terpenoide. Dazu zählen u.a. toxische Drimane, Steroidglykoside, Iridoidglykoside, abschreckend wirkende, flüchtige Mono- und Sesquiterpene oder die nicht flüchtigen Sesquiterpenlactone (SL).^{441,442} Letztere stellen mit ca. 5000 bekannten Verbindungen eine große Gruppe innerhalb der Terpene dar und besitzen vielfältige biologische Aktivität, wie einige Beispiele verdeutlichen sollen.⁴⁴³ So dienen etwa die von den Wurzeln in den Boden abgegebenen Strigolactone als Wachstumsstimulantien für symbiotische Mykorrhizapilze, gleichzeitig aber auch als Lockstoff parasitischer Orobanche-Arten, wie das Beispiel des Orobanchols zeigt.^{444,445,446} Einige SL, wie z.B. Parthenin, Damsin und Coronopilin, die im Wurzellexudat von *Parthenium hysterophorus* (Asteraceae, tropisches Amerika) enthalten sind bzw. durch Auslaugen abgestorbener Pflanzenteile in den Boden gelangen, wirken allelopathisch als Keimungs- und Wachstumshemmer anderer Pflanzen. Sogar das Auskeimen der Pollenkörner anderer Arten wird durch die ebenfalls im Pollen von *P. hysterophorus* enthaltenen SL gehemmt. Auch das α-Santonin bei *Sinapis juncea* wirkt als Wachstumshemmer.⁴⁴⁷

Andere SL, wie z.B. das Parthenolid oder das Neurolenin B, fungieren als Fraßschutzstoffe u.a. gegen Schmettlingslarven.⁴⁴⁸ Das in *Artemisia absinthium* enthaltene Germacranolid Hydroxypelenolid zeigte eine fraßhemmende bzw. abschreckende Wirkung auf Herbivoren, wie z.B. Blattläuse.⁴⁴⁹ Eine Reihe von SL aus argentinischen Pflanzen erwiesen sich als aktiv gegen Insektenfraß durch den Mehlkäfer *Tenebrio molitor*.⁴⁵⁰ Am Beispiel der isomeren SL Tomentosin (cis) und Xanthinosin (trans) konnte sogar ein Einfluss der Isomerie auf die fraßhemmende Wirkung bei der Heuschreckenart *Schistocerca americana* nachgewiesen werden.⁴⁵¹

Aber auch abiotische Faktoren wie z.B. Bodenparameter, Strahlung oder die Temperatur können das Inhaltsstoffspektrum von Pflanzen maßgeblich beeinflussen. So konnte in einer Studie am wilden Hopfen (*Humulus lupulus* L.) in Bayern ein Einfluss der Lichteinstrahlung und des Boden-pH-Werts auf den Xanthohumolgehalt gezeigt werden.⁴⁵² Darüber hinaus

⁴⁴¹ Harborne 1997

⁴⁴² Gershenson und Dudareva 2007

⁴⁴³ Schmidt 2006

⁴⁴⁴ Galindo et al. 2002

⁴⁴⁵ Akiyama et al. 2005

⁴⁴⁶ Bouwmeester et al. 2007

⁴⁴⁷ Picman 1986

⁴⁴⁸ Passreiter und Isman 1997

⁴⁴⁹ Gonzalez-Coloma et al. 2012

⁴⁵⁰ Sosa und Tonn 2008

⁴⁵¹ Ahern und Whitney 2014

⁴⁵² Flemming 2008

konnte bei Erdbeeren beobachtet werden, dass u.a. die Temperatur und die Zusammensetzung des Kultursubstrats (Kompostgabe) den Gehalt an Resveratrol beeinflussten.⁴⁵³ Ähnliches wurde auch für Kulturblaubeeren (*Vaccinium corymbosum* L.) nachgewiesen. Hier enthielten ökologisch angebaute Beeren einen höheren Gehalt an Zuckern, Phenolen, Anthocyhanen und wiesen ein höheres antioxidatives Potential auf als solche, die konventionell angebaut wurden. Die größten Unterschiede der beiden Anbaumethoden lagen dabei in der Düngung, also bei Bodenparametern.⁴⁵⁴ Bei der Besenheide (*Calluna vulgaris* (L.) HULL) konnte ein Einfluss der Höhenlage auf die Zusammensetzung der phenolischen Inhaltsstoffe nachgewiesen werden.⁴⁵⁵ Auch bei einigen Mitgliedern der Familie der *Asteraceae* wurde vom Einfluss der Höhenlage auf die Zusammensetzung und den Gehalt der Phenole berichtet, so z.B. bei *Scorzoneroïdes helvetica*, *S. autumnalis* und *Leontodon hispidus*, *Crepis capillaris*, *Hieracium pilosella* und *Hypochaeris radicata*. Für *Matricaria chamomilla* und *Arnica montana* konnte ebenfalls ein solcher Zusammenhang ermittelt werden.^{456,457,458,459} Bei *A. montana* erwies sich letztlich die Temperatur als einflussreichster Faktor.⁴⁶⁰ In gleicher Weise wurde eine Wirkung von Umweltparametern auf den Gehalt von SL gezeigt. In der oben erwähnten Studie zu *Artemisia absinthium* wurden Unterschiede im Gehalt des SL Hydroxypelenolid aufgrund des Wuchsorts festgestellt. Die Autoren machten Temperaturunterschiede dafür verantwortlich.⁴⁶¹ Für den Gehalt des SL Artemisinin konnte ebenfalls ein Einfluss der Temperatur gezeigt werden.⁴⁶²

All diese Untersuchungen belegen, dass die Frage nach den umweltbedingten Ursachen der qualitativen und quantitativen inhaltsstofflichen Zusammensetzung eines Organismus von grundsätzlichem wissenschaftlichem, aber auch von wirtschaftlichem Interesse ist. Gleiches gilt für die Frage, welchen Einfluss die Erbanlagen auf das Inhaltsstoffspektrum besitzen. Mit Hilfe von Common-garden-Experimenten mit genetisch unterschiedlichen Individuen bzw. von Kultivierungsexperimenten mit genetisch gleichen Individuen an möglichst unterschiedlichen Standorten kann man sich der Klärung dieser Fragen nähern. Auch

⁴⁵³ Wang et al. 2007

⁴⁵⁴ Wang et al. 2008

⁴⁵⁵ Monschein et al. 2010

⁴⁵⁶ Zidorn et al. 2005

⁴⁵⁷ Spitaler et al. 2006

⁴⁵⁸ Spitaler et al. 2008

⁴⁵⁹ Zidorn 2010

⁴⁶⁰ Albert et al. 2009

⁴⁶¹ Gonzalez-Coloma et al. 2012

⁴⁶² Marchese und Rehder 2001

„natürliche Common-garden-Experimente“ können dazu herangezogen werden. Denn unterscheiden sich Individuen, die an einem Standort nahezu den gleichen abiotischen und z.T. auch biotischen Faktoren, wie z.B. Beweidung, ausgesetzt sind, in einer Eigenschaft sehr stark, kann man dies eben nicht nur mit einer Adaption an die Umweltbedingungen erklären, die ja für diese Individuen gleich wären. Respektive lässt es den Schluss zu, dass diese Eigenschaft zumindest stärker von den Erbanlagen als von Umweltfaktoren beeinflusst ist.⁴⁶³

Viele Veröffentlichungen beschäftigen sich mit dem Einfluss von Umweltfaktoren auf das Spektrum phenolischer Inhaltsstoffe, weniger mit den Auswirkungen auf das der SL. Letztere sind jedoch für die Droge Arnikablüten qualitätsbestimmend. Daher ist die Klärung nach der Beeinflussbarkeit des Gehalts und der Zusammensetzung der Helenaline und Dihydrohelenaline, den wichtigsten SL in Arnika, durch den Standort von großem Interesse, sowohl für die Wildsammlung als auch für die Kultivierung von Arnika. Auch für die Züchtung neuer Arnika-Kultursorten ergäben sich aus der Klärung der Frage, ob der Gehalt an SL eher vererbt oder von der Umwelt beeinflusst wird, wichtige Erkenntnisse.

C.1.2 Artbeschreibung von *Arnica montana* L.

C.1.2.1 Botanik von *Arnica montana* L.

Die Herkunft des wissenschaftlichen Gattungsnamens *Arnica* ist unklar. Evtl. stammt er sogar aus dem Arabischen. In Form von „Arnick“ erscheint der Name zum ersten Mal im 14. Jahrhundert bei Matthaeus Sylvaticus. Das Epitheton „*montana*“ leitet sich ab vom Lateinischen „*montanus*“ = „auf Bergen“ und bezieht sich wohl auf das häufige Vorkommen der Pflanze auf Bergwiesen. Der meistgebrauchte Volksname „Berg-Wohlverleih“ wird zum einen mit der Heilkraft der Arnika in Zusammenhang gebracht, andererseits leitet sich das Wort „Wohl“ möglicherweise aber auch von „Wolf“ ab.^{464,465} Systematisch wird Arnika, wie die Kamille und auch die Schafgarbe, innerhalb der Familie der *Asteraceae* in die Unterfamilie der *Astroideae* eingeordnet. Innerhalb der Unterfamilie wurde Arnika dem Tribus *Madieae* (Jepson, 1901) zugeordnet, welcher sich aus 36 Gattungen und etwa 200 Arten zusammensetzt, deren Verbreitungsschwerpunkt im westlichen Nordamerika liegt.

⁴⁶³ Hoffmann und Sgrò 2011

⁴⁶⁴ Hegi 1954

⁴⁶⁵ Düll und Kutzelnigg 2011

Aktuell wird Arnika, nachdem sie lange Zeit in den Tribus Senecioneae eingeordnet wurde, in den Tribus Heliantheae gestellt.⁴⁶⁶ Die aus etwa 30 (32 nach Merfort, 2007), meist montan oder boreal vorkommenden Arten bestehende Gattung *Arnica* selbst wird in den Subtribus *Arnicinae* eingeordnet, dessen meist ausdauernde, krautige Arten sich durch den Besitz von Rhizomen, gegenständiger Blätter und häufig gelben, gelb-orangen Strahlenblüten auszeichnen.^{467,468} Die Art *A. montana* L. wird gemeinsam mit *A. acaulis* (WALTER) BRITTON, STERNS & POGGENB. zum Subgenus *Montana* zusammengefasst.⁴⁶⁹

Arnica montana L. ist eine krautige, perenne, rhizombildende, Halbrosettenpflanze mit ca. 20-60 cm hohen, meist nur wenig verzweigten Stengeln mit 1-3 gegenständigen Blattpaaren, an deren Enden 1-3 (bis 9) Blütenköpfchen sitzen. Die Pflanze besitzt drüslose und drüsige Haare. Die derben, kurz behaarten Grundblätter sind bis zu 15 cm lang und 4 cm breit, ganzrandig, elliptisch, drüsig punktiert und besitzen 5-7 an der Unterseite hervorspringenden, parallelen Blattnerven. Die Stängelblätter sind kleiner. Die 5-8 cm breiten Köpfchen stehen meist einzeln und werden zweireihig von ca. 15 mm langen, lanzettlich spitzen Hüllblättern umgeben, von denen zumindest die äußeren drüsig behaart sind. Die Krone ist ebenfalls behaart und dottergelb gefärbt. Die z.T. über 50, 5-zähnigen Röhrenblüten sind zwittrig, die äußeren, meist 3-zähnigen Zungenblüten weiblich. Der gewölbte Blütenboden besitzt keine Spreublätter. Die Früchte sind etwa 5 mm lang, schwarz, beidseitig zugespitzt, behaart und besitzen einen ca. 8 mm langen, gelblichen Pappus.^{470,471}

Abbildung 71 zeigt den Habitus von Arnikapflanzen in Maramureş (Rumänien).

⁴⁶⁶ Merfort 2007

⁴⁶⁷ Kadereit und Jeffrey 2007

⁴⁶⁸ Merfort 2007

⁴⁶⁹ Merfort 2007

⁴⁷⁰ Hegi 1954

⁴⁷¹ Sebald et al. 1996



Abbildung 71: Habitus von *Arnica montana* L. in Maramureş (Rumänien).

Die Blütezeit erstreckt sich, je nach Wuchsort, etwa von Mai bis August. Arnika kommt als konkurrenzschwache Pflanze hauptsächlich auf nährstoffarmen Standorten (also meist extensiv bewirtschafteten, anthropogenen Standorten) wie Magerwiesen und –weiden, Heiden und am Rand von Mooren oder an Waldrändern vor.⁴⁷² Bevorzugt werden dabei frische, saure, auch sandige Böden in sonniger Lage. In Mitteleuropa findet sich Arnika einzeln, gern aber auch gruppenweise, von der Ebene bis in die hochalpine Stufe (in Bayern bis ca. 2000 Hm, im Wallis bis ca. 2800 Hm). Das Verbreitungsgebiet von *Arnica montana* L. reicht in Nord-Süd-Richtung von Skandinavien über ganz Mitteleuropa bis zur Iberischen Halbinsel und den Nordbalkan und in West-Ost-Richtung von Nordfrankreich bis ins Baltikum, Polen, Rumänien, Ukraine und Südrussland.^{473,474}

Die ehemals weit verbreitete Art ist heute durch Übernutzung der Populationen als Medizinalpflanze oder durch Habitatzerstörung, wie z.B. durch Intensivierung der Landwirtschaft oder zu hohen Viehbestand auf den Wiesen, stark zurückgegangen. Sie ist im Annex D (EU Council Regulation No. 338/97) als geschützte Pflanze gelistet. Auch wenn

⁴⁷² Rotar et al. 2009

⁴⁷³ Hegi 1954

⁴⁷⁴ Sebald et al. 1996

Arnika zwar prinzipiell mit der Kultursorte ARBO als kultivierbar gilt, ist der Anbau schwierig und arbeitsintensiv. Und so stammt der Großteil der Droge nach wie vor aus mehr oder weniger kontrollierter Wildsammlung, meist aus Süd- und Südost-Europa.⁴⁷⁵

C.1.2.2 Phytochemie von *Arnica montana* L.

Neben dem Rhizom und dem Kraut werden vor allem die aromatisch duftenden Arnikablütenköpfchen (*Arnicae flos*) arzneilich verwendet. Aus Arnikablüten werden wässrige, ölige und ethanolische Auszüge (Arnikatinktur) hergestellt, welche äußerlich bei stumpfen Verletzungen, wie z.B. Hämatomen, Prellungen, Quetschungen, und rheumatischen Muskel- und Gelenkbeschwerden eingesetzt werden. Außerdem findet Arnika Anwendung bei Entzündungen im Mund- und Rachenraum, bei Furunkulose und Entzündungen der Haut als Folge von Insektenstichen.⁴⁷⁶ Die wichtigste, weil qualitätsbestimmende Inhaltsstoffgruppe bei *Arnica montana* L. sind Sesquiterpenlactone (SL) mit Pseudoguaianolid-Grundgerüst, welche über C-6 mit kurzkettigen Fettsäuren verestert sein können. Diese SL-Ester lassen sich in zwei verschiedene Gruppen gliedern. Ist die Bindung zwischen C-11 und C-13 gesättigt, spricht man von Helenalinen (Hel), ist sie ungesättigt, von 11 α ,13-Dihydrohelenalinen (DHel). Abbildung 72 zeigt die Strukturen der in dieser Arbeit untersuchten SL-Ester (außer den gezeigten finden sich noch die DHel-Ester der Angelica- und der Seneciosäure und der Hel-Ester der Angelicasäure). Die SL-Ester kommen in einer Konzentration von 0,2-0,8% in der Droge vor (Mindestgehalt nach PhEur 7.0: 0,40%).⁴⁷⁷ Es lässt sich außerdem ein mitteleuropäischer Chemotyp, mit hohem Helenaliner-Gehalt von einem spanischen Chemotypen unterscheiden, der reich an Dihydrohelenalinestern ist.^{478,479,480,481,482}

⁴⁷⁵ Kathe 2006

⁴⁷⁶ Hänsel und Sticher 2007

⁴⁷⁷ Europäisches Arzneibuch 2011

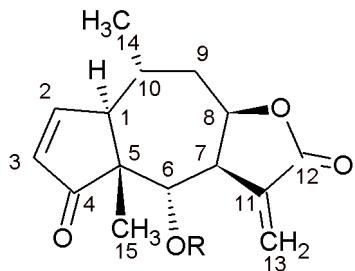
⁴⁷⁸ Willuhn et al. 1983

⁴⁷⁹ Willuhn und Leven 1991

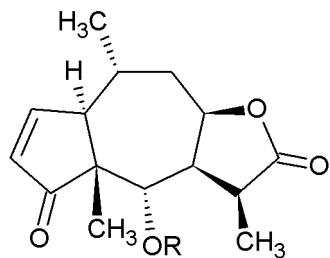
⁴⁸⁰ Willuhn et al. 1994

⁴⁸¹ Willuhn et al. 1995

⁴⁸² Merfort 2007

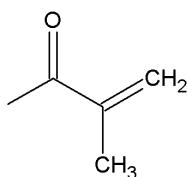
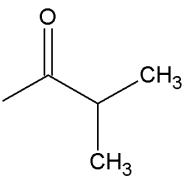
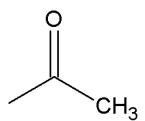


Helenalin (Hel) ($R = H$)

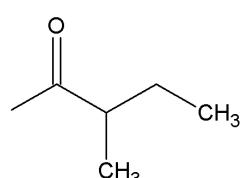
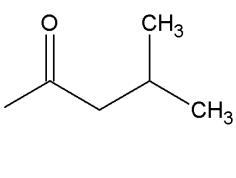
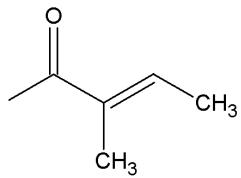


$11\alpha,13$ -Dihydrohelenalin (DHel) ($R = H$)

$R =$



Acetyl- (Ac-Hel/DHel) Isoburyryl- (Ibut-Hel/DHel) Metacryloyl- (Met-Hel/DHel)



Tigloyl- (Tig-Hel/DHel)

Isovaleryl- (I-Hel/DHel)

2-Methylbutyryl- (Metbut-Hel/DHel)

Abbildung 72: Strukturformeln der in Arnika blüten vorkommenden Helenalin- und $11\alpha,13$ -Dihydrohelenalin-Ester.

Das Wirkprinzip der in Arnika vorkommenden Hel- und DHel-Ester wird durch das Vorhandensein von α,β -ungesättigten Carbonylfunktionen (α -Methylen- γ -lacton- und Cyclopentenon-Struktur) erklärt. Diese können auf elektronenreiche, funktionelle Gruppen wie z.B. Sulfhydrylgruppen von Proteinen (Cystein) als Nucleophile wirken und nach dem Mechanismus einer Michael-Addition mit Proteinen, wie z.B. NF- κ B, reagieren, wodurch ihre entzündungshemmende Wirkung erklärt wird.^{483,484} Dabei zeigen die Helenaline *in vivo* als auch *in vitro* stärkere Aktivität (allerdings auch höhere Allergenwirkung und Zytotoxizität), was mit dem Vorhandensein zweier Michael-Systeme erklärt wird. Im Gegenzug zeigen die monofunktionellen DHel-Derivate weniger kontaktallergenes Potential. Neben der Anzahl alkylierender Zentren sind auch andere Faktoren, wie Lipophilie und die Molekülgeometrie

⁴⁸³ Lyss et al. 1997

⁴⁸⁴ Schmidt et al. 1999

aktivitätsbeeinflussend.^{485,486,487} Abgesehen von der prominenten, antiphlogistischen Wirkung der SL vom Helenalidtyp wurden auch andere Wirkungen beobachtet, so z.B. antineoplastische Wirkung durch Zytotoxizität gegen Tumorzellen, antibakterielle Wirkung v.a. gegen grampositive Bakterien, antifungale Wirkung, positiv-inotrope Wirkung auf das Herz, aber auch akute Toxizität und kontaktallergene Wirkung.^{488,489} Neben den Hauptsequiterpenlactonen sind auch noch die beiden Minorverbindungen 6-O-Isobutyryltetrahydrohelenalin und Mexicanin-C-Isovalerat aufgefunden worden.^{490,491}

Weitere Inhaltstoffe sind Flavonoide, die zu etwa 0,4-0,6% in Arnika vorkommen. Darunter Flavon- und Flavonolaglyka, wie die methoxylierten Verbindungen Hispidulin, Pectolinarigenin und 6-Methoxykämpferol. Außerdem Flavon- und Flavonolglykoside, wie z.B. Kämpferol-3-O-glycosid, 6-Methoxykämpferol-3-O-glycosid, Quercetin-3-O-glycosid, Patuletin-3-O-glycosid und Flavonol-3,7-di-O-glycoside, sowie Flavonol-3-O-glucuronide.^{492,493,494} In Arnikablüten findet sich zudem zwischen 0,2 bis 0,35% ätherisches Öl, welches zu etwa 40-50% aus Fettsäuren und zu ca. 9% aus n-Alkanen besteht, außerdem Thymolderivate, Mono- und Sesquiterpene und Polyine.^{495,496} Unter den Phenolcarbonsäuren finden sich beispielsweise 1-O-, 3-O-, 4-O-, und 5-O-Caffeoylchinasäure, 1,5-, 3,4-, 3,5- und 4,5-Di-caffeoylechinasäure und 1,3,5,-Tri-caffeoylechinasäure. Außerdem wurden in Arnikablüten 5-O-Feruloylchinasäure und 1-O-Caffeoyl-5-O-feruloylchinasäure, 1,5-Di-O-caffeoyle-3-O-fumaroylchinasäure, 1,5-Di-O-caffeoyle-4-O-fumaroylchinasäure und methoxylierte Chinasäurederivate nachgewiesen.^{497,498,499,500}

⁴⁸⁵ Willuhn 1998

⁴⁸⁶ Heilmann et al. 2001

⁴⁸⁷ Hänsel und Sticher 2007

⁴⁸⁸ Willuhn 1998

⁴⁸⁹ Merfort 2007

⁴⁹⁰ Willuhn et al. 1984

⁴⁹¹ Kresken und Willuhn 1983

⁴⁹² Ebert et al. 1988

⁴⁹³ Merfort 2007

⁴⁹⁴ Ganzena et al. 2008

⁴⁹⁵ Merfort 2007

⁴⁹⁶ Hänsel und Sticher 2007

⁴⁹⁷ Merfort 1992

⁴⁹⁸ Merfort 2007

⁴⁹⁹ Ganzena et al. 2008

⁵⁰⁰ Jaiswal und Kuhnert 2011

Desweiteren sind die Cumarine Scopoletin und Umbelliferon und geringe Mengen der nicht toxischen Pyrrolizidinalkaloide Tussilaginsäure, Isotussilaginsäure und 2-Pyrrolidinessigsäure in Arnikablüten enthalten.^{501,502,503} Auch die ubiquitär im Pflanzenreich anzutreffenden Carotinoide, Xanthophylle und Polysaccharide kommen in Arnika vor.^{504,505}

⁵⁰¹ Passreiter 1992

⁵⁰² Merfort 2007

⁵⁰³ Hänsel und Sticher 2007

⁵⁰⁴ Hänsel und Sticher 2007

⁵⁰⁵ Merfort 2007

C.1.3 Zielsetzung

Folgende Ziele wurden im zweiten Teil der vorliegenden Arbeit verfolgt:

- Es sollte das Sesquiterpenlactonspektrum von Arnika in Maramureş (Rumänien) untersucht werden.
- Durch Regressionsanalysen wurde versucht Zusammenhänge von Umweltparametern (Standortfaktoren und Höhenlage) und der SL-Zusammensetzung einzelner Individuen von *Arnica montana* in Maramureş (Rumänien) zu finden.
- Außerdem sollte durch Stressexperimente mit Arnikaklonen eine potentielle Beeinflussbarkeit des SL-Spektrums experimentell untersucht werden.

C.2 Material und Methoden

C.2.1 Chemoökologische Untersuchungen von *Arnica montana* L. in Rumänien

Im Sommer 2010 wurden im Verwaltungsbezirk Maramureş (Rumänien) Proben von Arnikablüten an verschiedenen Standorten gesammelt und der Gehalt der SL von Einzelblüten ermittelt. Außerdem wurden vor Ort Umweltparameter bestimmt, die zu Regressionsanalysen mit den Inhaltstoffmustern der Einzelproben verwendet wurden.

C.2.1.1 Untersuchungsgebiet und Standorte der Probenentnahme

Die beiden Untersuchungsgebiete „Repedea“ und „Bobeica“ befinden sich im Bezirk Maramureş im Norden von Rumänien an der ukrainischen Grenze auf dem Gebiet des Naturparks Parcul Natural Munţii Maramureşului (Abbildung 73). Das Gebiet wird von den Waldkarpaten durchzogen und ist stark ländlich geprägt. Kleine Bauernhöfe, die zum Teil weit zerstreut und von Wiesen und kleinen Gemüsefeldern umgeben auf Waldlichtungen liegen, prägen die Kulturlandschaft dieser Gebirgsregion. In den mittleren Bergregionen finden sich naturnah belassene und zum Teil natürliche Mischwälder, in den oberen Regionen Schafweiden, Bergwiesen und Almen. Die nährstoffarmen Wiesen der mittleren Bergregion sind anthropogenen Ursprungs und bedingt durch die extensive Bewirtschaftung (Mahd bzw. Weide) sehr artenreich.^{506,507} Sie sind wichtiger Bestandteil der Kulturlandschaft von Maramureş. *Arnica montana* L. ist als konkurrenzschwache Pflanze vornehmlich auf solche Flächen angewiesen und somit durch deren Verlust akut bedroht. Düngung, wie sie auf ertragsoptimierten Futtergraswiesen üblich ist, lässt Arnika innerhalb kurzer Zeit verschwinden.^{508,509} Auch Verbuschung und Wiederbewaldung als Folge der Nichtbewirtschaftung der Wiesen führen durch den hohen Konkurrenzdruck zum Verschwinden von Arten wie Arnika. Große Teile der Waldkarpaten in Maramureş stehen seit 2004 unter dem Schutz des Naturparks Parcul Natural Munţii Maramureşului mit Verwaltungssitz in Vişeu de sus (vgl. Abbildung 73). Der mit 133.354 ha größte Naturpark seiner Art in Rumänien befindet sich zwischen 24°30'00“ E und 47°48'00“ N. Das Klima ist moderat-kontinental mit einer jährlichen Durchschnittstemperatur in den Niederungen von

⁵⁰⁶ Marian und Săduan 2003

⁵⁰⁷ Coldea et al. 2009

⁵⁰⁸ Knapp 1953

⁵⁰⁹ Ellenberg 1979

4-6 °C und 2-4 °C in den Berglagen. Die Niederschlagsmengen reichen von 900-1000 mm im östlichen und 1200-1400 mm im westlichen Teil.⁵¹⁰ Die Geologie des Gebiets ist äußerst komplex. Das anstehende Gestein besteht im Allgemeinen aus Gneisen, Schiefer und Glimmerschiefer, ist also generell eher sauer.⁵¹¹ In der vulkanisch aktiven Region finden sich außerdem vielerorts Mineralquellen und die reichen Erzvorkommen wurden bis vor wenige Jahre in zahlreichen Minen ausgebeutet. Das Gebiet ist nicht nur naturräumlich sondern auch kulturell äußerst vielfältig. So siedelten im Gebiet über Jahrhunderte hinweg Rumänen, Ungarn, Deutsche (Zipser) und Roma nebeneinander und entwickelten u.a. eine einzigartige Holzkirchenarchitektur (UNESCO-Welterbe). Heute ist die Region sehr arm und leidet unter hoher Arbeitslosigkeit und Abwanderung v.a. junger Menschen. Dadurch sind die dort immer noch lebendigen Traditionen und damit auch das davon abhängige Kulturland vom Verschwinden bedroht (mündliche Mitteilung Gabriel Covaza, Catalina Bogdan).

Standorte der Probenentnahme

Für die Inhaltstoffanalyse wurden in 2 Gebieten (Repedea und Bobeica) insgesamt 79 (verwertbare) Blütenproben von einzelnen Arnikapflanzen gesammelt. Abbildung 73 zeigt eine Übersichtskarte des Naturparks. Die beiden besammelten Gebiete sind markiert.

⁵¹⁰ Năstase et al.

⁵¹¹ Mureşan 2009

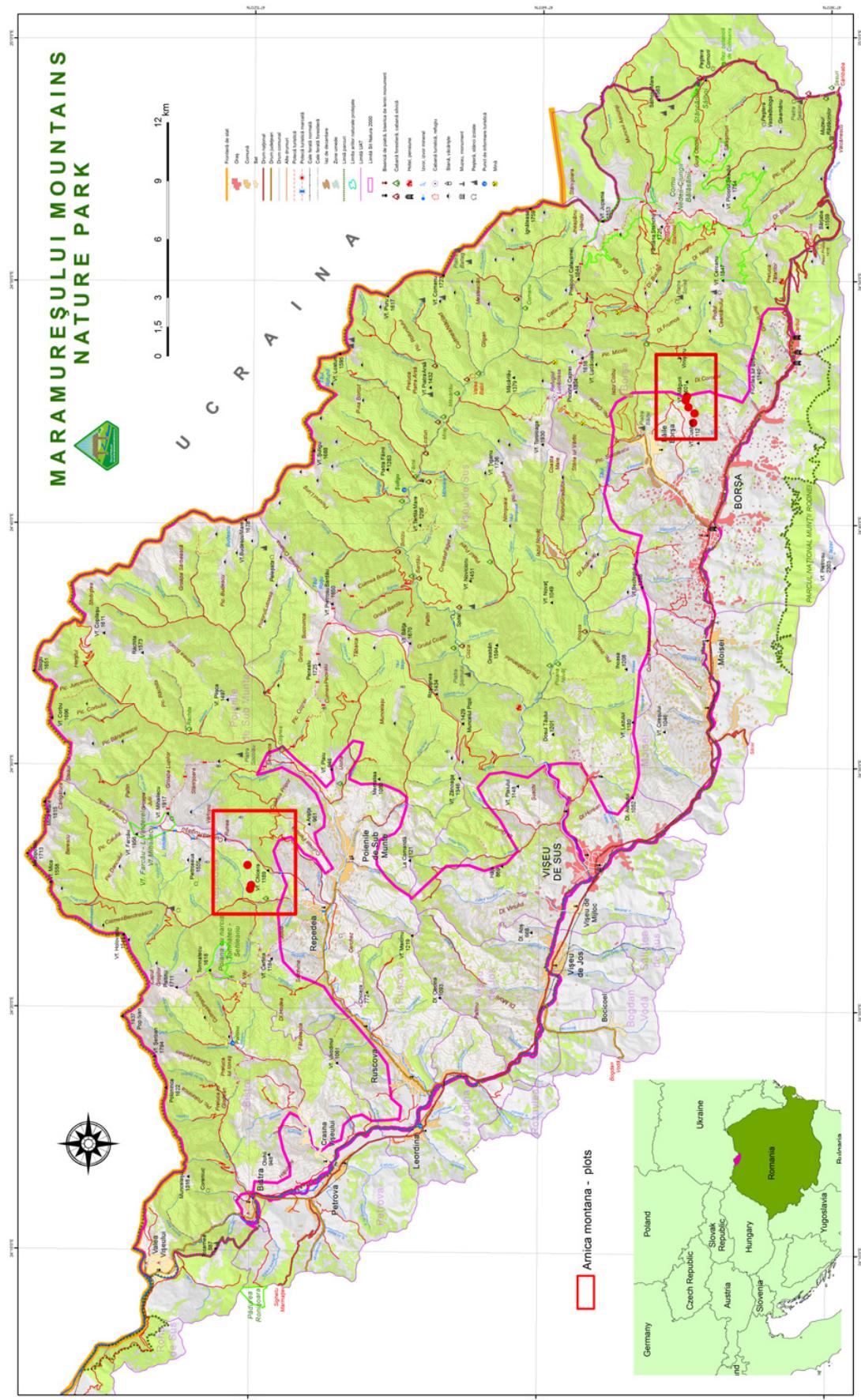


Abbildung 73: Übersichtskarte des Naturparks Parcul Natural Munții Maramureșului. Die besammelten Gebiete Repedea (Nord-Westen) und Bobeica (Süd-Osten) sind rot umrahmt. Die Standorte sind mit roten Punkten markiert. (Karte erstellt und dankenswerter Weise zur Verfügung gestellt von Christina Pop).

Tabelle 23 gibt eine Übersicht der Standorte und der gesammelten Proben.

Tabelle 23: Übersicht der Einzelproben und der gesammelten Standorte in Maramureş.

Gebiet	Standort (m ü. NHN)	Plot (GPS-Koordinaten)	Individuen	
Repedea (Re)	Re1 (780 m)	Re11 (N 47°52'04.6" E 024°24'53.8")	Re111, Re112, Re113	
		Re12 (N 47°52'05.0" E 024°24'54.2")	Re121, Re122, Re123	
		Re13 (N 47°52'05.7" E 024°24'54.6")	Re131, Re132, Re133	
		Re14 (N 47°52'05.3" E 024°24'54.5")	Re141, Re142	
	Re2 (862 m)	Re21 (N 47°52'02.8" E 024°25'03.3")	Re211, Re212, Re213, Re214	
		Re22 (N 47°52'03.0" E 024°25'03.6")	Re221, Re222, Re223	
		Re23 (N 47°52'03.0" E 024°25'02.6")	Re232, Re233, Re234	
	Re3 (1037 m)	Re31 (N 47°52'08.9" E 024°25'52.8")	Re311, Re312, Re313, Re314	
		Re32 (N 47°52'10.0" E 024°25'51.9")	Re321, Re322, Re323	
		Re33 (N 47°52'07.9" E 024°25'55.0")	Re331, Re333, Re334	
Summe Re:			31	
Bobeica (Bo)	Bo1 (1116 m)	Bo11 (N 47°39'50.2" E 024°44'11.7")	Bo111, Bo112, Bo113	
		Bo12 (N 47°39'50.3" E 024°44'11.8")	Bo121, Bo122, Bo123	
		Bo13 (N 47°39'50.0" E 024°44'12.6")	Bo131, Bo132, Bo133	
	Bo2 (1213 m)	Bo21 (N 47°39'47.9" E 024°44'34.8")	Bo211, Bo212, Bo214, Bo215	
		Bo22 (N 47°39'48.0" E 024°44'36.5")	Bo222, Bo223, Bo225	
	Bo3 (1327 m)	Bo31 (N 47°39'58.2" E 024°44'50.1")	Bo311, Bo312, Bo313, Bo314, Bo315	
		Bo32 (N 47°39'58.3" E 024°44'50.2")	Bo321, Bo322, Bo323, Bo324, Bo325	
		Bo33 (N 47°39'58.4" E 024°44'50.0")	Bo331, Bo332, Bo333, Bo334	
	Bo4 (1435 m)	Bo41 (N 47°40'02.9" E 024°45'07.1")	Bo411, Bo412, Bo413, Bo414, Bo415	
		Bo42 (N 47°40'02.8" E 024°45'06.6")	Bo421, Bo422, Bo423, Bo424, Bo425	
	Bo5 (1466 m)	Bo51 (N 47°40'00.8" E 024°45'16.4")	Bo511, Bo512, Bo513, Bo514, Bo515	
		Bo52 (N 47°40'00.4" E 024°45'16.6")	Bo522, Bo523, Bo524	
Summe Bo:			48	
Summe Re + Bo:			79	

C.2.1.2 Ermittlung der Standortfaktoren

An jedem Standort wurden die Höhe in Meter über Normalhöhennull (m ü. NHN) und die GPS-Koordinaten mit einem GPS-Empfänger ermittelt (Tabelle 23). Je Standort wurden zwischen 2 und 4 Plots (2x2 m) abgesteckt. Innerhalb der Plots wurden zwischen 2 und 5 Arnikapflanzen beprobt (Entnahme von 1-3 Blütenköpfchen). Um die Plots näher zu charakterisieren, wurden die Standortfaktoren mittels Vegetationsaufnahmen und der Zeigerwerte nach Ellenberg bestimmt. Für die Vegetationsaufnahmen wurden alle auf dem Plot vorhandenen höheren Pflanzenarten bestimmt (nach Senghas & Seybold (2003) und

mündliche Mitteilung Parkranger) und deren Deckungsgrad, abgewandelt nach der Methode von BRAUN-BLANQUET (in: Dierschke, 1994), durch Schätzung der Abundanz einer Art auf dem Plot bestimmt.^{512,513} Daraus wurden mit Hilfe der für jede Art tabellierten Zeigerwerte nach Ellenberg (1986) für jeden Plot eine Standortanalyse bezüglich der Umweltfaktoren Lichtzahl (L), Temperaturzahl (T), Kontinentalitätszahl (K), Feuchtezahl (F), Reaktionszahl (R), und Stickstoffzahl (N) durchgeführt.⁵¹⁴ Hierzu wurde zuerst der nach BRAUN-BLANQUET ermittelte Prozentsatz der Deckung einer Art mit dem jeweiligen Zeigerwert der Art multipliziert (gewichtet). Die Summen der Produkte aus Deckung und Zeigerwert jeder auf dem Plot vorhandenen Art wurde nun durch die Summe der Prozente der Deckung dieser Arten dividiert. Das Ergebnis dieser Operation stellt den jeweiligen Standortfaktor des Plots dar. Dieser wurden danach für eine Regressionsanalyse mit den ermittelten Inhaltstoffspektren verwendet. Tabelle 24 zeigt die der Skala nach BRAUN-BLANQUET zugeordneten Prozentzahlen.

Tabelle 24: Die zur Ermittlung der Standortfaktoren benutzte Braun-Blanquet Skala und die zugehörigen Prozentsätze der Abundanz.

Skala	Abundanz [%]
5	87,5
4	62,5
3	37,5
2	15
1	3,5
+	2
r	1

C.2.1.3 Sammlung der Proben

Im Juni 2010 wurden auf 22 Plots von insgesamt 79 Arnikaindividuen zwischen 1-3 Blütenköpfchen gesammelt. Es wurden nur Blütenköpfchen gleichen Reifegrades gesammelt, sobald die äußersten 2 Reihen von Röhrenblüten geöffnet waren. Die Köpfchen ein und derselben Pflanzen wurden vereinigt und in Papiertüten in Styroporboxen über Orangegele (Merck) getrocknet. Die Lagerung bis zur Extraktion erfolgte bei 4 °C über Orangegele. Außerdem wurden an den Standorten Fotoaufnahmen einiger Arnikapflanzen gemacht, um deren phänotypische Variation zu dokumentieren.

⁵¹² Senghas und Seybold 2003

⁵¹³ Dierschke 1994

⁵¹⁴ Ellenberg 1986

C.2.2 Stressexperimente mit Arnika-Klonen

Um den Einfluss von Umweltfaktoren auf die Zusammensetzung und den Gehalt an SL in *Arnica montana* L. näher zu untersuchen, wurden Stressversuche an Arnikaklonen durchgeführt, die freundlicherweise von der Bayerischen Landesanstalt für Landwirtschaft (LfL) in Freising zur Verfügung gestellt wurden. Es wurden 3 verschiedene, *in vitro* vermehrte Klonen spanischer Herkunft mit den Bezeichnungen 504-54, 519-08 und 519-15 verwendet (gekreuzt von Herrn Prof. Dr. Ulrich Bomme, nicht näher charakterisiert). Die Pflanzen wurden im Gewächshaus unter gleichen Bedingungen in Töpfen, befüllt mit Einheitssubstrat, mit freundlicher Genehmigung und unter der Aufsicht von Dr. Fred Eickmeyer kultiviert. Die Pflanzen je eines Klons wurden in Gruppen aufgeteilt und, außer der Kontrollgruppe (K), verschiedenen Stressfaktoren ausgesetzt. Eine Gruppe (S) wurde dem Fraßdruck von 3-4 Nacktschnecken (*Arion rufus*) einer Größe zwischen 2-4 cm ausgesetzt, welche durch Überstülpen von durchlöcherten Folien über die gesamte Pflanze an der Flucht gehindert wurden und somit zum Fraß an den Arnikapflanzen gezwungen waren (Abbildung 74).



Abbildung 74: Auslösen von Fraßstress bei Arnika-Klonen durch Schnecken (*Arion rufus*). Die Schnecken wurden durch Folie am Entkommen gehindert (a). Deutliche Fraßschäden an Blüten (b) und Blättern (c).

Die nächste Gruppe (P) von Pflanzen wurde mit Hilfe einer Stahlpinzette an je 10 Bättern etwa 10-mal durch Perforation verletzt (Abbildung 75).

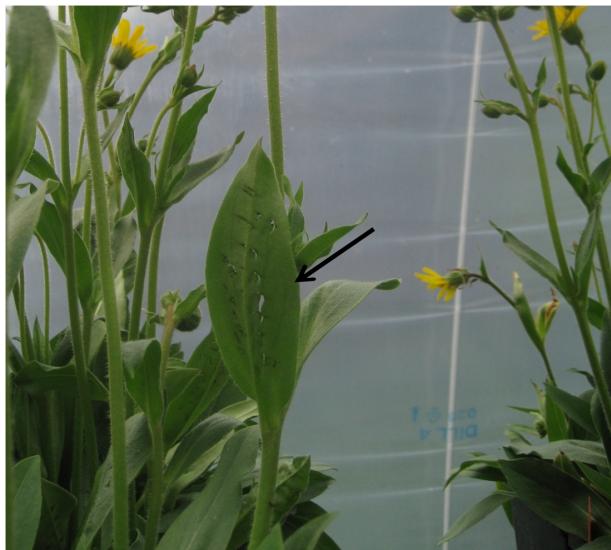


Abbildung 75: Verletzung der Blätter durch Perforation mittels Pinzette.

Die letzte Gruppe (A) wurde zweimal im Abstand von 4 Tagen mit einer Abscisinsäure-Lösung (ABA, 10 µM, 1% EtOH in dest. Wasser) bis zur vollständigen Benetzung besprüht.⁵¹⁵ Die Wirkdauer zwischen der Behandlung und der Ernte der Blüten bzw. der Blätter betrug, je nach Reifegrad der Blütenköpfchen, zwischen 7 und 10 Tage. Die Blütenköpfchen wurden geerntet, sobald die äußersten 2 Reihen von Röhrenblüten geöffnet waren. Die Blattproben wurden zeitgleich mit den Blütenköpfchen geerntet. Die weitere Behandlung der Proben (Trocknung, Lagerung) erfolgte wie unter C.2.1.3 für die rumänischen Proben beschrieben. Tabelle 25 zeigt eine Übersicht der für das Experiment gebildeten Gruppen.

Tabelle 25: Übersicht der aus den Arnikaklonen gebildeten Gruppen.

Behandlung	Klon 504-54 (n = 13)	Klon 519-08 (n = 8)	Klon 519-15 (n = 12)
K (Kontrolle)	n = 3	n = 4	n = 3
S (Schneckenfraß)	n = 3	n = 4	n = 3
P (Verletzung)	n = 3		n = 3
A (ABA-Behandlung)	n = 4		n = 3

⁵¹⁵ Jing et al. 2009

C.2.3 Analytik der Helenaline

Die Analytik der Helenaline und Dihydrohelenaline der gesammelten Arnikablütenköpfchen erfolgte abgewandelt nach der Methode von Willuhn & Leven (1991) und wurde sowohl auf die Proben aus Rumänien, als auch für die Blatt- und Blütenköpfchenproben der Arnikaklone angewendet.⁵¹⁶

C.2.3.1 Probenaufbereitung

Die getrockneten, ganzen Blütenköpfchen (bzw. Blattproben bei Klonen) wurden in einem Keramikmörser mit flüssigem Stickstoff komplett bedeckt und mit dem Pistill zu Pulver zermahlen. Dieses wurde in ein Probenglas überführt und sofort verschlossen, um Kondenswasserbildung zu vermeiden. Nach Erwärmung auf RT wurden die Gläser geöffnet und im Exsikkator über Orangegel mindestens 24 h bei 4 °C getrocknet.

C.2.3.2 Extraktions- und Anreicherungsverfahren

Zur Extraktion der Sesquiterpenlactone wurden je 0,25 g (genaue Einwage auf 5 Nachkommastellen) der aufbereiteten Proben in einen 100 ml Rundkolben eingewogen und unter Rühren für 30 min mit 15 ml 50% MeOH in Wasser bei 57 °C unter Rückfluss im Wasserbad erhitzt. Der Extrakt wurde filtriert und mehrfach mit 50% MeOH gewaschen. Die Extraktion wurde mit dem Rückstand einmal wiederholt. Die beiden Extrakte wurden vereinigt und mit 375 µl einer methanolischen Santoninlösung ((-)- α -Santonin, 99% rein, Sigma-Aldrich) als internen Standard versetzt (0,1 %, 100 mg in 100 ml MeOH, entspricht: 0,375 mg Santonin je Probe). Der mit Santonin versetzte Extrakt wurde anschließend am Rotationsverdampfer bei 40 °C auf 50% des Ausgangsvolumens eingeengt und der verbliebene, wässrige Extrakt im Scheidetrichter dreimal mit je 30 ml EtOAc ausgeschüttelt. Die vereinigten EtOAc-Phasen wurden über wasserfreiem Na₂SO₄ getrocknet und anschließend filtriert. Nach Abdestillieren des EtOAc am Rotationsverdampfer wurde der Rückstand zweimal mit 7 ml DCM ausgezogen (1 min Ultraschallbad), die DCM-Lösung filtriert und der Filterrückstand mit wenig DCM gewaschen. Der Rückstand wurde verworfen, das Filtrat wurde nach Abdestillieren des Lösungsmittels in 4 ml 50% MeOH gelöst, in ein 15 ml Zentrifugenröhrchen (Cellstar Tubes, Greiner) überführt und zur Flavonoidfällung mit

⁵¹⁶ Willuhn und Leven 1991

1,75 g Aluminiumoxid 60 aktiv (basisch, Korngröße: 0,063-0,200 mm, Merck) versetzt. Nach 1 min kräftigem Schütteln wurde 4 min bei 4000 U/min zentrifugiert. Der Überstand wurde abdekantiert und bis zur Trockene am Rotationsverdampfer eingeengt. Zur GC-Analyse wurde der erhaltene Rückstand in 250 µl MeOH gelöst.

C.2.3.3 Gaschromatographische-Analyse (GC-Analyse)

Zur qualitativen und quantitativen GC-Analyse der Einzelproben wurde ein Gaschromatograph mit FID-Detektor (Flammenionisationsdetektor) (Varian 3900, Säule: 30 m VF-1MS-0.25, film thickness 0.25 µm, He als Trägergas) mit folgenden Parametern verwendet: Injektionsvolumen 1,0 µl, Splittverhältnis: 1:50, Injektortemperatur: 300 °C, Detektor-Temperatur: 300 °C. Zur besseren Auflösung der Peaks wurde jede Probe mit 3 verschiedenen Einstellungen (1-3) vermessen (Tabelle 26).

Tabelle 26: GC-Einstellungen für die qualitative und quantitative GC-Analyse der Arnikaproben.

GC-Einstellung	Ofentemperatur [°C]	Flow des Trägergases He [ml/min]
1	212 (isotherm)	2,5
2	210 (isotherm)	1,2
3	205 (isotherm)	2,7

Zur Peakidentifikation wurde mit einer Probe eine GC-MS-Analyse (niedrigauflösend, EI-MS, CI-MS, Finnigan MAT SSQ 710 A) mit den gleichen GC-Parametern wie oben beschrieben in der zentralen Analytik der Universität Regensburg durchgeführt. Die einzelnen Peaks des Chromatogramms wurden durch den Vergleich der Molekülpeaks bzw. der Basispeaks der MS-Analyse und der Retentionszeiten mit Literaturwerten identifiziert.^{517,518}

C.2.3.4 Auswertung

Die Chromatogramme wurden mit dem Programm Varian Galaxie Chromatography Workstation Version 1.8.508.1 bearbeitet. Nach Identifizierung der Peaks von Santonin und der 14 Helenain- und Dihydrohelenalinester wurden deren Peakflächen durch Integration bestimmt. Mit Hilfe folgender Formel wurden die Konzentrationen der Sesquiterpenlactone berechnet:⁵¹⁹

⁵¹⁷ Willuhn et al. 1983

⁵¹⁸ Perry et al. 2009

⁵¹⁹ Willuhn und Leven 1991

$$C_{(SL)} = F_{(SL)} \times C_{(S)} / F_{(S)} \times K_F$$

mit:

$C_{(SL)}$ = Konzentration des Sesquiterpenlactons in der Probe [mg]

$F_{(SL)}$ = Peakfläche des Sesquiterpenlactons

$C_{(S)}$ = Konzentration von Santonin (Interner Standard) in der Probe (hier 0,375 mg)

K_F = Substanzspezifischer Korrekturfaktor bezogen auf Santonin $K_F = 1$

(siehe Tabelle 27)

Tabelle 27: Zur Berechnung der Sesquiterpenlacton-Konzentrationen verwendete Korrekturfaktoren K_F (experimentell ermittelt nach Willuhn & Leven (1991))⁵²⁰

Verbindung	K_F	Verbindung	K_F
Hel	1,03	DHel	1,11
Ac-Hel	1,03	Ac-DHel	1,14
Ibut-Hel	0,96	Ibut-DHel	1,04
Met-Hel	1,03	Met-DHel	0,96
Tig-Hel	1,35	Tig-DHel	1,24
I-Hel	0,93	I-DHel	1,06
Metbut-Hel	0,93	Metbut-DHel	1,06

Der Gehalt der Sesquiterpenlactone in jeder Probe wurde auf mg/g rückgerechnet. Für jede Einzelprobe wurde auf diese Weise für jeden der 14 Ester ein Gehalt in mg/g Trockengewicht Droege ermittelt. Außerdem wurden jeweils die Summen von Helenalinestern (Hel) und Dihydrohelenalinestern (DHel) und deren Verhältnis zueinander (Hel/DHel) berechnet.

C.2.4 Statistik

Alle Berechnungen wurden mit Hilfe von Excel (2007, Microsoft) angestellt. Der Variationskoeffizient cv berechnete sich durch Division der Standardabweichung durch den Absolutbetrag des arithmetischen Mittels multipliziert mit 100. Zur statistischen Auswertung wurden mit dem Programm SPSS (SPSS Statistics 19, IBM) lineare Regressionsanalysen, Korrelationsanalysen und Mittelwertvergleiche mittels ANOVA durchgeführt.

⁵²⁰ Willuhn und Leven 1991

C.3 Ergebnisse

C.3.1 Untersuchungen zu *Arnica montana* L. in Rumänien

C.3.1.1 Ergebnisse der Vegetationsaufnahmen

Es werden hier nicht die Ergebnisse der Vegetationsaufnahmen jeder beprobten Fläche gezeigt, sondern lediglich die daraus über die Zeigerwerte berechneten Standortfaktoren (Tabelle 28). Bei den Zeigerwerten nach Ellenberg handelt es sich um ein Klassifikationsverfahren für mitteleuropäische Pflanzen nach ihren ökologischen Eigenschaften. Die Werte spiegeln die Standortansprüche einzelner Pflanzen wider. Die durch die Wichtung mit der Deckung der jeweiligen Pflanzenart ermittelten Standortfaktoren liefern ein gutes Bild der pro Plot vorherrschenden Standortbedingungen. Die Lichtzahl L der beprobten Plots zeigte Werte zwischen 6,3 und 8,9. Der Großteil der Plots wies daher Halblicht- bis Volllichtbedingungen auf. Die Temperaturzahl T der Plots bewegte sich zwischen den Werten 3,9 und 5,5 und zeigt damit eher kühle Umweltbedinungen an. Die Kontinentalitätszahl K zeigte Werte zwischen 3,2 und 4,5. Damit können die Plots als subozeanisch eingestuft werden. Die Feuchtezahl F der Plots bewegte sich im Bereich von 4,1 und 5,0. Die Böden der Plots sind damit als trocken bis frisch einzustufen. Die Werte der Reaktionszahl R der beprobten Plots bewegte sich zwischen 2,3 und 3,4, was die Böden der Plots als sauer bis stark sauer kennzeichnet. Die Stickstoffzahl N der Plots zeigte Werte zwischen 2,0 und 2,8, was kennzeichnend für stickstoffarme Böden ist. Die Plots sind also zusammenfassend gekennzeichnet durch stickstoffsalzarme, saure und eher trockene Böden mit mäßig feuchtem (subozeanisch) und eher kühllem Klima und relativ hoher Lichteinstrahlung. Diese Beobachtungen sind mit den ökologischen Ansprüchen von Arnika gut vereinbar. Die einzelnen Plots waren sich in ihren Standortfaktoren sehr ähnlich. Lediglich bei der Licht-Zahl zeigten sich größere Unterschiede.

Tabelle 28: Die über Vegetationsaufnahmen und Zeigerwerte ermittelten Standortfaktoren der beprobenen Plots in Maramureş. Licht-Zahl (L, Skala 1-9), Temperatur-Zahl (T, Skala 1-9), Kontinentalitäts-Zahl (K, Skala 1-9), Feuchte-Zahl (F, Skala 1-12), Reaktions-Zahl (R, Skala 1-9) und Stickstoff-Zahl (N, Skala 1-9).

Plot	L	T	K	F	R	N
Re11	6,3	3,9	4,5	4,8	2,3	2,6
Re12	7,6	4,1	4,1	4,9	3,1	2,2
Re13	7,5	4,1	3,5	4,8	2,3	2,1
Re14	7,7	4,0	3,7	5,0	2,6	2,3
Re21	8,9	4,0	4,0	5,0	3,1	2,0
Re22	6,5	4,1	4,4	4,9	2,8	2,8
Re23	8,0	4,0	4,1	5,0	2,8	2,2
Re31	8,6	4,0	3,9	5,0	3,0	2,1
Re32	7,6	4,3	3,5	4,6	2,8	2,2
Re33	8,3	4,0	3,5	5,0	2,5	2,0
Bo11	8,0	4,9	3,7	4,1	3,2	2,1
Bo12	7,5	5,5	3,3	4,1	3,4	2,5
Bo13	7,5	4,7	3,2	4,8	2,4	2,1
Bo21	7,5	4,0	3,7	4,9	2,6	2,2
Bo22	6,1	3,9	4,4	5,0	2,5	2,7
Bo31	7,5	3,9	4,2	5,0	2,7	2,3
Bo32	7,7	3,9	3,7	5,0	2,5	2,2
Bo33	7,1	4,0	3,1	5,0	2,1	2,1
Bo41	6,8	4,1	4,0	5,0	2,2	2,5
Bo42	7,8	4,0	3,7	5,0	2,5	2,3
Bo51	5,9	4,3	4,4	5,0	2,1	2,8
Bo52	8,0	4,1	3,2	4,9	2,2	2,1

Ein zusätzliches Ergebnis der Vegetationsaufnahmen war eine Liste der auf den Plots vorkommenden höheren Pflanzenarten. Folgende Arten wurden auf den untersuchten Arnikawiesen bestimmt (Tabelle 29).

Tabelle 29: Liste der im Juni/Juli 2010 auf den Arnikawiesen in Maramureş gefundenen Arten.

<i>Achillea distans</i>	<i>Deschampsia flexuosa</i>	<i>Juniperus communis</i>	<i>Polygala comosa</i>
<i>Achillea millefolium</i>	<i>Dianthus barbatus</i>	<i>Knautia arvensis</i>	<i>Polytrichum formosum</i>
<i>Agrostis canina</i>	<i>Euphrasia rostkoviana</i>	<i>Laserpitium krapfii</i>	<i>Potentilla erecta</i>
<i>Alchemilla vulgaris</i>	<i>Festuca ovina</i>	<i>Leucanthemum vulgare</i>	<i>Prunella vulgaris</i>
<i>Anthoxanthum odoratum</i>	<i>Festuca rubra</i>	<i>Luzula luzuloides</i>	<i>Ranunculus nemorosus</i>
<i>Arnica montana</i>	<i>Galeopsis pubescens</i>	<i>Lycopodium clavatum</i>	<i>Rhinanthus minor</i>
<i>Briza media</i>	<i>Galium verum</i>	<i>Melampyrum saxosum</i>	<i>Rhinanthus angustifolius</i>
<i>Calycocorsus stipitatus</i>	<i>Gentiana asclepiadea</i>	<i>Mycelis muralis</i>	<i>Salvia verticillata</i>
<i>Campanula patula</i>	<i>Gymnadenia conopsea</i>	<i>Nardus stricta</i>	<i>Scorzonera rosea</i>
<i>Carduus nutans</i>	<i>Hieracium aurantiacum</i>	<i>Phyteuma spicatum</i>	<i>Silene vulgaris</i>
<i>Carex pallescens</i>	<i>Hieracium pilosella</i>	<i>Plantago lanceolata</i>	<i>Sphagnum spec.</i>
<i>Carlina acaulis</i>	<i>Hypericum maculatum</i>	<i>Platanthera bifolia</i>	<i>Vaccinium myrtillus</i>
<i>Dactylorhiza maculata</i>	<i>Hypochaeris uniflora</i>	<i>Poa chaixii</i>	

C.3.1.2 Analytik der Helenalin- und Dihydrohelenalinester

Wie unter C.2.3.3 beschrieben wurden 3 verschiedene GC-Einstellungen zur vollständigen Auftrennung und Quantifizierung aller SL-Ester der Arnikaproben benötigt. Der interne Standard Santonin erschien bei allen Einstellungn als erstes im Chromatogramm (Retentionszeit: 5,90 min (1), 9,30 min (2) und 6,52 min (3)) und nachfolgend die Peaks der SL-Ester. Tabelle 30 zeigt die durch die gaschromatographische Analyse der 14 Helenalin- und Dihydrohelenalinester ermittelten Retentionszeiten exemplarisch an einer Probe aus Rumänien.

Tabelle 30: Die für die 14 Helenalin- und Dihydrohelenalinester ermittelten Retentionszeiten der gaschromatographischen Analyse einer Probe.

Bezeichnung im Beispielchromatogramm (Abbildung 76)	Verbindung	Retentionszeit [min] (Einstellung Tabelle 26)
S	α-Santonin (interner Standard)	5,90 (1), 9,30 (2), 6,52 (3)
1	DHel	6,46 (1)
2	Hel	6,59 (1)
3	Ac-Hel	7,36 (1)
4	Ac-DHel	7,89 (1)
5	Ibut-Hel	10,10 (1)
6	Ibut-DHel	11,89 (3)
7	Met-Hel	11,45 (1)
8	Met-DHel	11,72 (1)
9	Metbut-Hel	12,73(1)
10	Metbut-DHel	20,75 (2)
11	I-Hel	20,90 (2)
12	I-DHel	13,32 (1)
13	Tig-Hel	17,91 (1)
14	Tig-DHel	18,17 (1)

Abbildung 76 zeigt 3 exemplarische Chromatogramme der 3 verschiedenen Geräteeinstellungen (vgl. auch Tabelle 26).

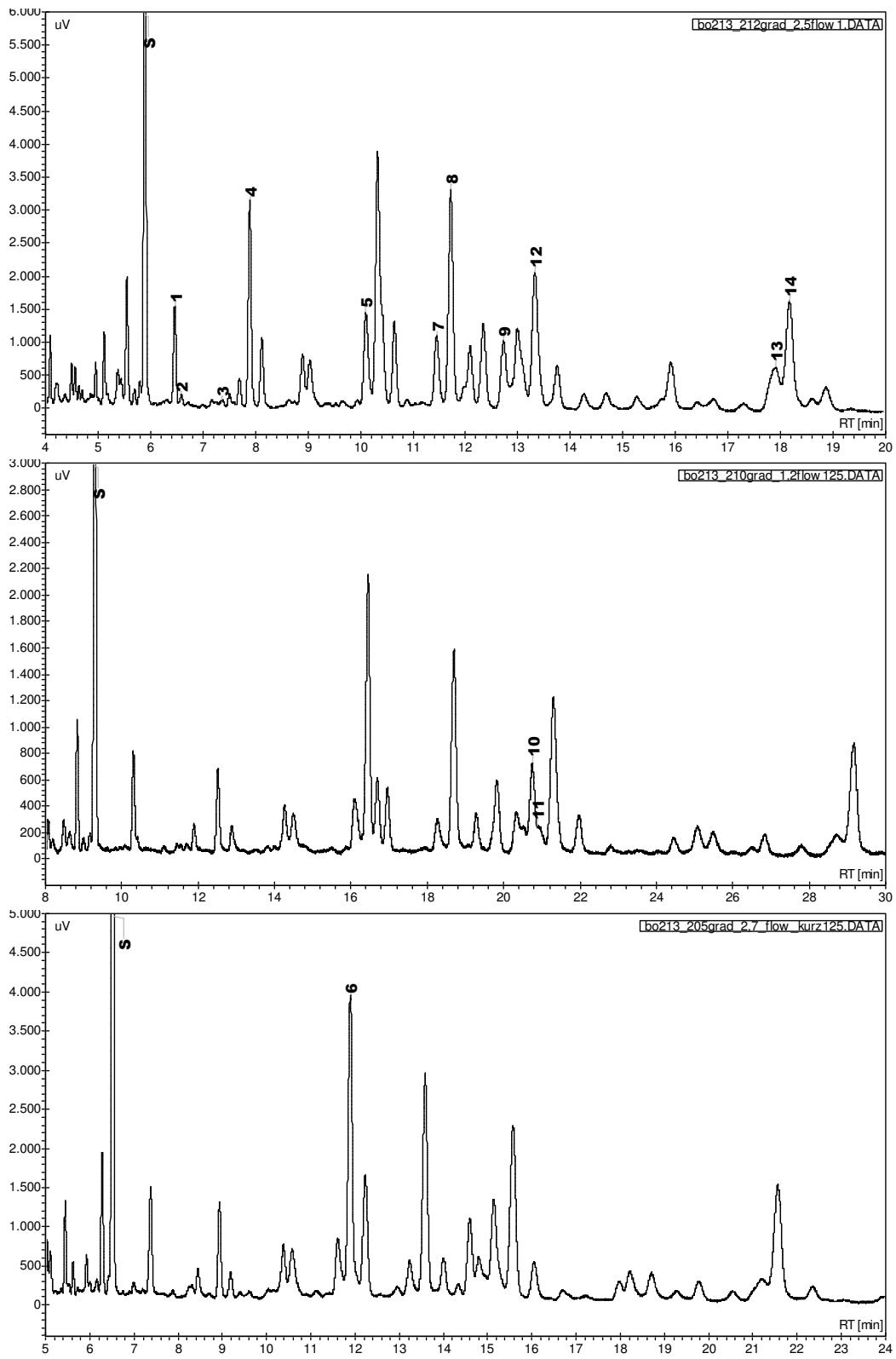


Abbildung 76: Exemplarische GC-Chromatogramme bei unterschiedlichen Geräteeinstellungen. Oben: 212 °C und 2,5 ml/min flow; Mitte: 210 °C, 1,2 ml/min flow; Unten: 205 °C, 2,7 ml/min flow. Zuordnung der Nummern siehe Tabelle 30.

C.3.1.3 GC-Analyse der rumänischen Proben

Im Folgenden werden die Ergebnisse der Quantifizierung der Helenalin- und Dihydrohelenalinester der rumänischen Arnikaproben dargestellt.

C.3.1.3.1 Chemotyp und chemische Variation

Der Chemotyp bei Arnika ist bestimmt durch das Verhältnis der Summen der Helenalin-Ester und der Dihydrohelenalin-Ester. Hel reiche Chemotypen zeichnen sich durch Werte über 1 aus, während DHel reiche Chemotypen Werte unter 1 aufweisen. Unter chemischer Variation wird hier die Variationsbreite der Gehalte einzelner Individuen verstanden, ausgedrückt durch den Variationskoeffizienten. Tabelle 31 zeigt die gemessenen Mittelwerte und die Variationskoeffizienten des Gehalts an Hel- und DHel-Ester aller rumänischen Proben ($n = 79$).

Tabelle 31: Mittelwerte und Variationskoeffizienten der Gehalte der Hel- und DHel-Ester aller rumänischen Proben ($n = 79$).

Verbindung:	Mittelwert ± Stabw	Variationskoeffizient [%]
DHel	0,09 ± 0,09 mg/g	97,35
Hel	0,02 ± 0,01 mg/g	44,53
Ac-Hel	0,01 ± 0,01 mg/g	72,11
Ac-DHel	0,11 ± 0,05 mg/g	48,46
Ibut-Hel	0,51 ± 0,25 mg/g	48,28
Ibut-DHel	0,24 ± 0,12 mg/g	51,22
Meta-Hel	0,22 ± 0,14 mg/g	64,14
Meta-DHel	0,13 ± 0,07 mg/g	57,45
Metbut-Hel	0,58 ± 0,29 mg/g	51,08
Metbut-DHel	0,15 ± 0,08 mg/g	53,54
I-Hel	0,15 ± 0,07 mg/g	43,88
I-DHel	0,21 ± 0,07 mg/g	34,24
T-Hel	0,23 ± 0,13 mg/g	57,63
T-DHel	0,17 ± 0,08 mg/g	49,29
Summe-Hel	1,73 ± 0,67 mg/g	38,61
Summe-DHel	1,09 ± 0,36 mg/g	32,61
Summe-Hel/Summe-DHel	1,66 ± 0,66	39,78
SL-Gesamtgehalt	2,82 ± 0,87 mg/g Max.: 4,98 Min.: 0,85	30,83

Die SL-Ester mit den höchsten Gehalten sind Metbut-Hel (0,58 mg/g), Ibut-Hel (0,51 mg/g), Ibut-DHel (0,24 mg/g) und T-Hel (0,23 mg/g). Die SL DHel (0,09 mg/g) Hel (0,02 mg/g) und Ac-Hel (0,01 mg/g) können als Minorverbindungen betrachtet werden.

Als nächstes wurden die Mittelwerte des Gesamtgehalts an SL pro Standort ermittelt, um eventuelle Unterschiede zwischen den Standorten erkennen bzw. Regressionsanalysen

(siehe C.3.1.3.2) mit Standortfaktoren durchführen zu können. In Tabelle 32 sind die Mittelwerte des SL-Gesamtgehalts und des Verhältnisses Summe-Hel/Summe-DHel (Hel/DHel) und die zugehörigen Variationskoeffizienten der einzelnen Standorte aufgelistet. Bezuglich des SL-Gesamtgehalts konnten keine signifikanten Unterschiede zwischen den Standorten festgestellt werden (ANOVA, post hoc-Test: Scheffé-Prozedur). Lediglich die Mittelwerte der SL-Gesamtgehalte der Gebiete Re (2,4 mg/g) und Bo (3,0 mg/g) unterschieden sich signifikant voneinander ($p \leq 0,05$, t-Test). Die Werte des Variationskoeffizienten bewegten sich für den SL-Gesamtgehalt zwischen 21% und 43%, lediglich Bo5 lag mit 7,61% auffällig niedriger. Ähnliches gilt für die Werte des Variationskoeffizienten für das Verhältnis Hel/DHel. Die Ermittlung der Variationskoeffizienten dienten v.a. zum Vergleich mit den Werten der Arnika-Klone (vgl. C.3.2).

Tabelle 32: Mittelwerte (MW) und Variationskoeffizienten (cv) des SL-Gesamtgehalts und des Verhältnisses Summe-Hel/Summe-DHel (Hel/DHel) der Arnikaproben der verschiedenen besammelten Standorte.

Standort	n	MW SL-Gesamtgehalt [mg/g] ± Stabw	cv-SL- Gesamtgehalt [%]	MW Hel/DHel ± Stabw	cv-Hel/DHel
Re1	11	2,39 ± 0,66	27,48	1,70 ± 0,86	50,74
Re2	10	2,61 ± 0,94	35,92	1,93 ± 0,78	40,34
Re3	10	2,33 ± 1,01	43,37	1,30 ± 0,38	29,18
Bo1	9	3,10 ± 0,97	31,30	1,88 ± 0,94	49,66
Bo2	7	2,31 ± 0,56	24,30	1,32 ± 0,30	22,85
Bo3	14	3,26 ± 0,70	21,42	1,57 ± 0,45	28,54
Bo4	10	3,31 ± 0,70	21,04	2,05 ± 0,65	31,65
Bo5	8	2,99 ± 0,23	7,61	1,41 ± 0,23	16,12

Zur Chemotypbestimmung im Vergleich mit Literaturwerten für Arnika mitteleuropäischer und spanischer Herkünfte wurde der Mittelwerte des Verhältnisses Hel/DHel für alle Proben bestimmt. Tabelle 33 zeigt die Ergebnisse des Vergleichs der Mittelwerte der rumänischen Proben zu den Werten aus anderen Veröffentlichungen. Während der Quotient Summe-Hel/Summe-DHel bei mitteleuropäischen Herkünften zwischen 4,8 und 7,7 liegt und der von spanischen Herkünften zwischen 0,1 und 0,14 (Literaturwerte), liegt der Wert des Quotienten der rumänischen Proben im Mittel bei 1,66. Der Variationskoeffizient (cv) von Summe-Hel/Summe-DHel aller Proben betrug 39,78%.

Tabelle 33: Vergleich der Quotienten der Summen der Helenaline und der Dihydrohelenaline (Hel/DHel) rumänischer Proben mit Literaturwerten von mitteleuropäischen und spanischen Herkünften.^{521,522,523}

	Untersuchte Proben aus Rumänien (n = 79)	Willuhn et al. (1994)	Perry et al. (2009)	Seemann et al. (2010)
Hel/DHel ± Stabw	1,66 ± 0,66 (Min.: 0,45; Max.: 4,15, Median: 1,47)	Mitteleuropäischer Chemotyp (n = 31) [*] : 4,8 ± 2,8 (Min.: 1,0; Max.: 13,3)	Mitteleuropäischer Chemotyp (n = 3) [*] : 7,68	Mitteleuropäischer Chemotyp (n = 10) [*] : 6,1 ± 2,8 (Min.: 1,5; Max.: 17,6)
		Spanischer Chemotyp (n = 4) [*] : 0,08 ± 0,09 (Min.: 0,00; Max.: 0,20)	Spanischer Chemotyp (n = 16) [*] : 0,14	

* Mischproben aus n-Populationen

Mit den Einzelwerten der Summe der Helenaline und der Summe der Dihydrohelenaline aller Proben ließ sich auch eine Korrelationsanalyse durchführen. Die nichtparametrische Korrelation ergab einen positiven Zusammenhang (Korrelationskoeffizient nach Spearman-Rho = 0,456, p ≤ 0,001). Abbildung 77 zeigt die Auftragung der Werte gegeneinander. Die positive Korrelation zeigt, dass mit einem hohen Gehalt an Hel-Estern auch ein hoher Gehalt an DHel-Estern einhergeht.

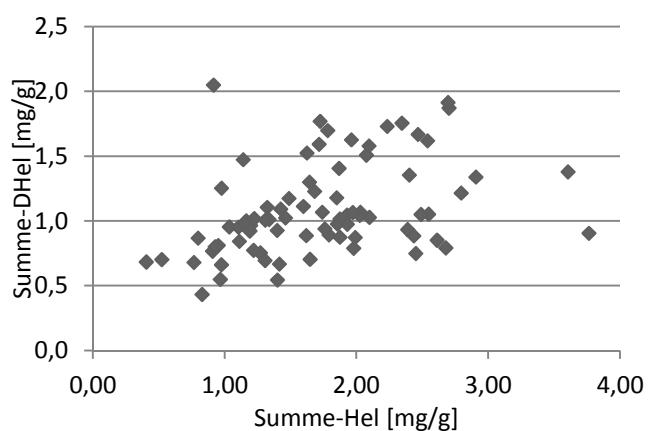


Abbildung 77: Auftragung der Einzelwerte der Summen der Helenaline gegen die der Dihydrohelenaline (Korrelation). Korrelationskoeffizient der nichtparametrischen Korrelation (Spearman-Rho) = 0,456, p < 0,001.

⁵²¹ Willuhn et al. 1994

⁵²² Perry et al. 2009

⁵²³ Seemann et al. 2010

C.3.1.3.2 *Regressionsanalysen*

Die Regressionsanalysen der Inhaltsstoffzusammensetzung (einzelne Ester, Summe-Hel, Summe-DHel, Verhältnis Summe-Hel/Summe-DHel) der Einzelproben und der Standortfaktoren der jeweiligen Plots ergaben in keinem der Fälle signifikante Zusammenhänge (daher Ergebnisse nicht gezeigt).

Die Regressionsanalyse der SL-Gesamtgehalte der Einzelproben mit der Höhenlage der Plots ergab einen signifikanten Zusammenhang, wenn man alle Werte von Re und Bo in die Regressionsanalyse mit einbezieht ($R = 0,28$, $R^2 = 0,079$, $p = 0,013$ (ANOVA, lineare Regression, Abbildung 78)).

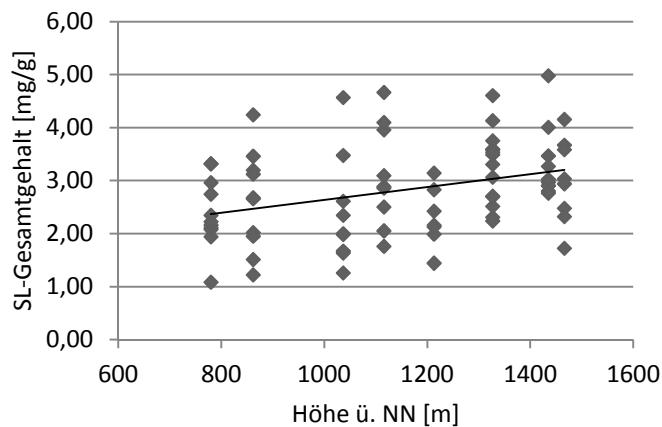


Abbildung 78: Regressionsanalyse aller Einzelwerte ($n = 79$) des SL-Gesamtgehalts und der zugehörigen Höhenlage. $R = 0,28$; $R^2 = 0,079$; $p = 0,013$ (ANOVA, lineare Regression, SPSS).

Bei getrennten Regressionsanalysen der Einzelwerte der beiden Gebiete Repedea und Bobeica ließ sich jedoch kein Zusammenhang mehr zeigen (Abbildung 79).

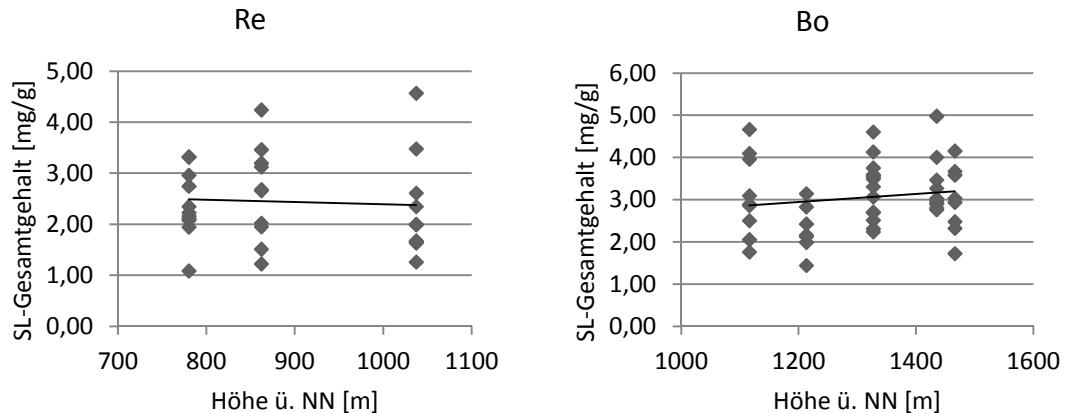


Abbildung 79: Regressionsanalysen der Einzelwerte des SL-Gesamtgehalts und der zugehörigen Höhenlage von Repedea (Re, n = 31) und Bobeica (Bo, n = 48). $R^2_{Re} = 0,0033$, $R^2_{Bo} = 0,023$ (berechnet mit Excel).

Bei getrennter Betrachtung der beiden Untersuchungsgebiete war also kein signifikanter Einfluss der Höhenlage auf den Gesamtgehalt der SL von Arnika zu beobachten.

C.3.1.4 Phänotypische Variation

Während der Probenentnahme in Maramureş wurden Fotoaufnahmen einzelner Arnika-individuen gemacht, um die phänotypische Variabilität der Populationen zu dokumentieren. Da diese Ergebnisse nicht quantifizierbar sind, sind sie lediglich als rein deskriptiv zu betrachten. Es wurden Unterschiede bezüglich der Verzweigungsform des Sprosses, der Form der Zungenblüten und der Sprossfärbung dokumentiert.

Bei den meisten Arnika-individuen in Maramureş wurde ein gut entwickelter Hauptblütenstand und 0-2 kleinbleibende Nebenblütenstände vorgefunden (Abbildung 80, a). Jedoch wurden vereinzelt auch Individuen mit 5 (Abbildung 80, b) und bis zu 7 Blütenköpfchen beobachtet.



Abbildung 80: Unterschiede im Verzweigungsgrad der Sprossachse bei 2 Arnikapflanzen in Maramureş. Zu sehen ist (a) die mehrheitlich vorkommende „1-3-blütige“ Form und (b) eine seltener auftretende „5-blütige“ Form. Aufgenommen im Juni 2010.

Es konnte außerdem eine gewisse Variation bei der Breite der Zungblüten beobachtet werden. Abbildung 81 zeigt die beiden Extremfälle von (a) sehr schmalen und (b) sehr breiten Zungenblüten. Die beiden abgebildeten Individuen wuchsen in unmittelbarer Nachbarschaft auf dem gleichen Plot.



Abbildung 81: Variationen der Breite der Zungenblüten bei 2 Arnika-individuen in Maramureş von (a) sehr schmal bis (b) sehr breit. Die beiden Individuen wuchsen auf dem gleichen Plot in unmittelbarer räumlicher Nähe zueinander. Aufgenommen im Juni 2010.

Auch in der Farbe der Sprossoberfläche zeigten sich z.T. große Unterschiede zwischen einzelnen Individuen, die in unmittelbarer räumlicher Nähe zueinander wuchsen (Abbildung 82, a). So wurden Individuen mit stark rot überlaufenem Stängel (Abbildung 82, c) neben Individuen mit grünem Stängel (Abbildung 82, b) beobachtet.



Abbildung 82: Variationen in der Sprossfarbe von Arnika-Individuen, welche in unmittelbarer räumlicher Nachbarschaft zueinander wuchsen (a). Großaufnahmen des „grünstängeligen“ (b) und des „rotstängeligen“ Individuums (c).

C.3.2 Untersuchung der Arnika-Klone

C.3.2.1 Ergebnisse der Stressexperimente

Um den Einfluss von Stressoren auf den Gehalt von SL bei Arnika-Klonen zu ermitteln, wurden Stressexperimente durchgeführt. Abbildung 83 zeigt exemplarisch die Ergebnisse der Analyse der SL-Gesamtgehalte von Blatt- und Blütenproben der verschiedenen Klonen und der jeweiligen Behandlung. Lediglich bei den Blattproben von Klon 519-15 ist ein leicht erhöhender Einfluss der Stressfaktoren S und P auf den SL-Gesamtgehalt sichtbar ebenso wie bei Blattproben von Klon 504-54 durch Fraßdruck. Auch bei den Blütenproben von Klon 519-15 ist eine Erhöhung des SL-Gesamtgehalts unter dem Einfluss von Stress erkennbar.

Aufgrund der geringen Probenzahl und der hohen Standardabweichungen sind die Ergebnisse statistisch jedoch nicht verlässlich. Es konnte daher für keinen der untersuchten Klone, weder für die Blattproben, noch für die Blütenproben ein signifikanter Einfluss der Stressfaktoren Fraß (S), Verletzung (P) und Bersprühen mit Abszisinsäure (A) auf den SL-Gesamtgehalt oder den Gehalt eines einzelnen Esters festgestellt werden.

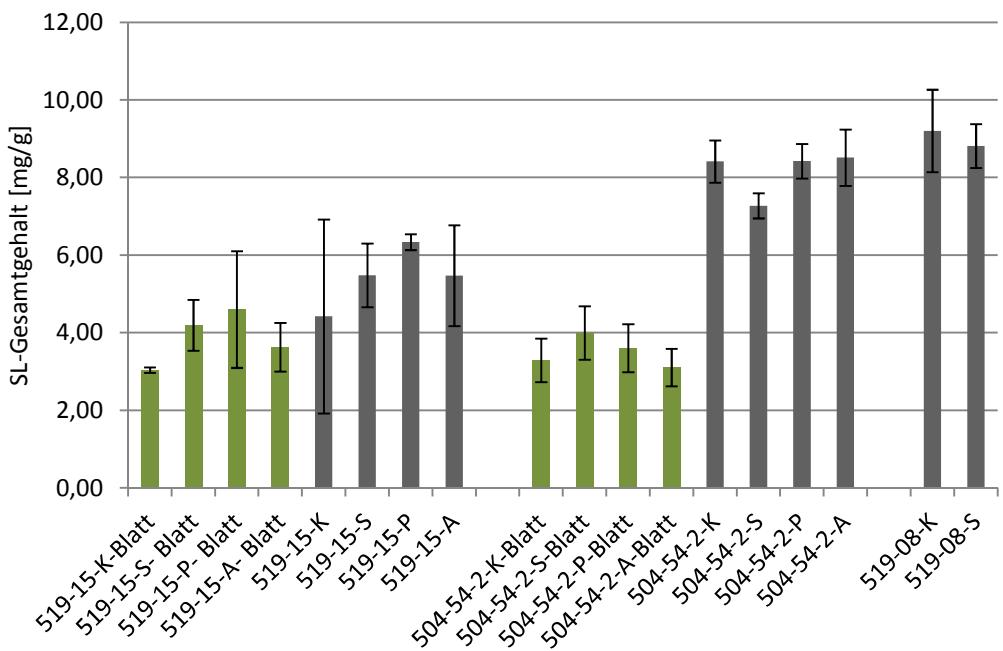


Abbildung 83: SL-Gesamtgehalt von Blatt- und Blütenproben (grün bzw. grau) der Arnika-Klone 519-15, 504-54 und 519-08 unter dem Einfluss verschiedener Stressfaktoren wie Fraßdruck durch Schnecken (S), mechanische Verletzung durch Pinzetten (P) und Besprühen mit Abszisinsäure (A). Unbehandelte Individuen dienten als Kontr5olle (K). (Keine Blattproben bei Klon 519-08 aufgrund von Probenverlust)

C.3.2.2 Mittelwertvergleiche der SL-Gehalte der Arnika-Klone

Um die schon in Abbildung 83 sichtbaren SL-Gehaltsunterschiede zwischen den Klonen, von Blatt- und Blütenproben und zu den Proben aus Rumänien darzustellen, wurden die Mittelwerte und Variationskoeffizienten (cv) der Klone ermittelt. Tabelle 34 zeigt die Mittelwerte der SL-Gesamtgehalte und des Verhältnisses der Summen von Hel und DHel der unbehandelten Kontrollgruppen der untersuchten Klone. Die Klone 504-54 und 519-08 glichen sich mit im Mittel 8,41 mg/g bzw. 8,98 mg/g SL stark, während Klon 519-15 mit durchschnittlich 4,42 mg/g nur etwa die Hälfte an SL enthielt. Während bei Klon 504-54 der SL-Gesamtgehalt in den Blütenköpfchen etwa um das 2,5-fache höher war, als der der Blattproben, lag dieser Unterschied bei Klon 519-15 nur etwa beim 1,5-fachen. Das

Verhältnis Hel/DHel lag bei allen Klonen weit unter 1 und damit waren alle drei Klone eindeutig dem spanischen Chemotyp zuzuordnen.

Tabelle 34: Mittelwerte (MW) der SL-Gesamtgehalte und Summe-Hel/Summe-DHel (Hel/DHel) von Blatt- und Blütenproben der unbehandelten Kontrollgruppen der untersuchten Klone.

Blüte (n = 10)		Blatt (n = 6)	
	MW SL-Gesamtgehalt [mg/g] ± Stabw	MW (Hel/DHel) ± Stabw	MW SL-Gesamtgehalt [mg/g] ± Stabw
			MW (Hel/DHel) ± Stabw
504-54	8,41 ± 0,54	0,30 ± 0,01	3,29 ± 0,56
519-15	4,42 ± 2,50	0,15 ± 0,10	3,04 ± 0,07
519-08	8,98 ± 1,18	0,29 ± 0,01	-
Gesamt	7,53 ± 2,56	0,25 ± 0,08	3,16 ± 0,38
* Keine Blattproben bei Klon 519-08 wegen Probenverlust			

Betrachtet man den Variationskoeffizienten aller Arnika-Klone, also auch der behandelten Arnika-Klone (was in Anbetracht der Tatsache, dass die Behandlung keinen signifikanten Einfluss hatte, sinnvoll erscheint), so ergeben sich folgende Mittelwerte und Variationskoeffizienten (cv) für SL-Gesamtgehalt und Hel/DHel (Tabelle 35).

Tabelle 35: Mittelwerte (MW) und Variationskoeffizienten (cv) des SL-Gesamtgehalts (SL-Ges.) und des Quotienten Summe-Hel/Summe-DHel (Hel/DHel) aller Proben der Arnika-Klone.

Blüten (n = 33)				Blätter (n = 25)			
MW SL-Ges. [mg/g] ± Stabw	cv SL-Ges. [%]	MW Hel/ DHel ± Stabw	cv Hel/DHel [%]	MW SL-Ges. [mg/g] ± Stabw	cv SL-Ges. [%]	MW Hel/DHel ± Stabw	cv Hel/DHel [%]
504-54 (n = 13)	8,18 ± 0,71 8,67	0,32 ± 0,03 8,38	-	3,47 ± 0,62 (n = 13)	17,76	0,18 ± 0,01	6,88
519-15 (n = 12)	5,43 ± 1,44 26,55	0,12 ± 0,05 42,91	-	3,86 ± 0,97 (n = 12)	25,09	0,22 ± 0,06	27,92
519-08 (n = 8)	9,01 ± 0,81 9,03	0,29 ± 0,01 5,17	-	-	-	-	-
Ges.	7,38 ± 1,84 24,99	0,24 ± 0,10 42,07	3,66 ± 0,81 22,23	0,20 ± 0,05 24,93			

Mit durchschnittlich $7,38 \pm 1,84$ mg/g SL-Gesamtgehalt lagen die Arnikaklone weit über dem Durchschnittsgehalt der rumänischen Proben ($2,82 \pm 0,87$ mg/g). Bis auf Klon 519-15 lagen die Variationskoeffizienten des SL-Gesamtgehalts mit 8,67% (504-54) und 9,03% (519-08) und von Hel/DHel mit 8,38% (504-54) und 5,17% (519-08) auch unter den jeweiligen Werten der rumänischen Proben von 30,83 (SL-Gesamtgehalt) bzw. 39,78 (Hel/DHel) (vgl. Tabelle 31 und Tabelle 32). Bei Klon 519-15 ist der erhöhte Variationskoeffizient wohl auch mit einem schwachen Einfluss der Stressbehandlung zu erklären, wobei auch schon die Kontrollgruppe

allein eine große Variationsbreite zeigte (vgl. Abbildung 83). Ein Vergleich rumänischer Proben mit den Arnikaklonen bezüglich der Gehalte der Blätter muss wegen fehlender Blattproben aus Rumänien entfallen.

C.4 Diskussion

Die Arzneipflanze *Arnica montana* L. kommt in Rumänien auf nährstoffarmen, artenreichen Wiesen vor und ist auch dort, wie in vielen Teilen Europas, durch das Verschwinden ihres Lebensraumes bedroht.^{524,525,526,527} Getrocknete Arnikablütenstände (*Arnicae flos*) sind die arzneilich verwendeten Teile der Pflanze. Auszüge der Droge werden v.a. äußerlich bei stumpfen Verletzungen wie Hämatomen, Prellungen und Quetschungen oder bei rheumatischen Beschwerden eingesetzt.⁵²⁸ Als Hauptwirkstoffe werden entzündungshemmende Sesquiterpenlactone (SL) angesehen.⁵²⁹ Qualitätsbestimmend für die Verwendung als Arzneimittel ist daher u.a. der Gehalt dieser SL, v.a. der Helenalin (Hel)- und Dihydrohelenalinester (DHel).⁵³⁰ Aus diesem Grund ist ein möglichst hoher Gehalt in der Droge wünschenswert.

Doch welche Einflussfaktoren bestimmen das Inhaltsstoffspektrum von Arnika? Sind es vornehmlich biotische und abiotische Umweltfaktoren, oder ist der Einfluss der Erbanlagen maßgeblich? Mit diesen und ähnlichen Fragestellungen befassen sich sog. chemoökologische Untersuchungen, wie sie auch in der vorliegenden Arbeit durchgeführt wurden.

Es existieren bereits einige Arbeiten, welche sich mit dem Einfluss von Umweltfaktoren auf das Inhaltstoffmuster von Arnika beschäftigt haben. So zeigten Spitaler et al. (2006) an Arnikapflanzen, die entlang eines Höhengradienten gepflanzt wurden, einen Einfluss der Höhenlage auf die Zusammensetzung der Flavonoide und eine Korrelation mit der Konzentration an Kaffeesäurederivaten. Für den Gehalt an SL konnten sie jedoch keinen Zusammenhang feststellen.⁵³¹ In einer anderen Untersuchung von Spitaler et al. (2008) bestätigte sich dieser Zusammenhang zwischen der Höhenlage des Wuchsorts genetisch homogener Arnikapflanzen und der Zusammensetzung ihres Flavonoidspektrums. Interessant war v.a. eine Zunahme der Flavonoide mit hohem Radikalfängerpotential.⁵³²

⁵²⁴ Marian und Săduan 2003

⁵²⁵ Coldea et al. 2009

⁵²⁶ Kathe 2006

⁵²⁷ Rotar et al. 2009

⁵²⁸ Merfort 2007

⁵²⁹ Hänsel und Sticher 2007

⁵³⁰ Merfort 2007

⁵³¹ Spitaler et al. 2006

⁵³² Spitaler et al. 2008

Die gleiche Arbeitsgruppe ermittelte daraufhin in Klimakammerexperimenten, dass die Temperatur, und nicht wie vorher vermutet die UV-Strahlung, als wichtigsten Faktor für die Flavonoidzusammensetzung der Arnika-Pflanzen anzusehen war.^{533,534}

Seemann et al. (2010) untersuchten den Einfluss von Umweltparametern auf das SL-Spektrum bei Arnika. Sie konnten lediglich für den Isovalerylester des Helenalins eine starke Korrelation mit den Umweltfaktoren Temperatur, Niederschlagsmenge und Höhenlage ermitteln, nicht jedoch für die anderen Ester. Auch das Verhältnis von Hel- und DHel-Ester war sehr konstant und es ergaben sich keine Korrelationen mit Umweltfaktoren. Bodenparameter, die wie in dieser Arbeit über die Zeigerwerte nach Ellenberg bestimmt wurden, zeigten ebenfalls keinen Einfluss auf das SL-Muster. Es ließ sich aber eine Tendenz zur Abgrenzung einzelner Populationen bezüglich der Inhaltstoffführung erkennen.⁵³⁵

Die oben genannten Erkenntnisse zur Chemoökologie der SL von Arnika stehen zum Großteil im Einklang mit den in dieser Arbeit ermittelten Daten für rumänische Populationen. Hier konnten weder für die Höhenlage der gesammelten Pflanzen, noch für einen der Standortfaktoren (Licht, Temperatur, Kontinentalität, Feuchte, Bodenreaktion und Stickstoffzahl) ein Zusammenhang mit dem SL-Muster der Pflanzen festgestellt werden. Auch in den Stressexperimenten mit Arnika-Klonen unter kontrollierten Bedingungen wurden durch Reize wie Schneckenfraß, mechanische Verletzung oder Besprühen mit dem Seneszenz auslösenden Phytohormon Abscisinsäure keine erkennbaren Veränderungen im SL-Muster der Pflanzen induziert, weder in den Infloreszenzen noch in den Blätter. Untersuchungen an anderen Pflanzen kamen jedoch zu entgegengesetzten Ergebnissen. Es ist bekannt, dass Pflanzen auf Stressreize u.a. mit der Änderung der Biosynthese ihrer Sekundärmetabolite reagieren.⁵³⁶ So konnte beispielsweise in einem Experiment an *Artemisia annua* durch Besprühen mit Abscisinsäure der Gehalt des SL Artemisinin erhöht werden.⁵³⁷ Auch Jasmonat, ein Phytohormon, das als Reaktion auf Stressreize wie z.B. Verletzung freigesetzt wird, beeinflusst den Sekundärmetabolismus von Pflanzen u.a. den der Terpenoide.⁵³⁸ Da von SL vermutet wird u.a. als Fraßschutz für die Pflanze zu dienen, ist das Ergebnis der hier präsentierten Untersuchung, dass der Gehalt von SL offenbar nicht von

⁵³³ Albert et al. 2009

⁵³⁴ Zidorn 2010

⁵³⁵ Seemann et al. 2010

⁵³⁶ Zhao et al. 2005

⁵³⁷ Jing et al. 2009

⁵³⁸ Devoto et al. 2005

Stressreizen verändert wird, eher erstaunlich.^{539,540,541} Auch deshalb, weil bekannt ist, dass Arnika durchaus von Schnecken als Nahrungspflanze akzeptiert wird, was für Jungpflanzen sogar bestandsbestimmend sein kann. Dabei ist der Fraßdruck in niedrigeren Höhenlagen größer als in hohen Lagen.^{542,543} Demnach sollte sich im Falle eines Fraßschutzes durch SL ein negativer Höhengradient zeigen, was in der vorliegenden Studie zu Arnika in Rumänien aber nicht beobachtet wurde. Die oben genannten Autoren konnten außerdem anhand von Fraßexperimenten zeigen, dass Schnecken Blätter von unverletzten Arnika-individuen denen von vorher verletzten vorzogen, was auf einen induzierbaren chemischen Abwehrmechanismus schließen lässt.⁵⁴⁴ Die Autoren nennen zwar keine konkrete Inhaltsstoffgruppe, aber bezogen auf die in der vorliegenden Arbeit ermittelten Ergebnisse, scheiden die SL für einen induzierbaren Abwehrmechanismus aus. Jedoch muss man kritisch betonen, dass bei den hier durchgeföhrten Experimenten eventuell die Reizstärke zu gering bzw. der zeitliche Abstand zwischen Reiz und chemischer Analyse zu groß war. Man weiß, dass der Terpenoidstoffwechsel auf verschiedene Reize, wie z.B. Fraß oder Verletzung, unterschiedlich schnell reagiert.⁵⁴⁵ Da der Erntezeitpunkt der Blütenköpfchen aber durch den Reifegrad vorgegeben war und so die Zeitspanne zwischen Reiz und Ernte bei den unterschiedlichen Individuen zwangsläufig variierte, war mit einer hohen Unschärfe zu rechnen, was zu falsch negativen Ergebnissen geführt haben könnte. Trotzdem gibt die Tatsache, dass bei keinem der 3 untersuchten Arnika-Klone (weder bei Blättern noch bei Blütenköpfchen) eine Beeinflussung des SL-Spektrums durch Stressfaktoren festzustellen war und auch die Beobachtung, dass Umweltparameter keinen Einfluss auf das SL-Spektrum bei den rumänischen Proben hatten, dazu Anlass, die Induzierbarkeit der SL-Synthese durch Umweltparameter in Frage zu stellen.

Herms & Mattson (1992) teilten perenne Pflanzen bezüglich ihrer chemischen Abwehrmechanismen in zwei Gruppen ein. Einerseits gibt es schnellwachsende Pflanzen, mit nur gering ausgebildeter, konstitutiver, aber dafür stark ausgeprägter induzierbarer chemischen Abwehr. Andererseits gibt es langsam wachsende Pflanzen, die dauerhaft hohe Konzentrationen an Abwehrstoffen enthalten, dafür aber nur gering entwickelte,

⁵³⁹ Burnett Jr, W. C. et al. 1974

⁵⁴⁰ Picman 1986

⁵⁴¹ Harborne 1995

⁵⁴² Bruelheide und Scheidel 1999

⁵⁴³ Scheidel und Bruelheide 2005

⁵⁴⁴ Scheidel und Bruelheide 1999

⁵⁴⁵ Schulze et al. 2002

induzierbare chemische Abwehrmechanismen besitzen.⁵⁴⁶ Arnika ist zweifelsfrei zur zweiten Gruppe zu zählen. Dies könnte die in der vorliegenden Arbeit beobachtete Nichtinduzierbarkeit der Biosynthese von SL durch Umwelteinflüsse erklären. Für die von *Chrysanthemum cinerariaefolium* produzierten, ebenfalls terpenoiden und insektizid wirkenden Pyrethrine, konnte gleichermaßen keinerlei Induzierbarkeit deren Biosynthese durch simulierten Fraßstress beobachtet werden.⁵⁴⁷ Die bei Arnika gemachten Beobachtungen lassen vielmehr einen hohen genetischen Einfluss auf das SL-Spektrum vermuten, denn große phänotypische Unterschiede bei gleichen Umweltbedingungen könnten auf einen hohen erblichen Anteil dieser Variationen hinweisen.⁵⁴⁸ Die Ermittlung der Standortfaktoren zeigte, dass sich die gesammelten Standorte in ihren abiotischen Eigenschaften nur wenig voneinander unterschieden. Wenn man den Variationskoeffizienten cv als ein Maß für die Variationsbreite innerhalb einer Gruppe versteht, und nun die relativ hohen Variationskoeffizienten der SL-Gehalte und des Verhältnisses von Helenalin- und Dihydrohelenalinester der dort gesammelten Arnika-Individuen betrachtet, so weist dies aber auf eine hohe Variabilität der Individuen eines Standorts hin (vgl. Tabelle 32), obwohl diese Pflanzen dort ähnlichen Umwelteinflüssen ausgesetzt sind. Auch die Variabilität der Gehalte der einzelnen Ester selbst ist hoch, gemessen an der relativen Einheitlichkeit der Umweltfaktoren und deren beobachteten geringen Einfluss auf den Gehalt der Ester (vgl. Tabelle 31). Im Gegenzug dazu waren die Variationskoeffizienten des SL-Gesamtgehalts und des Verhältnisses Summe-Hel/Summe-DHel (Hel/DHel) der Arnika-Klone niedriger, was ebenfalls für einen starken Einfluss der Erbanlagen auf das SL-Spektrum spricht, denn für praktisch identische Individuen würde man auch sehr ähnliche Inhaltsstoffspektren erwarten, sofern die Erbanlagen dafür ausschlaggebend sind.

Die vermutlich hohe Variabilität der in Rumänien beprobten Arnikapopulationen zeigte sich nicht nur am SL-Profil der Individuen, sondern auch am Habitus mancher Pflanzen, wie aus den Abbildung 80 (Verzweigungsgrad), Abbildung 81 (Breite der Zungenblüten) und Abbildung 82 (Sprossfarbe) deutlich wird. Die gezeigten Individuen wuchsen teilweise in einer Entfernung von unter einem Meter, was drastische Unterschiede der Standortfaktoren praktisch ausschließt. Auch wenn diese Ergebnisse rein beschreibend und nicht quantifizierbar sind, so unterstützen sie doch die Vermutung einer hohen phänotypischen

⁵⁴⁶ Herms und Mattson 1992

⁵⁴⁷ Baldwin et al. 1993

⁵⁴⁸ Hoffmann und Sgrò 2011

Variabilität von Arnika in Maramureş. Um diese Hypothese zu untermauern, bot sich ein common-garden-Experiment mit vor Ort gesammeltem Saatgut an, welches aber leider aufgrund von schlechten Witterungsbedingungen misslang. Für eine fundierte Klärung der genetischen Variabilität böte sich z.B eine populationsgenetische AFLP-Analyse (Amplified fragment-length polymorphism) der rumänischen Arnika an.

Doch nicht nur die Variation der SL-Zusammensetzung und deren Zusammenhang mit Umwelteinflüssen, sondern auch der Gesamtgehalt von Sesquiterpenlactonen und das Verhältnis von Hel-Estern und DHel-Estern sind von Interesse. Die Korrelationsanalyse der Gehalte von Hel-Estern und DHel-Estern zeigte einen positiven Zusammenhang, was den biogenetischen Zusammenhang dieser beiden Stoffgruppen unterstreicht (Abbildung 77).⁵⁴⁹ Von Arnika werden bezüglich der Helenalin- bzw. Dihydrohelenalingehalte zwei Chemotypen beschrieben: Ein mitteleuropäischer Chemotyp, der reich an Helenalinestern ist, welche ein erhöhtes allergenes Potential bergen, und ein spanischer Chemotyp, der reich an Dihydrohelenalinestern ist.⁵⁵⁰ Willuhn et al. (1994) bestimmten für den mitteleuropäischen Chemotyp ein mittleres Verhältnis von Hel/DHel von 4,8 und für den spanischen Chemotyp von 0,08.⁵⁵¹ In einer anderen Untersuchung ergab sich für mitteleuropäische Herkünfte ein Wert von 7,68 und für spanische Herkünfte von 0,14.⁵⁵² Seemann et al. (2010) berichten für den mitteleuropäischen Typ ein Wert von 6,1.⁵⁵³ Mit einem ermittelten Hel/DHel-Verhältnis von durchschnittlich 1,66, liegen die 79 Arnikaproben aus Maramureş eher im Mittelfeld bzw. näher an den Werten des spanischen Chemotyps (vgl. Tabelle 33). Dies überrascht aufgrund der geographischen Lage, ist jedoch für eine mögliche Verwendung der dortigen Arnika als Arzneimittel postiv zu bewerten, da die allergenen Hel-Ester in geringeren Konzentrationen vorkommen, als im mitteleuropäischen Chemotyp. Mit einem durchschnittlichen Gesamtgehalt an SL von 0,28% liegen die Proben aus Rumänien allerdings unter den Mindestanforderungen des Arzneibuchs von 0,40%.⁵⁵⁴

Insgesamt lassen die im Verlauf dieser Studie erhobenen Daten vermuten, dass die Gehalte und die Zusammensetzung der Sesquiterpenlactone in Arnika nur wenig von Umweltparametern beeinflusst, sondern wohl eher von genetischen Faktoren bestimmt

⁵⁴⁹ Schmidt et al. 1998

⁵⁵⁰ Merfort 2007

⁵⁵¹ Willuhn et al. 1994

⁵⁵² Perry et al. 2009

⁵⁵³ Seemann et al. 2010

⁵⁵⁴ Merfort 2007

werden. Die hier erörterten Beobachtungen lassen außerdem den vorsichtigen Schluss zu, dass die untersuchten Arnikapopulationen im Naturpark Parcul Natural Munții Maramureșului noch eine hohe genetische Variabilität aufweisen und dadurch noch nicht so stark durch genetische Verarmung gefährdet sein könnten. Eine hohe Variabilität ist Garant für biologische Fitness und das gibt Anlass zur Hoffnung für das Fortbestehen der Art *Arnica montana* L. in Rumänien.⁵⁵⁵

⁵⁵⁵ Reed und Frankham 2003

C.5 Projekt zum nachhaltigen Anbau und zum Schutz von *Arnica montana* L. in Maramureş (Rumänien)

Im Zuge der Feldarbeiten in Rumänien ist in enger Zusammenarbeit mit der Parkverwaltung von Parcul Natural Munţii Maramureşului eine Projektidee gereift, deren Inhalt hier kurz skizziert werden soll.

Kern dieses Projekts ist es, Kleinbauern in der wenig entwickelten Region Maramureş darin zu unterstützen Arnika auf brachen Flächen nach Methoden des ökologischen Landbaus zu kultivieren, das Endprodukt *Arnicae flos* durch Ernte und Trocknung selbst zu produzieren und direkt und fair gehandelt an einen deutschen Abnehmer zu verkaufen. Ein Teil des Erlöses soll dabei unter Regie des Naturparks für Pflegemaßnahmen für von Verbuschung bedrohter Arnikawiesen und für Umweltbildungsmaßnahmen verwendet werden. Ein anderer Teil soll zum Ankauf von kontrolliert wildgesammelten Arnikasaatguts verwendet werden. Damit soll den Landbesitzern ein Anreiz geboten werden ihre artenreichen Arnikawiesen einerseits zu pflegen und andererseits nicht durch unachtsames Verhalten wie z.B. das Einrichten von Holzlagerplätzen oder Viehkoppeln zu zerstören. Durch das Zusatzeinkommen für die z.T. wirtschaftlich sehr schlecht gestellten Bauern kann außerdem ein kleiner Beitrag zur nachhaltigen Entwicklung der Region und damit zum Erhalt der traditionellen Kulturlandschaft von Maramureş geleistet werden.

Die ersten Schritte wie das Anziehen der mehrjährigen Arnika in extra dafür errichteten Gewächshäusern, das versuchweise Aussetzen der Jungpflanzen und die Vernetzung von Bauern, Abnehmern und Naturpark sind bereits abgeschlossen. Neben der sozioökonomischen Ausrichtung des Projekts böten sich in Zukunft auch interdisziplinäre, wissenschaftliche Fragestellungen v.a. im ökologischen Bereich und im Natur- und Landschaftsschutz an. Außerdem ist eine Ausweitung des Projekts auf andere Arznei- und Gewürzpflanzen denkbar.⁵⁵⁶

⁵⁵⁶ Flemming und Heilmann 2014

D Zusammenfassung

D.1 Phytochemische und pharmakologische Untersuchungen von Proazulenen aus Kamille und Schafgarbe

Im Teil B dieser Arbeit konnte eine Isolierung des Proazulens Matricin aus der Kamille (*Matricaria recutita L.*) durch rein chromatographische Methoden entwickelt werden. Mit Hilfe von drei Flash-Chromatographieschritten an Kieselgel, Aluminiumoxid und RP-18-Kieselgel konnte Matricin einer Reinheit von (98,6%, HPLC) und einer Ausbeute von 0,016% isoliert werden. Außerdem wurde eine Methode zur Isolierung des Matricinderivats 8-Desacetyl-8-angeloyl-4-*epi*-matricin aus Schafgarbenkraut (*Achillea millefolium* agg.) etabliert.

Aufgrund der relativ widersprüchlichen Datenlage bezüglich der Pharmakologie des Matricins und seines Abbauprodukts, dem Chamazulen, wurden beide Substanzen *in vitro* auf potentiell anti-inflammatorische Aktivität untersucht. Dazu wurden zellbasierte Testsysteme mit humanen Endothelzellen (HMEC-1) und murinen Makrophagen (RAW 264.7) benutzt. Außerdem wurde ein zellfreier Assay zur NO-Radikalfängereigenschaft angewandt (SNP-Assay). Matricin zeigte eine dosisabhängige Inhibierung der TNF- α - und LPS-stimulierten ICAM-1-Expression (intercellular adhesion molecule) bei HMEC-1 im nicht-toxischen Konzentrationsbereich, wohingegen sich Chamazulen als inaktiv erwies. Die Expression des Adhäsionsmoleküls ICAM-1 steht in engem Zusammenhang mit dem Entzündungsgeschehen im Gewebe und wird u.a. über den NF- κ B-Weg aktiviert. Mit Hilfe von immunfluoreszenzmikroskopischen Aufnahmen von mit TNF- α -stimulierten humanen Endothelzellen konnte eine Translokationshemmung des Transkriptionsfaktors NF- κ B vom Zytoplasma in den Zellkern durch Matricin nachgewiesen werden. Chamazulen hingegen hemmte die Translokation nicht. Auch in einem Reportergen-Assay konnte die NF- κ B-Promotoraktivität dosisabhängig durch Matricin vermindert werden.

Ein weiteres wichtiges Ereignis im Entzündungsgeschehen stellt die Synthese von Stickstoffmonoxid (NO)-Radikalen durch die induzierbare NO-Synthase (iNOS) von Makrophagen dar. Als Reaktion auf Infektionen dient NO einerseits der unmittelbaren Bekämpfung pathogener, mikrobieller Organismen, bei chronischer Überproduktion hingegen verursacht es chronisch entzündliche Gewebeerkrankungen. NO wird in Lösung in Nitrit umgewandelt, welches akkumuliert und mittels Griess-Reagenz nachgewiesen werden

kann. Matricin und Chamazulen konnten bei 24-stündiger Applikation dosisabhängig die Nitrit-Akkumulation im Zellüberstand von LPS-stimulierten RAW 264.7-Zellen (Griess-Assay) reduzieren, wobei Matricin ($IC_{50} = 20,9 \mu M$) effektiver war als Chamazulen ($IC_{50} = 59,3 \mu M$). Beide Substanzen waren in den untersuchten Konzentrationen nicht toxisch für RAW 264.7 Zellen. Im zellfreien SNP-Assay, in dem NO durch einen metallorganischen NO-Donor generiert wird, zeigte sich, dass Chamazulen die Nitrit-Konzentration senkte, während Matricin keinen Einfluss hatte. In einem modifizierten Griess-Assay wurde der zeitliche Einfluss von Matricin und Chamazulen auf die Nitrit-Konzentration im Zellüberstand von LPS-stimulierten RAW 264.7-Zellen gemessen. Nach 24 h Inkubation zeigte sich das analoge Ergebnis zum klassischen Griess-Assay. Nach nur 1 h Inkubation zeigte das Matricin keinerlei Einfluss, wohingegen das Chamazulen die Nitrit-Konzentration bereits zu senken vermochte. Diese Ergebnisse lassen vermuten, dass die entzündungshemmende Aktivität des Matricins schon prä-transkriptionell evtl. über eine Translokationshemmung von NF-κB und die dadurch bedingte Verminderung der Menge inflammatorischer Proteine wie z.B. ICAM-1 oder iNOS vermittelt wird, während das Chamazulen lediglich als Radikalfänger fungiert und wenig Einfluss auf die Signaltransduktion der Zelle nimmt.

In einem zweiten Projekt des Teils B dieser Arbeit erwiesen sich sowohl die proazulenreichen Fraktionen eines Schafgarbenblütenextrakts (DCM) als auch der Extrakt selbst als äußerst potent bezüglich ihrer anti-inflammatorischen Aktivität, sowohl im ICAM-1-Assay als auch im Griess-Assay. So verminderte der Extrakt die ICAM-1-Expression bei HMEC-1 bei einer Konzentration von $12,5 \mu g/ml$ auf 21,1%. Im Griess-Assay senkte der Extrakt in einer Konzentration von $5 \mu g/ml$ die Nitrit-Konzentration auf 38,7% im Vergleich zur Kontrolle. Die proazulenreiche Fraktion V zeigte sich bei einer Konzentration von $5 \mu g/ml$ und einer Verminderung der Nitrit-Konzentration auf unter 30% noch aktiver als der Extrakt selbst. Diese Ergebnisse lassen den Schluss zu, dass die Proazulene aus der Schafgarbe einen nicht unerheblichen Anteil an der entzündungshemmenden Wirkung dieser Pflanze haben.

D.2 Chemoökologische Untersuchungen zu *Arnica montana* L.

Die chemoökologische Untersuchung von 79 Proben von *Arnica montana* L. aus Maramureş (Rumänien) ergab keine signifikanten Zusammenhänge zwischen Umweltparametern und dem Gehalt bzw. der Zusammensetzung der Sesquiterpenlactone (SL) vom Helenalin- und

Dihydrohelenalintyp. Die Variabilität der Inhaltsstoffmuster der Arnika-individuen war auch unter den ähnlichen Umweltbedingungen eines Standorts sehr hoch, hingegen bei untersuchten Arnika-klonen deutlich geringer. In Stressexperimenten an Arnika-klonen konnte außerdem keine Veränderung der SL-Muster induziert werden. Diese Ergebnisse weisen auf einen geringen Einfluss von Umweltfaktoren und einen größeren Einfluss der Erbanlagen auf die Biosynthese der SL bei Arnika hin.

Das Verhältnis von Helenalin- zu Dihydrohelenalinestern der rumänischen Arnika-proben lag zwischen dem des helenalinreichen mitteleuropäischen und dem des spanischen Chemotyps. Der durchschnittliche Gesamtgehalt an SL lag mit 0,28% unter den Mindestanforderungen des Europäischen Arzneibuchs von 0,40%.

E Summary

E.1 Phytochemical and pharmacological investigations of Chamomile and Yarrow

In the first part B of this study a straight isolation procedure of the proazulene matricin from chamomille (*Matricaria recutita* L.) was established. Using 3 chromatographic steps with different stationary phases (silica gel, alumina and RP-18-silica gel), matricin was obtained in a yield of 0.016% exhibiting a purity of 98.6% (HPLC). Furthermore, a method was developed to isolate the matricin derivative 8-desacetyl-8-angeloyl-4-*epi*-matricin from Yarrow herb (*Achillea millefolium* agg.).

Due to contradictory data concerning the pharmacology of matricin and its degradation product chamazulene, both substances were tested in terms of their anti-inflammatory potential *in vitro*. Therefore, cell-based assays with human microvascular endothelial cells (HMEC-1) and murine macrophages (RAW 264.7) and a cell-free NO-scavenger-assay (SNP-assay) were used. Matricin inhibited TNF- α and LPS induced ICAM-1 expression (intercellular adhesion molecule 1) in HMEC-1 dose-dependently, whereas chamazulene was inactive. Both substances were tested in non-cytotoxic concentrations. ICAM-1 expression is associated with inflammatory processes in tissues and is, amongst others, activated via the NF- κ B-pathway. Immunfluorescence microscopy of TNF- α stimulated HMEC-1 revealed an inhibitory effect of matricin on the translocation of NF- κ B from the cytoplasm into the nucleus. Chamazulene did not affect the NF- κ B translocation. Furthermore, in a reporter

gene assay matricin down-regulated the NF-κB-promotor activity in a dose-dependent manner.

Another important element of inflammation is the production of nitric oxide radicals (NO) via inducible NO-synthase (iNOS) by macrophages. On the one hand, NO helps to control pathogenic microbes, as a reaction on acute infection. On the other hand, chronological over production of NO can cause tissue-damage. Dissolved NO is converted into nitrite which accumulates in the supernatant and can be analyzed using the griess-ragent. Matricin and chamazulene reduced the nitrite concentration in the supernatant of LPS stimulated RAW 264.7-cells (Griess-assay) after 24 h incubation in a dose-dependant manner. Matricin was more active ($IC_{50} = 20.9 \mu M$) compared to chamazulene ($IC_{50} = 59.3 \mu M$). Both substances proved to be non-cytotoxic in the tested concentrations. The cell-free SNP-assay indicated that chamazulene lowered nitrite concentration in contrast to matricin. The influence of incubation time of matricin and chamazulene on LPS-stimulated RAW-cells was examined by a modified Griess-assay. After 24 h the results were equal to the conventional Griess-assay. When incubating cells just 1 h, matricin showed no influence on the nitrite-concentration whereas chamazulene reduced nitrite accumulation. Therefore, it can be assumed that anti-inflammatory activity of matricin is mediated pre-transcriptionally maybe via inhibition of NF-κB translocation and the associated decrease of inflammatory protein-levels such as ICAM-1 and iNOS, whereas chamazulene could act as a NO-scavenger with less or no influence on the signal transduction of the cell.

In a second project of part B of this study, the high *in vitro* anti-inflammatory activity of a yarrow flowerhead extract (DCM) and its proazulene-rich fractions in the ICAM-1-assay and Griess-assay was shown. The yarrow crude extract, for instance, reduced ICAM-1 expression in HMEC-1 to 21.1% at a concentration of 12.5 $\mu g/ml$ and decreased the nitrite accumulation in the Griess-assay down to 38.7% in a concentration of 5 $\mu g/ml$ compared to the control group. The proazulene-rich fraction V was even more active than the extract and reduced the nitrite accumulation below 30% in a concentration of 5 $\mu g/ml$. Thus it can be presumed that proazulenes play a significant role in the anti-inflammatory effects of *A. millefolium*.

E.2 Chemo-ecological investigations of *Arnica montana* L.

No significant correlation between helenalin- and dihydrohelenalintype sesquiterpene lactone (SL) content and ecological parameters was observed during a chemo-ecological investigation of 79 samples of *Arnica montana* L. in Maramureş (Romania). Variability of the SL-composition between individuals was quite high despite high similarity of environmental conditions on site. In contrast, Arnica-clones exhibited less variability. In addition, changes of SL-pattern were not inducible by stress-experiments with Arnica-clones. These results are suggestive of a higher genetic influence on SL-composition of Arnica plants compared to environmental influences. The ratio of helenaline- and dihydrohelenaline esters of the Romanian samples was in between the ration of the middle-european and the Spanish chemotype. The mean SL-content of 0.28% was below the minimum standard of 0.40% of the European Pharmacopoeia.

F Anhang

F.1 Abkürzungsverzeichnis

AA-Reagenz	Anisaldehyd-Reagenz
Ac-	Acetyl-
ACN	Acetonitril
AFLP	Amplified Fragment-Length Polymorphism
Ang-	Angeloyl-
AP-1	Activator Protein 1
BH ₄	Tetrahydrobiopterin
Bo	Bobeica
C/EBP	CCAAT-enhancer-binding proteins
CI-MS	Chemische-Ionisations-Massenspektrometrie
CoA	Coenzym A
COX-2	Cyclooxygenase 2
Da	Dalton
DC	Dünnschichtchromatographie
DCM	Dichlormethan
DC-MS	Dünnschichtchromatographie-Massenspektrometrie
DHel	Dihydrohelenalin
DMAPP	Dimethylallylpyrophosphat
DMSO	Dimethylsulfoxid
DXP-Weg	1-Desoxy-D-Xylose-Weg
ECGM	Endothelial Cell Growth Medium
EI-MS	Elektronenstoßionisations-Massenspektrum
eNOS	endotheliale NOS
EP-Reagenz	Essigsäure-Phosphorsäure-Reagenz
ESI-MS	Elektrospray-Ionisations Massenspektrometrie
EtOAc	Ethylacetat
Et ₂ O	Diethylether
EtOH	Ethanol
Ets	Erythroblast transformation specific (Transkriptionsfaktor)
FACS	Fluorescence Activated Cell Sorting
FID-Detektor	Flammenionisationsdetektor
FITC	Fluorescein-Isothiocyanat
FPP	Farnesylpyrophosphat
GC	Gaschromatographie
GGPP	Geranylgeranylpyrophosphat
GM-CSF	Granulocyte Macrophage Colony-Stimulating Factor
GPP	Geranylpyrophosphat
Hel	Helenalin
HMEC-1-Zelllinie	Human Microvascular Endothelial Cells
HMGR	HMG-CoA-Reduktase
HMG-CoA-Synthase	3-Hydroxy-3-methylglutaryl-CoA-Synthase
HPLC	Hochleistungsflüssigkeitschromatographie
HUVEC	Human Umbilical Vein Endothelial Cells
I-	Isovaleryl-
Ibut-	Isobutyryl-
ICAM-1	Intercellular Adhesion Molecule 1

IFN-γ	Interferon gamma
I-κB	Inhibitor of κB
IKK	I-κB-Kinase-Komplex
IL	Interleukin
iNOS	induzierbare Stickstoffmonoxid (NO)-Synthase
IPP	Isopentenylpyrophosphat
IRF-1	Interferon Regulatory Factor-1
JAK	Januskinase
LDL	Low Density Lipoprotein
LPS	Lipopolysaccharid
MAP	Mitogen-Activated Protein
MCP	Monocyte Chemotactic Protein
MeOH	Methanol
Met-	Methacryloyl-
Metbut-	Methyl-butyryl-
MIF	Migration Inhibitory Factor
MIP	Macrophage Inflammatory Protein
MMPs	Matrix-Metalloproteasen
MVA-Weg	Acetat-Mevalonat-Weg
MTT	(3-(4,5-Dimethyl-2-thiazolyl)-2,5-diphenyl-2H-tetrazoliumbromid)
MW	Mittelwert
NADP ⁺	Nikotinamidadenindinukleotidphosphat
NF-κB	Nuclear Factor kappa B
NF-IL-6	Nuclear Factor Interleukin-6
NIK	NF-κB-Inducing Kinase
nNOS	neuronale NOS
NOS	NO-Synthasen
NP-DC	Normalphasen Dünnschichtchromatographie
PBS	Phosphate Buffered Saline
PLA2	Phospholipase A ₂
RANTES	Regulated on Activation, Normal T Cell Expressed and Secreted
Re	Repedea
R _F -Wert	Retentionsfaktor
RT	Raumtemperatur
SDS	Sodiumdodecylsulfate
SL	Sesquiterpenlacton(e)
SNP	Sodium nitroprusside
SP1	Specificity Protein 1
STAT	Signal Transducers and Activators of Transcription
tBME	<i>tert</i> -Butylmethylether
TGF-β	Transforming Growth Factor β
Tig-	Tigloyl-
TNF-α	Tumornekrosefaktor alpha
TRAF	TNF Receptor Associated Factors
VCAM	Vascular Cell Adhesion Molecule

F.2 Geräte und Materialien

Tabelle 36: Auflistung der in der vorliegenden Arbeit verwendeten Geräte und Materialien.

Bezeichnung	Spezifikation/Modell	Hersteller
Analysenwaage	R 160 P	Sartorius, Germany
Autoklaven	Autoklav 500	H+P, Germany
	Autoklav 23	Melag, Germany
DC-Kammer	Doppeltrogkammern 10x10 bzw. 20x20 cm	Camag, Switzerland
DC-MS-Interface	TLC-MS Interface	Camag, Switzerland
Dünnschichtchromatographie	Reprostar 3	Camag, Switzerland
	Linomat 5	
	Software: WinCats 1.4.2	
	Probendosierspritze: 100 µl	Hamilton, Switzerland
FACS	Facscalibur Software: CellQuestPro	Becton Dickinson, USA
FACS-Röhrchen	5 ml Polystyren Round Bottom Tube	Becton Dickinson, USA
Flash-Chromatographie Anlage	Spot Liquid Chromatography Flash Software: Armen Glider Flash V2.3 Flash-Chromatographiesäule Größe 1: 18,5 cm x 4 cm Durchmesser Flash-Chromatographiesäule Größe 2: 12 cm x 2,8 cm Durchmesser	Armen, France
Gaschromatograph	Modell 3900 Säule: 30 m VF-1MS-0.25, film thickness 0.25 µm,	Varian, Germany
Glaspipetten	Mess- und Vollpipetten	Brand, Germany
Glassäulen	Verschiedene Größen	Glasbläser der Uni Regensburg
Heizplatte, DC	Thermoplate S	Desaga, Germany
HPLC, analytische	Elite La Chrom: Organizer Diode Array Detector L-2455 Autosampler L-2200 Pump L-2130 Column Oven L-2350 Software: EZChromElite 3.1.7	VWR, Germany
	Analytische HPLC-Säule: Hibar® 250-4, Purospher® STAR, RP-18e (5µm)	Merck, Germany
HPLC, semipräparative	ProStar: Autosampler 410 Pumpen 210 Detektor 335 Software: Galxie 1.9.302.952	Varian, Darmstadt

	Semipräparative HPLC-Säule: Dynamax 250x10 mm, Pursuit XRs 5 C18	
	Injektionsspritze: 5 ml	Hamilton, Switzerland
CO2-Inkubator	CO ₂ -Incubator NU-5500 E , Series 13	NUAIRE, USA
Kieselgelplatte, Normalphase	TLC Silicagel 60 F ₂₅₄	Merck, Germany
Kulturflaschen	Cellstar 75 cm ² , 150 cm ²	Greiner, Germany
Massenspektrometer	Finnigan TSQ 7000 Software: Xcalibur 1.2 DC-MS, ESI	Thermoquest, USA
	Finnigan MAT SSQ 710 A	Thermoquest, USA
	Q-TOF 6540 UHD	Agilent, Germany
Messkolben	Verschiedene Volumina	Brand, Germany
Messzylinder	Verschiedene Volumina	Brand, Germany
Mikroskope	Axio Observer Z1 mit motorisiertem Objekttisch, EC Plan-Neofluar 10x Objetiv Software: AxioVision 4.8.1 Axiovision ASSAYbuilder™ Physiology Analyst Modul	Carl Zeiss, Germany
	CK X 41 SF	Olympus, Germany
Nanoseps	30K, OMEGA	Pall Lifescience, USA
NMR-Röhrchen	507-HP-8	Norell, USA
NMR-Spektrometer	AVANCE III 600 Kryo	Bruker, Germany
	AVANCE 300	
NMR-Software	MestReNova 6.0.2-5475	Mestrelab Research, Spain
Papierfilter	150 mm folded filters, grade: 289,80 g/m ²	Sartorius, Germany
Pasteurpipetten	150 mm, 230 mm	VWR, Germany
Pipetten, serologische	5,10,25 ml, steril	Greiner, Germany
Pipetten	2,5 Reference (0,1-2,5 µl)	Eppendorf, Germany
	10 Reference (2,5-10 µl)	
	100 Research (10-100 µl)	
	1000 Research (100-1000 µl)	
	100 Research, 12-Kanal (10-100 µl)	
	300 Research, 8 Kanal (30-300 µl)	
Pipettenspitzen	0,5-10 µl	Abimed, Germany
	100 µl, 1000 µl	Sarstedt, Germany
Plattenlesegerät	Spectra FluorPlus Software: Xfluor4 4.40	Tecan, Germany
Reaktionsgefäße	0,5 ml, 1,5 ml, 2,0 ml	Eppendorf, Germany
Reinstwasseranlage	Astacus LS	MembraPure, Germany
Rotationsverdampfer	Laborota 4003-control MR 3004 safety s Rotavac vario control	Heidolph, Germany
Spritzenvorsatzfilter	Titan Syringe Filter, RC, 0,2 µm	Sun Sri, USA
Sterilbank	HERASafeKS	Thermo, Germany

Sterilfilter	Minisart, 0,20 µm	Sartorius, Germany
Thoma-Zählkammer, Neubauer improved	0,100 mm Tiefe, 0,0025 m ²	LO-Laboroptik, UK
Ultraschallbad	Ultrasonic cleaner	VWR, Germany
Wasserbad	WB 22	Memmert, Germany
Zellkulturtestplatten	96-well, 24-well	TPP, Switzerland
Zellschaber	Dispenser, 30 cm	TPP, Switzerland
Zentrifugen	MegaFuge 1.0	Heraeus Sepatech, Germany
	Jouan BR4i multifunction centrifuge	Thermo, Germany
Zenrifugenröhrchen	15 ml, 50 ml	Greiner, Germany

F.3 Chemikalienlisten

Tabelle 37: Auflistung der für die phytochemischen Untersuchungen verwendeten Lösungen, Chemikalien und Pflanzenmaterialien.

Bezeichnung	Spezifizierung	Hersteller
Abscisinsäure (ABA)	≥98,5%	Sigma-Aldrich, Germany
Aceton	p.a., EMSURE®	Merck, Germany
Acetonitril (ACN)	LiChrosolv®	Merck, Germany
Aluminiumoxid B (Al ₂ O ₃)	Aluminiumoxid 60 aktiv, basisch (Aktivitätsstufe I)	Merck, Germany
Aluminiumoxid N (Al ₂ O ₃) (Aktivitätsstufe IV)	MP-Aluminia N Super I, EcoChrom™ Aktivitätsstufe IV: + 10% Wasser	MP-Biomedicals Germany GmbH, Germany
Ammoniaklösung	25% NH ₃ -Lösung, p.a.	Merck, Germany
Anisaldehyd (AA)	p-Methoxybenzaldehyd, p.a.	Merck, Germany
Anisaldehyd-Reagenz (AA-Reagenz)	Anisaldehyd: 0,5 ml Essigsäure: 10 ml Methanol: 85 ml Schwefelsäure: 5 ml	
Chamazulen	97% (GC)	PhytoLab, Germany
Celite® 560		Sigma-Aldrich, Germany
Chloroform, deuteriert	Chloroform-d, 99,8 atom % D	Sigma-Aldrich, Germany
Dichlormethan (DCM)	p.a. + 100 ppm Amylene	ACROS, USA
Diethylether (Et ₂ O)	AnalaR NOMAPUR	VWR, Prolabo, Belgium
4-Dimethylaminobenzaldehyd	99%	Sigma-Aldrich, Germany
EP-Reagenz	4-Dimethylaminobenzaldehyd: 0,25 g Essigsäure: 50g 85% Phosphorsäure: 5 g Wasser: 20 ml	
Essigsäure	p.a., EMSURE®, 100%, anhydrous	Merck, Germany
Essigsäureethylester (EtOAc)	p.a., 99,5%	ACROS, USA
Ethanol (EtOH)	absolute	J.T. Baker, Netherlands
Hexan	n-Hexan, p.a.	ACROS, USA

Kamillenblüten	Flores Chamomillae, PH.EUR.6.0	Caelo, Deutschland
Kieselgel Geduran®	Geduran®, Si 60 0,063-0,200 mm	Merck, Germany
Methanol HPLC grade (MeOH-HPLC)	LiChrosolv®, gradient grade for liquid chromatography	Merck, Germany
Methanol (MeOH)	p.a., EMSURE®	Merck, Germany
Methanol, deuteriert (CD ₃ OD)	Methanol-d4, 99,8%	Deutero GmbH, Germany
Natriumsulfat (Na ₂ SO ₄),	99% extra pure, wasserfrei	ACROS, USA
Orangegegel	Kieselgel mit Feuchtigkeitsindikator, 1-3 mm	Merck, Germany
Petroleumbenzin	p.a., Siedebereich 60-80 °C	Merck, Germany
Phosphorsäure	p.a., 85% ortho-Phosphorsäure	Merck, Germany
RP-18-Kieselgel	LiChroprep® RP-18 (25-40 µm)	Merck, Germany
Santonin	(-)α-Santonin, 99% rein	Sigma-Aldrich, Germany
Schafgarbenblüten	Flores Millefolii gerebelt, Ch-B 12267701, Gehalt(ätherisches Öl) 3,6 ml/kg	Caelo, Deutschland
Schafgarbenkraut	Charge 2277430	Bombastus, Germany
Schwefelsäure (H ₂ SO ₄)	p.a., 95-97%	Merck, Germany
Seesand	extra pure, 0,1-0,315 mm	Merck, Germany
Sodium nitroprusside (SNP) = Natrium-Nitroprussid	di-Natriumnitrosylpentacyanoferrat (III) Dihydrat, p.a., ≥ 99%	Sigma-Aldrich, Germany
tert-Butylmethylether (tBME)	99,9%, extrapure	ACROS, USA

Tabelle 38: Auflistung der in der vorliegenden Arbeit verwendeten Lösungen und Chemikalien für die zellbiologischen Untersuchungen.

Antibiotics für ECGM	3,5 ml	Provitro, Germany
Cellomics® HCS Reagent Kit Multiplex NF-κB and c-Jun Activation	Immunfluoreszenzfärbung von NF-κB und c-Jun	Thermo Scientific, USA
Collagen G	Collagen G from bovine calf serum 4 mg/ml	Biochrom AG, Germany
Dimethylsulfoxid (DMSO)	p.a.	Sigma-Aldrich, Germany
Endothelial Cell Growth Medium (ECGM)	500 ml	Provitro, Germany
Ethanol (EtOH)	absolute	J.T. Baker, Netherlands
Fetales Kälberserum (FCS)	FCS superior	Biochrom AG, Germany
FITC-markierter Antikörper (ICAM-1)	FITC-markierter Mausantikörper (Fluorescin-Isothiocyanat) IgG1 gegen humanes CD54 (ICAM-1)	Biozol, Germany
Formaldehydlösung	Formaldehyd-Lösung 10%, phosphatgepuffert	AppliChem, Germany
Hoechst	Bisbenzimid H 33342 trihydrochlorid	Sigma-Aldrich, Germany
Interferon-gamma (IFN-γ)	human, recombinant, <i>E.coli</i>	PeproTech, USA
Lipopolsaccharid (LPS)	Lipopolsaccharid aus <i>E. coli</i> 055.B5	Sigma-Aldrich, Germany
M199	Medium199	PAN GmbH, Germany
MTT	1-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-3,5-diphenylformazan, 98%	Sigma-Aldrich, Germany
NED	≥98% (N-(1-	Sigma-Aldrich, Germany

	Naphthyl)ethylendiamindihydrochlorid)	
Natriumdodecylsulfat (SDS)	SDS-Lösung: 10% (m/V) in Wasser	Sigma-Aldrich, Germany
Natriumnitrit (NaNO_2)	p.a., EMSURE®	Merck, Germany
Parthenolid	$\geq 97\%$	Calbiochem, Germany
PBS	Dulbecco's phosphate buffered saline	Biochrom AG, Germany
RPMI-Medium	RPMI 1640, 2,0 g/l NaHCO_3 : 500 ml	Biochrom AG, Germany
Sulfanilamid	99%	Sigma-Aldrich, Germany
Supplement mix für ECGM	23,5 ml	Provitro, Germany
Trypanblau	37%	Sigma-Aldrich, Germany
Trypsin/EDTA	Trypsin/EDTA-Solution (10x) 0,5%/0,2% in 10x PBS	Biochrom AG, Germany
Tumornekrosefaktor-alpha (TNF- α)	$\geq 97\%$, human, recombinant, <i>E. coli</i>	Sigma-Aldrich, Germany

Tabelle 39: Auflistung der in der vorliegenden Arbeit verwendeten zusammengesetzten Lösungen und Medien für die zellbiologischen Untersuchungen.

Abstoppmedium	M199: 500 ml FCS: 50 ml	
Collagen-Lösung	PBS: 500 ml Collagen G: 1,25 ml	
Endothelial Cell Growth Medium (ECGM) (gebrauchsfertig)	ECGM: 500 ml FCS, hitzeinaktiviert: 50 ml Supplement mix: 23,5 ml Antibiotics: 3,5 ml	
Fetales Kälberserum hitzeinaktiviert (FCS h.i.)	FCS superior, hitzeinaktiviert, 30 min bei 65 °C	Biochrom AG, Germany
Hoechst-Lösung	Hoechst 20 mM, 1:1200 in PBS	Sigma-Aldrich, Germany
RPMI-Medium (gebrauchsfertig)	RPMI 1640, 2,0 g/l NaHCO_3 : 500 ml FCS, hitzeinaktiviert: 50 ml L-Glutamin 200mM: 5,5 ml	Biochrom AG, Germany
Trypanblau-Lösung	0,4% (m/V) Trypanblau in PBS, sterilfiltriert	
Trypsin/EDTA-Lösung	Trypsin/EDTA-Solution (10x) 1:10 mit PBS verdünnt	Biochrom AG, Germany
Einfriermedium für HMEC	FCS: 5 ml ECGM: 4,2 ml DMSO: 0,8 ml	

G Literaturverzeichnis

- Acamovic, T.; Brooker, J. D. (2005): Biochemistry of plant secondary metabolites and their effects in animals. In: *Proceedings of the Nutrition Society* 64 (03), S. 403–412.
- Adam, K. P.; Zapp, J. (1998): Biosynthesis of the isoprene units of chamomile sesquiterpenes. In: *Phytochemistry* 48 (6), S. 953–959.
- Adam, K.-P.; Thiel, R.; Zapp, J.; Becker, H. (1998): Involvement of the mevalonic acid pathway and the glyceraldehyde–pyruvate pathway in terpenoid biosynthesis of the liverworts *Ricciocarpus natans* and *Conocephalum conicum*. In: *Archives of Biochemistry and Biophysics* 354 (1), S. 181–187.
- Ades, E. W.; Candal, F. J.; Swerlick, R. A.; George, V. G.; Summers, S.; Bosse, D. C.; Lawley, T. J. (1992): HMEC-1: establishment of an immortalized human microvascular endothelial cell line. In: *Journal of Investigative Dermatology* 99 (6), S. 683–690.
- Ahern, J. R.; Whitney, K. D. (2014): Stereochemistry affects sesquiterpene lactone bioactivity against an herbivorous grasshopper. In: *Chemoecology* 24 (1), S. 35–39.
- Ahmad, M.; Theofanidis, P.; Medford, R. M. (1998): Role of activating protein-1 in the regulation of the vascular cell adhesion molecule-1 gene expression by tumor necrosis factor- α . In: *Journal of Biological Chemistry* 273 (8), S. 4616–4621.
- Aichele, D.; Schwegler, H.-W. (2000): Die Blütenpflanzen Mitteleuropas. Unveränderte Sonderauflage der 2. überarbeiteten Auflage. 5 Bände. Stuttgart: Franckh-Kosmos Verlags-GmbH & Co. (Band 4).
- Akiyama, K.; Matsuzaki, K.; Hayashi, H. (2005): Plant sesquiterpenes induce hyphal branching in arbuscular mycorrhizal fungi. In: *Nature* 435 (7043), S. 824–827.
- Albert, A.; Sareedenchai, V.; H., W.; Seidlitz, H. K.; Zidorn, C. (2009): Temperature is the key to altitudinal variation of phenolics in *Arnica montana* L. cv. ARBO. In: *Oecologia* 160 (1), S. 1–8.
- Ammon, H.P.T.; Kaul, R. (1992): Kamille: Pharmakologie der Kamille und ihrer Inhaltsstoffe. In: *Deutsche Apotheker Zeitung* 132 (Supplement 27), S. 3–26.

Ammon, H.P.T.; Sabieraj, J.; Kaul, R. (1996): Kamille. Mechanismus der antiphlogistischen Wirkung von Kamillenextrakten und -inhaltsstoffen. In: *Deutsche Apotheker-Zeitung* 136 (22).

Apfelquist, W. L.; Moerman, D. E. (2011): Yarrow (*Achillea millefolium* L.): A neglected panacea? A review of ethnobotany, bioactivity, and biomedical research. In: *Economic Botany* 65 (2), S. 209–225.

Avallone, R.; Zanolli, P.; Puia, G.; Kleinschnitz, M.; Schreier, P.; Baraldi, M. (2000): Pharmacological profile of apigenin, a flavonoid isolated from *Matricaria chamomilla*. In: *Biochemical Pharmacology* 59 (11), S. 1387–1394.

Baldwin, I. T.; Karb, M. J.; Callahan, P. (1993): Foliar and floral pyrethrins of *Chrysanthemum cinerariaefolium* are not induced by leaf damage. In: *Journal of Chemical Ecology* 19 (9), S. 2081–2087.

Banh-Nhu, C.; Gács-Baitz, E.; Radics, L.; Tamás, J.; Ujszászy, K.; Verzár-Petri, G. (1979): Achillicin, the first proazulene from *Achillea millefolium*. In: *Phytochemistry* 18 (2), S. 331–332.

Barnes, P. J. (1997): Nuclear factor-κB. In: *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology* 29 (6), S. 867–870.

Barquera-Lozada, J. E.; Cuevas, G. (2008): Biogenesis of sesquiterpene lactones pseudoguaianolides from germacranoïdides: theoretical study on the reaction mechanism of terminal biogenesis of 8-epiconfertin. In: *The Journal of Organic Chemistry* 74 (2), S. 874–883.

Beg, A. A.; Baldwin, A. S. (1993): The I kappa B proteins: multifunctional regulators of Rel/NF-kappa B transcription factors. In: *Genes & Development* 7 (11), S. 2064–2070.

Beg, A. A.; Finco, T. S.; Nantermet, P. V.; Baldwin, A. S. (1993): Tumor necrosis factor and interleukin-1 lead to phosphorylation and loss of I kappa B alpha: a mechanism for NF-kappa B activation. In: *Molecular and Cellular Biology* 13 (6), S. 3301–3310.

Beg, A. A.; Ruben, S. M.; Scheinman, R. I.; Haskill, S.; Rosen, C. A.; Baldwin, A. S. (1992): I kappa B interacts with the nuclear localization sequences of the subunits of NF-kappa B: a mechanism for cytoplasmic retention. In: *Genes & Development* 6 (10), S. 1899–1913.

Benedek, B.; Gjoncaj, N.; Saukel, J.; Kopp, B. (2007a): Distribution of phenolic compounds in middleeuropean taxa of the *Achillea millefolium* L. aggregate. In: *Chemistry & Biodiversity* 4 (5), S. 849–857.

Benedek, B.; Kopp, B. (2007): *Achillea millefolium* L. s.l. revisited: Recent findings confirm the traditional use. In: *Wiener Medizinische Wochenschrift* 157 (13-14), S. 312–314.

Benedek, B.; Kopp, B.; Melzig, M. F. (2007b): *Achillea millefolium* L. s.l. – Is the anti-inflammatory activity mediated by protease inhibition? In: *Journal of Ethnopharmacology* 113 (2), S. 312–317.

Bhaskaran, N.; Shukla, S.; Srivastava, J. K.; Gupta, S. (2010): Chamomile: an anti-inflammatory agent inhibits inducible nitric oxide synthase expression by blocking RelA/p65 activity. In: *International Journal of Molecular Medicine* 26 (6), S. 935–940.

Bogdan, C. (2001): Nitric oxide and the immune response. In: *Nature Immunology* 2 (10), S. 907–916.

Bohlmann, J.; Keeling, C. I. (2008): Terpenoid biomaterials. In: *The Plant Journal* 54 (4), S. 656–669.

Bouwmeester, H. J.; Roux, C.; Lopez-Raez, J. A.; Becard, G. (2007): Rhizosphere communication of plants, parasitic plants and AM fungi. In: *Trends in Plant Science* 12 (5), S. 224–230.

Bracher, F.; Heisig, P.; Langguth, P.; Mutschler, E.; Rücker, G.; Scriba, B.; Stahl-Biskup, E. (2004): Kommentar zum Europäischen Arzneibuch. 12. Lfg. 1999. Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft/GOVI-Verlag, Stuttgart/Frankfurt.

Bresinsky, A.; Körner, Ch; Kadereit, J. W.; Neuhaus, G.; Sonnewald, U. (2008): Strasburger, Lehrbuch der Botanik. 36. Aufl. Heidelberg: Spektrum Akademischer Verlag.

Bruelheide, H.; Scheidel, U. (1999): Slug herbivory as a limiting factor for the geographical range of *Arnica montana*. In: *Journal of Ecology* 87 (5), S. 839–848.

Buchanan, B. B.; Grussem, W.; Jones, R. L. (2000): Biochemistry & molecular biology of plants: American Society of Plant Physiologists Rockville.

- Burk, D. R.; Cichacz, Z. A.; Daskalova, S. M. (2010): Aqueous extract of *Achillea millefolium* L. (Asteraceae) inflorescences suppress lipopolysaccharide-induced inflammatory responses in RAW 264.7 murine macrophages. In: *Journal of Medicinal Plants Research* 4 (3), S.225-234.
- Burnett Jr, W. C.; Jones Jr, S. B.; Mabry, T. J.; Padolina, W. G. (1974): Sesquiterpene lactones—Insect feeding deterrents in *Vernonia*. In: *Biochemical Systematics and Ecology* 2 (1), S. 25–29.
- Candan, F.; Unlu, M.; Tepe, B.; Daferera, D.; Polissiou, M.; Sökmen, A.; Akpulat, H. A. (2003): Antioxidant and antimicrobial activity of the essential oil and methanol extracts of *Achillea millefolium* subsp. *millefolium* Afan. (Asteraceae). In: *Journal of Ethnopharmacology* 87 (2), S. 215–220.
- Carle, R. (2007): *Chamomilla*. In: Blaschek, W., Ebel, S., Hackenthal, E., Holzgrabe, U., Keller, K., Reichling, J., Schulz, V. (Hg): *Hagers Enzyklopädie der Drogen und Arzneistoffe*, 6. neu bearbeitete und ergänzte Auflage Stuttgart: Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft.
- Cekan, Z.; Herout, V.; Sorm, F. (1954): On Terpenes. 62. Isolation and properties of the pro-chamazulene from *Matricaria chamomilla* L., a further compound of the guaianolide group. In: *Collection of Czechoslovak Chemical Communications* 19 (4), S. 798–804.
- Chadwick, M.; Trewin, H.; Gawthrop, F.; Wagstaff, C. (2013): Sesquiterpenoids lactones: benefits to plants and people. In: *International Journal of Molecular Sciences* 14 (6), S. 12780–12805.
- Chan, E. L.; Murphy, J. T. (2003): Reactive oxygen species mediate endotoxin-induced human dermal endothelial NF-κB activation. In: *Journal of Surgical Research* 111 (1), S. 120–126.
- Chandler, R. F.; Hooper, S. N.; Harvey, Mh J. (1982): Ethnobotany and phytochemistry of yarrow, *Achillea millefolium*, *Compositae*. In: *Economic Botany* 36 (2), S. 203–223.
- Chavakis, E.; Choi, E. Y.; Chavakis, T. (2009): Novel aspects in the regulation of the leukocyte adhesion cascade. In: *Thromb Haemost* 102, S. 191–197.
- Cheng, A.-X.; Lou, Y.-G.; Mao, Y.-B.; Lu, S.; Wang, L.-J.; Chen, X.-Y. (2007): Plant terpenoids: biosynthesis and ecological functions. In: *Journal of Integrative Plant Biology* 49 (2), S. 179–186.

- Cho, J. Y.; Baik, K. U.; Jung, J. H.; Park, M. H. (2000): In vitro anti-inflammatory effects of cynaropicrin, a sesquiterpene lactone, from *Saussurea lappa*. In: *European Journal of Pharmacology* 398 (3), S. 399–407.
- Choudhary, M. I.; Jalil, S.; Todorova, M.; Trendafilova, A.; Mikhova, B.; Duddeck, H.; Atta-ur-Rahman (2007): Inhibitory effect of lactone fractions and individual components from three species of the *Achillea millefolium* complex of Bulgarian origin on the human neutrophils respiratory burst activity. In: *Natural Product Research* 21 (11), S. 1032–1036.
- Clancy, R. M.; Amin, A. R.; Abramson, S. B. (1998): The role of nitric oxide in inflammation and immunity. In: *Arthritis & Rheumatism* 41 (7), S. 1141–1151.
- Colasanti, M.; Persichini, T. (2000): Nitric oxide: an inhibitor of NF-κB/Rel system in glial cells. In: *Brain Research Bulletin* 52 (3), S. 155–161.
- Coldea, G.; Stoica, I.-A.; Puşcaş, M.; Ursu, T.; Oprea, A. (2009): Alpine–subalpine species richness of the Romanian Carpathians and the current conservation status of rare species. In: *Biodiversity and Conservation* 18 (6), S. 1441–1458.
- Cronstein, B. N.; Weissmann, G. (1993): The adhesion molecules of inflammation. In: *Arthritis & Rheumatism* 36 (2), S. 147–157.
- Csupor-Löffler, B.; Hajdú, Z.; Zupkó, I.; Réthy, B.; Falkay, G.; Forgo, P.; Hohmann, J. (2009): Antiproliferative effect of flavonoids and sesquiterpenoids from *Achillea millefolium* s.l. on cultured human tumour cell lines. In: *Phytotherapy Research* 23 (5), S. 672–676.
- Dall'Acqua, S.; Bolego, C.; Cignarella, A.; Gaion, R. M.; Innocenti, G. (2011): Vasoprotective activity of standardized *Achillea millefolium* extract. In: *Phytomedicine* 18 (12), S. 1031–1036.
- Danert, S.; Fukarek, F. (1994): Urania-Pflanzenreich: Blütenpflanzen 2. 1. Aufl.: Urania-Verlag (Band 4).
- de Kraker, J.-W.; Franssen, M. C. R.; Joerink, M.; Groot, A. de; Bouwmeester, H. J. (2002): Biosynthesis of costunolide, dihydrocostunolide, and leucodin. Demonstration of cytochrome P450-catalyzed formation of the lactone ring present in sesquiterpene lactones of chicory. In: *Plant Physiology* 129 (1), S. 257–268.
- Degenhardt, J.; Köllner, T. G.; Gershenzon, J. (2009): Monoterpene and sesquiterpene synthases and the origin of terpene skeletal diversity in plants. In: *Phytochemistry* 70 (15), S. 1621–1637.

- Delerive, P.; Bosscher, K. de; Besnard, S.; Berghe, W. V.; Peters, J. M.; Gonzalez, F. J. et al. (1999): Peroxisome proliferator-activated receptor α negatively regulates the vascular inflammatory gene response by negative cross-talk with transcription factors NF- κ B and AP-1. In: *Journal of Biological Chemistry* 274 (45), S. 32048–32054.
- Della Loggia, R.; Carle, R.; Sosa, S.; Tubaro, A. (1990): Evaluation of the anti-inflammatory activity of chamomile preparations Pl. In: *Planta Medica* 56, S. 657–658.
- Della Loggia, R.; Sosa, S.; Tubaro, A.; Kastner, U.; Jurenitsch, J. (1992): Anti-inflammatory principles from *Achillea asplenifolia* and *Achillea pratensis*. In: *Planta Medica* 58 (S1), S. 641.
- Devoto, A.; Ellis, C.; Magusin, A.; Chang, H.-S.; Chilcott, C.; Zhu, T.; Turner, J. G. (2005): Expression profiling reveals COI1 to be a key regulator of genes involved in wound-and methyl jasmonate-induced secondary metabolism, defence, and hormone interactions. In: *Plant Molecular Biology* 58 (4), S. 497–513.
- Dierschke, H. (1994): Pflanzensoziologie: Grundlagen und Methoden. Stuttgart: Ulmer.
- Dingermann, T.; Hiller, K.; Schneider, G.; Zündorf, I. (2004): Arzneidrogen. 5. Aufl. Heidelberg: Spektrum Akademischer Verlag.
- Dirsch, V. M.; Stuppner, H.; Ellmerer-Müller, E. P.; Vollmar, A. M. (2000): Structural requirements of sesquiterpene lactones to inhibit LPS-induced nitric oxide synthesis in RAW 264.7 macrophages. In: *Bioorganic & Medicinal Chemistry* 8 (12), S. 2747–2753.
- Drew, D. P.; Krichau, N.; Reichwald, K.; Simonsen, H. T. (2009): Guaianolides in Apiaceae: perspectives on pharmacology and biosynthesis. In: *Phytochemistry Reviews* 8 (3), S. 581–599.
- Drew, D. P.; Rasmussen, S. K.; Avato, P.; Simonsen, H. T. (2012): A Comparison of Headspace Solid-phase Microextraction and Classic Hydrodistillation for the Identification of Volatile Constituents from *Thapsia* spp. Provides Insights into Guaianolide Biosynthesis in Apiaceae. In: *Phytochemical Analysis* 23 (1), S. 44–51.
- Dubey, V. S.; Bhalla, R.; Luthra, R. (2003): An overview of the non-mevalonate pathway for terpenoid biosynthesis in plants. In: *Journal of Biosciences* 28 (5), S. 637–646.
- Dudareva, N.; Klempien, A.; Muhlemann, J. K.; Kaplan, I. (2013): Biosynthesis, function and metabolic engineering of plant volatile organic compounds. In: *New Phytologist* 198 (1), S. 16–32.

Düll, R.; Kutzelnigg, H. (2011): Taschenlexikon der Pflanzen Deutschlands und angrenzender Länder. 7. Aufl. Wiebelsheim: Quelle und Meyer.

Ebert, M.; Merfort, I.; Willuhn, G. (1988): Flavonoid distribution in *Arnica* subgenera *montana* and *austromontana*. In: *Phytochemistry* 27 (12), S. 3849–3851.

Ebner, F. H.; Darra, E.; Mariotto, S.; Suzuki, H.; Cavalieri, E. (2011): Use of STAT1 inhibitors in the treatment of brain I/R injury and neurodegenerative diseases. In: *Central Nervous System Agents in Medicinal Chemistry* 11 (1), S. 2–7.

Eglseer, K.; Jurenitsch, J.; Korhammer, S.; Haslinger, E.; Kubelka, W.; Franz, C. (1990): Structures of the main alpha-methylene-gamma-lactones from *Achillea setacea*. In: *Planta Medica* 56, S. 531.

Ehrendorfer, F.; Guo, Y.-P. (2006): Multidisciplinary studies on *Achillea* sensu lato (*Compositae-Anthemideae*): new data on systematics and phylogeography. In: *Willdenowia-Annals of the Botanic Garden and Botanical Museum Berlin-Dahlem* 36 (1), S. 69–87.

Ellenberg, H. (1979): Zeigerwerte der Gefäßpflanzen Mitteleuropas. 2. Aufl. Göttingen: Scripta Geobotanica IX.

Ellenberg, H. (1986): Vegetation Mitteleuropas mit den Alpen in ökologischer Sicht. 4. Aufl. Stuttgart: Ulmer.

Europäisches Arzneibuch (2011): 7. Ausgabe. Grundwerk 2011. Band 1. Stuttgart: Deutscher Apotheker Verlag.

Fang, S.-H.; Hou, Y.-C.; Chang, W.-C.; Hsiu, S.-L.; Lee Chao, P.-D.; Chiang, B.-L. (2003): Morin sulfates/glucuronides exert anti-inflammatory activity on activated macrophages and decreased the incidence of septic shock. In: *Life Sciences* 74 (6), S. 743–756.

Fischer, U.; Vetter, S.; Novak, J.; Glasl, S.; Saukel, J.; Franz, C. (2001): Inheritance of the sesquiterpenes longipinenone and hydroxy-longipinenone within the *Achillea millefolium* complex (*Compositae*). In: *Plant Breeding* 120 (3), S. 251–254.

Flaskamp, E.; Zimmermann, G.; Nonnenmacher, G.; Isaac, O. (1982): Untersuchungen zur Charakterisierung des Prochamazulens Matricin aus *Matricaria chamomilla* L. In: *Zeitschrift für Naturforschung* (37b), S. 508–511.

Flemming, M. (2008): Populationsgenetische und chemo-ökologische Untersuchungen an *Humulus lupulus* L. in Ostbayern. Diplomarbeit. Universität Regensburg. Lehrstuhl für Botanik, Lehrstuhl für Pharmazeutische Biologie.

Flemming, M.; Heilmann, J. (2014): Nachhaltiger Anbau und Schutz von *Arnica montana* L. in Maramures (Rumänien). In: *Zeitschrift für Arznei- und Gewürzpflanzen* 1 (19), S. 52–53.

Fraga, B. M. (2005): Natural sesquiterpenoids. In: *Natural Product Reports* 22 (4), S. 465–486.

Frohne, D.; Jensen, U. (1998): Systematik des Pflanzenreichs. Unter besonderer Berücksichtigung chemischer Merkmale und pflanzlicher Drogen. 5. Aufl. Stuttgart: Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft mbH.

Galindo, J. C. G.; de Luque, A. P.; Jorrín, J.; Macías, F. A. (2002): SAR studies of sesquiterpene lactones as *Orobanche cumana* seed germination stimulants. In: *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 50 (7), S. 1911–1917.

Ganadera, M.; Egger, C.; Zidorn, C.; Stuppner, H. (2008): Quantitative analysis of flavonoids and phenolic acids in *Arnica montana* L. by micellar electrokinetic capillary chromatography. In: *Analytica Chimica Acta* 614 (2), S. 196–200.

García-Pineres, A. J.; Lindenmeyer, M. T.; Merfort, I. (2004): Role of cysteine residues of p65/NF-κB on the inhibition by the sesquiterpene lactone parthenolide and N-ethyl maleimide, and on its transactivating potential. In: *Life Sciences* 75 (7), S. 841–856.

Gershenzon, J.; Dudareva, N. (2007): The function of terpene natural products in the natural world. In: *Nature Chemical Biology* 3 (7), S. 408–414.

Gertsch, J.; Sticher, O.; Schmidt, T.; Heilmann, J. (2003): Influence of helenanolide-type sesquiterpene lactones on gene transcription profiles in Jurkat T cells and human peripheral blood cells: anti-inflammatory and cytotoxic effects. In: *Biochemical Pharmacology* 66 (11), S. 2141–2153.

Ghassemi-Dehkordi, N. (1988): Analytik, Radioisotopenmarkierung und Pharmakokinetik von Matricin und Spiroäthern aus *Matricaria recutita* L. Dissertation. Phillips-Universität, Marburg. Pharmazie und Lebensmittelchemie.

Glasl, S.; Gunbilek, D.; Narantuya, S.; Werner, I.; Jurenitsch, J. (2001a): Combination of chromatographic and spectroscopic methods for the isolation and characterization of polar guianolides from *Achillea asiatica*. In: *Journal of Chromatography A* 936 (1-2), S. 193–200.

Glasl, S.; Kastner, U.; Jurenitsch, J.; Kubelka, W. (1999a): Qualitative and quantitative determination of sesquiterpenoids in *Achillea* species by reversed-phase high-performance liquid chromatography, mass-spectrometry and thin-layer chromatography. In: *Journal of Chromatography B: Biomedical Sciences and Applications* 729 (1-2), S. 361–368.

Glasl, S.; Mucaji, P.; Werner, I.; Presser, A.; Jurenitsch, J. (2002): Sesquiterpenes and Flavonoid Glycones from a Hungarian Taxon of the *Achillea millefolium* Group. In: *Zeitschrift für Naturforschung* (57c), S. 976–982.

Glasl, S.; Presser, A.; Gunbilig, D.; Werner, I.; Narantuya, S.; Haslinger, E. et al. (2001b): Highly hydroxylated guaianolides of *Achillea asiatica* and Middle European *Achillea* species. In: *Phytochemistry* 58 (8), S. 1189–1194.

Glasl, S.; Presser, A.; Werner, I.; Wawrosch, Ch.; Kastner, U.; Jurenitsch, J. et al. (1999b): Two proazulenes from *Achillea ceretanica* Sennen. In: *Phytochemistry* 50 (4), S. 629–631.

Goldberg, A. S.; Mueller, E. C.; Eigen, E.; Desalva, S. J. (1969): Isolation of the anti-inflammatory principles from *Achillea millefolium* (*Compositae*). In: *Journal of Pharmaceutical Sciences* 58 (8), S. 938–941.

Gomaa, A.; Hashem, T.; Mohamed, M.; Ashry, E. (2003): *Matricaria chamomilla* extract inhibits both development of morphine dependence and expression of abstinence syndrome in rats. In: *Journal of Pharmacological Sciences* 92 (1), S. 50–55.

Gonzalez-Coloma, A.; Bailen, M.; Diaz, C. E.; Fraga, B. M.; Martínez-Díaz, R.; Zuñiga, G. E. et al. (2012): Major components of Spanish cultivated *Artemisia absinthium* populations: antifeedant, antiparasitic, and antioxidant effects. In: *Industrial Crops and Products* 37 (1), S. 401–407.

Guo, Y.-P.; Saukel, J.; Ehrendorfer, F. (2008): AFLP trees versus scatterplots: evolution and phylogeography of the polyploid complex *Achillea millefolium* agg. (Asteraceae). In: *Taxon* 57 (1), S. 153–169.

Gupta, V.; Mittal, P.; Bansal, P.; Khokra, S. L.; Kaushik, D. (2010): Pharmacological potential of *Matricaria recutita*- a review. In: *International Journal of Pharmaceutical Science and Drug Research* 2, S. 12–16.

Guzik, T.; Korbut, R.; Adamek-Guzik, T. (2003): Nitric oxide and superoxide in inflammation. In: *Journal of Physiology and Pharmacology* 54, S. 469–487.

- Han, J. W.; Lee, B. G.; Kim, Y. K.; Jong, W. Y.; Hye, K. J.; Sungyoul, H. et al. (2001): Ergolide, sesquiterpene lactone from *Inula britannica*, inhibits inducible nitric oxide synthase and cyclo-oxygenase-2 expression in RAW 264.7 macrophages through the inactivation of NF-κB. In: *British Journal of Pharmacology* 133 (4), S. 503–512.
- Hänsel, R.; Sticher, O. (2007): Pharmakognosie-Phytopharmazie. 8. Aufl. Heidelberg: Springer Medizin Verlag.
- Harborne, J. B. (1995): Ökologische Biochemie: Eine Einführung. Heidelberg, Berlin, Oxford: Spektrum Akademischer Verlag.
- Harborne, J. B. (1997): Recent advances in chemical ecology. In: *Natural Product Reports* 14 (2), S. 83–98.
- Hartmann, T. (2004): Plant-derived secondary metabolites as defensive chemicals in herbivorous insects: a case study in chemical ecology. In: *Planta* 219 (1), S. 1–4.
- Hartmann, T. (2007): From waste products to ecochemicals: fifty years research of plant secondary metabolism. In: *Phytochemistry* 68 (22), S. 2831–2846.
- Hausen, B. M.; Breuer, J.; Weglewski, J.; Rücker, G. (1991): α-Peroxyachifolid and other new sensitizing sesquiterpene lactones from yarrow (*Achillea millefolium* L., *Compositae*). In: *Contact Dermatitis* 24 (4), S. 274–280.
- Hayden, M. S.; Ghosh, S. (2004): Signaling to NF-κB. In: *Genes & Development* 18 (18), S. 2195–2224.
- Hazra, B.; Biswas, S.; Mandal, N. (2008): Antioxidant and free radical scavenging activity of *Spondias pinnata*. In: *BMC Complementary and Alternative Medicine* 8 (1), S. 63.
- Hegi, G. (1954): Illustrierte Flora von Mitteleuropa: Band IV, 2. Teil. München: Carl Hanser Verlag.
- Hehner, S. P.; Hofmann, T. G.; Dröge, W.; Schmitz, M. L. (1999): The antiinflammatory sesquiterpene lactone parthenolide inhibits NF-κB by targeting the IκB kinase complex. In: *The Journal of Immunology* 163 (10), S. 5617–5623.
- Heilmann, J.; Wasescha, M. R.; Schmidt, T. J. (2001): The influence of glutathione and cysteine levels on the cytotoxicity of helenanolide type sesquiterpene lactones against KB cells. In: *Bioorganic & Medicinal Chemistry* 9 (8), S. 2189–2194.

Herms, D. A.; Mattson, W. J. (1992): The dilemma of plants: to grow or defend. In: *Quarterly Review of Biology*, S. 283–335.

Heubner, W.; Albath, W. (1939): Über die entzündungswidrige Wirkung des Rein-Azulens aus *Matricaria chamomilla* L. In: *Naunyn-Schmiedebergs Archiv für experimentelle Pathologie und Pharmakologie* 192 (2-5), S. 383–388.

Heubner, W.; Grabe, F. (1933): Über die entzündungswidrige Wirkung des Kamillenöls. In: *Naunyn-Schmiedebergs Archiv für experimentelle Pathologie und Pharmakologie* 171 (1), S. 329–339.

Hitziger, T.; Höll, P.; Ramadan, M.; Dettmering, D.; Immig, P.; Hempel, B. (2003): Die alte junge Kamille. In: *Pharmazeutische Zeitung* 148, S. 372–380.

Hoffmann, A. A.; Sgrò, C. M. (2011): Climate change and evolutionary adaptation. In: *Nature* 470 (7335), S. 479–485.

Hofmann, L.; Fritz, D.; Nitz, S.; Kollmannsberger, H.; Drawert, F. (1992): Essential oil composition of three polyploids in the *Achillea millefolium*‘complex’. In: *Phytochemistry* 31 (2), S. 537–542.

Holub, M.; Buděšínský, M. (1986): Sesquiterpene lactones of the Umbelliferae. In: *Phytochemistry* 25 (9), S. 2015–2026.

Holub, M.; Toman, J.; Herout, V. (1987): The phylogenetic relationships of the *Asteraceae* and *Apiaceae* based on phytochemical characters. In: *Biochemical Systematics and Ecology* 15 (3), S. 321–326.

Hoppe, B. (2012): Handbuch des Arznei- und Gewürzpflanzenbaus. Bernburg: Eigenverlag des Vereins für Arznei- und Gewürzpflanzen SALUPLANTA e.V. (Band 4)

Howe, G. A.; Jander, G. (2008): Plant immunity to insect herbivores. In: *Annual Reviews of Plant Biology* 59, S. 41–66.

Huo, C.-H.; Li, Y.; Zhan, M.-L.; Wang, Y.-F.; Zhang, Q.; Qin, F.; Shi, Q.-W.; Kiyota, H. (2013): Cytotoxic flavonoids from the flowers of *Achillea millefolium*. In: *Chemistry of Natural Compounds* 6 (48).

- Imming, P.; Goeters, S.; Pawlitzki, G.; Hempel, B. (2001): Absolute stereochemistry of guaianolides, of matricin and its epimers, of yarrow proazulenes, and of chamazulene carboxylic acid. In: *Chirality* 13 (7), S. 337–341.
- Jaiswal, R.; Kuhnert, N. (2011): Identification and characterization of two new derivatives of chlorogenic acids in Arnica (*Arnica montana* L.) flowers by high-performance liquid chromatography/tandem mass spectrometry. In: *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 59 (8), S. 4033–4039.
- Jakovlev, V.; Isaac, O.; Flaskamp, E. (1983): Pharmakologische Untersuchungen von Kamillen-Inhaltsstoffen. In: *Planta Medica* 49 (10), S. 67–73.
- Janecke, H.; Weisser, W. (1964): Polysaccharides from camomile flowers. V. Structure elucidation (general and physicochemical methods). In: *Planta Medica* 12 (4), S. 528–540.
- Jin, M.; Lee, H. J.; Ryu, J. H.; Chung, K. S. (2000): Inhibition of LPS-induced NO production and NF-κB activation by a sesquiterpene from *Saussurea lappa*. In: *Archives of Pharmacal Research* 23 (1), S. 54–58.
- Jing, F.; Zhang, L.; Li, M.; Tang, Y.; Wang, Y.; Wang, Q. et al. (2009): Abscisic acid (ABA) treatment increases artemisinin content in *Artemisia annua* by enhancing the expression of genes in artemisinin biosynthetic pathway. In: *Biologia* 64 (2), S. 319–323.
- Jurenitsch, J. (2007): *Achillea*. In: Blaschek, W., Ebel, S., Hackenthal, E., Holzgrabe, U., Keller, K., Reichling, J., Schulz, V. (Hg): *Hagers Enzyklopädie der Drogen und Arzneistoffe*, 6. neu bearbeitete und ergänzte Auflage Stuttgart: Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft.
- Kadereit, J. W.; Jeffrey, C. (2007): Flowering plants. Asterales. Berlin: Springer (The families and genera of vascular plants, 8).
- Karin, M.; Liu, Z.-g.; Zandi, E. (1997): AP-1 function and regulation. In: *Current Opinion in Cell Biology* 9 (2), S. 240–246.
- Kastner, U.; Glasl, S.; Jurenitsch, J.; Kubelka, W. (1992a): Isolation and structure elucidation of the main proazulenes of the cultivar *Achillea collina* "Proa". In: *Planta Medica* 58.
- Kastner, U.; Jurenitsch, J.; Baumann, A.; Robien, W.; Kubelka, W. (1991a): Three unusual 3-oxa-guaianolides from *Achillea roseo-alba* Ehrend. and *Achillea collina* Becker. In: *Pharmaceutical and Pharmacological Letters* 1, S. 55–56.

Kastner, U.; Jurenitsch, J.; Glasl, S.; Baumann, A.; Robien, W.; Kubelka, W. (1991b): The major proazulenes of *Achillea roseo-alba* Ehrend. In: *Pharmaceutical and Pharmacological Letters* 1, S. 53–54.

Kastner, U.; Jurenitsch, J.; Glasl, S.; Baumann, A.; Robien, W.; Kubelka, W. (1992b): Proazulenes from *Achillea asplenifolia*. In: *Phytochemistry* 31 (12), S. 4361–4362.

Kastner, U.; Jurenitsch, J.; Lehner, S.; Baumann, A.; Robien, W.; Kubelka, W. (1991c): The major proazulenes from *Achillea collina* Becker: a revision of structure. In: *Pharmaceutical and Pharmacological Letters* 1, S. 27–28.

Kastner, U.; Saukel, J.; Zitterl-Eglseer, K.; Länger, R.; Reznicek, G.; Jurenitsch, J.; Kubelka, W. (1992c): Ätherisches Öl - ein zusätzliches Merkmal für die Charakterisierung der mitteleuropäischen Taxa der *Achillea millefolium*-Gruppe. In: *Journal of Pharmaceutical Sciences* 60, S. 87–99.

Kastner, U.; Sosa, S.; Tubaro, A.; Breuer, J.; Rücker, G.; Loggia, R.; Jurenitsch, J. (1993): anti-edematous activity of sesquiterpene lactones from different taxa of the *Achillea millefolium* group. In: *Planta Medica* 59 (S 1), S. A669.

Kasymov, S. Z.; Sidyakin, G. P. (1972): Lactones of *Achillea millefolium*. In: *Chemistry of Natural Compounds* 8 (2), S. 246.

Kathe, W. (2006): Conservation of Eastern-European medicinal plants: *Arnica montana* in Romania. In: Bogers R.J., Craker, L.E. and Lange, D. (eds.), *Medicinal and Aromatic Plants*, 203–211. Springer.

Kirby, J.; Keasling, J. D. (2009): Biosynthesis of plant isoprenoids: perspectives for microbial engineering. In: *Annual Review of Plant Biology* 60, S. 335–355.

Knapp, R. (1953): Über die natürliche Verbreitung von *Arnica montana* L. und ihre Entwicklungsmöglichkeit auf verschiedenen Böden. In: *Bericht der Deutschen Botanischen Gesellschaft* (66), S. 168–179.

Knuth, S. (2013): Pharmakologische und pharmakokinetische Untersuchungen zu Salicylalkoholderivaten aus *Salicis cortex*. Dissertation. Universität Regensburg. Lehrstuhl für Pharmazeutische Biologie.

Koch, K. (1942): Untersuchungen über den Azulengehalt der Flores Chamomillae und der daraus hergestellten pharmazeutischen Zubereitungen. In: *Archiv der Pharmazie* 280 (12), S. 424–442.

Konovalov, D. A.; Chelombit'ko, V. A. (1991): Sesquiterpene lactones from *Achillea millefolium*. In: *Chemistry of Natural Compounds* 27 (5), S. 640–641.

Kováčik, J.; Grúz, J.; Hedbavny, J.; Klejdus, B.; Strnad, M. (2009): Cadmium and nickel uptake are differentially modulated by salicylic acid in *Matricaria chamomilla* plants. In: *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 57 (20), S. 9848–9855.

Kresken, J.; Willuhn, G. (1983): Ein weiteres Helenalin-Derivat aus *Arnica montana* mit bisher nicht beschriebener Konfiguration. In: *Pharmazeutische Zeitung* 128, S. 1610–1611.

Kubelka, W.; Kastner, U.; Glasl, S.; Saukel, J.; Jurenitsch, J. (1999): Chemotaxonomic relevance of sesquiterpenes within the *Achillea millefolium* group. In: *Biochemical Systematics and Ecology* 27 (4), S. 437–444.

Lange, B. M.; Turner, G. W. (2013): Terpenoid biosynthesis in trichomes—current status and future opportunities. In: *Plant Biotechnology Journal* 11 (1), S. 2–22.

Laroux, F. S.; Pavlick, K. P.; Hines, I. N.; Kawachi, S.; Harada, H.; Bharwani, S. et al. (2001): Role of nitric oxide in inflammation. In: *Acta Physiologica Scandinavica* 173 (1), S. 113–118.

Lee, H. J.; Kim, N. Y.; Jang, M. K.; Son, H. J.; Kim, K. M.; Sohn, D. H. et al. (1999): A sesquiterpene, dehydrocostus lactone, inhibits the expression of inducible nitric oxide synthase and TNF- α in LPS-activated macrophages. In: *Planta Medica* 65 (02), S. 104–108.

Ley, K.; Laudanna, C.; Cybulsky, M. I.; Nourshargh, S. (2007): Getting to the site of inflammation: the leukocyte adhesion cascade updated. In: *Nature Reviews Immunology* 7 (9), S. 678–689.

Li, Y.; Zhang, M.-L.; Cong, B.; Wang, S.-M.; Dong, M.; Sauriol, F. et al. (2011): Achillinin A, a cytotoxic guaianolide from the flower of Yarrow, *Achillea millefolium*. In: *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry* 75 (8), S. 1554–1556.

Li, Y.; Zhu, M.-C.; Zhang, M.-L.; Wang, Y.-F.; Dong, M.; Shi, Q.-W. et al. (2012): Achillinin B and C, new sesquiterpene dimers isolated from *Achillea millefolium*. In: *Tetrahedron Letters* 53 (21), S. 2601–2603.

Lottspeich, F.; Engels, J. W. (2006): Bioanalytik. 2. Aufl. Heidelberg: Spektrum, Akademischer Verlag.

Lowenstein, C. J.; Alley, E. W.; Raval, P.; Snowman, A. M.; Snyder, S. H.; Russell, S. W.; Murphy, W. J. (1993): Macrophage nitric oxide synthase gene: two upstream regions mediate induction by interferon gamma and lipopolysaccharide. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences* 90 (20), S. 9730–9734.

Luo, J.-L.; Kamata, H.; Karin, M. (2005): IKK/NF-κB signaling: balancing life and death—a new approach to cancer therapy. In: *Journal of Clinical Investigation* 115 (10), S. 2625–2632.

Luppold, E. (1984): *Matricaria chamomilla*—eine alte und neue Arzneipflanze. In: *Pharmazie in unserer Zeit* 13 (3), S. 65–70.

Lyss, G.; Glasl, S.; Jurenitsch, J.; Pahl, H. L.; Merfort, I. (2000): A sesquiterpene and sesquiterpene lactones from the *Achillea millefolium* group possess antiinflammatory properties but do not inhibit the transcription factor NF-κB. In: *Pharmaceutical and Pharmacological Letters* 10 (1), S. 13–15.

Lyss, G.; Schmidt, T. J.; Merfort, I.; Pahl, H. L. (1997): Helenalin, an anti-inflammatory sesquiterpene lactone from *Arnica*, selectively inhibits transcription factor NF-κB. In: *Biological Chemistry* 378 (9), S. 951–962.

Marchese, J. A.; Rehder, V. L.G. (2001): The influence of temperature in the production of artemisinin in *Artemisia annua* L. In: *Brazilian Journal of Medicinal Plants* 4, S. 89–93.

Marian, M.; Săudan, L. (2003): Some protected species of plants in the Maramures County (Romania). In: *Cluj-Napoca: Contributii Botanice, XXXVIII* (2), S. 183–186.

Maschi, O.; Cero, E. D.; Galli, G. V.; Caruso, D.; Bosisio, E.; Dell'Agli, M. (2008): Inhibition of human cAMP-phosphodiesterase as a mechanism of the spasmolytic effect of *Matricaria recutita* L. In: *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 56 (13), S. 5015–5020.

Maswadeh, H. M.; Semreen, M. H.; Naddaf, A. R. (2006): Anti-inflammatory activity of *Achillea* and *Ruscus* topical gel on carrageenan-induced paw edema in rats. In: *Acta poloniae pharmaceutica* 63, S. 277–280.

Mathema, V. B.; Koh, Y.-S.; Thakuri, B. C.; Sillanpää, M. (2012): Parthenolide, a sesquiterpene lactone, expresses multiple anti-cancer and anti-inflammatory activities. In: *Inflammation* 35 (2), S. 560–565.

McGarvey, D. J.; Croteau, R. (1995): Terpenoid metabolism. In: *The Plant Cell* 7 (7), S. 1015–1026.

McKay, D. L.; Blumberg, J. B. (2006): A review of the bioactivity and potential health benefits of chamomile tea (*Matricaria recutita* L.). In: *Phytotherapy Research* 20 (7), S. 519–530.

Merfort, I. (1992): Caffeoylquinic acids from flowers of *Arnica montana* and *Arnica chamissonis*. In: *Phytochemistry* 31 (6), S. 2111–2113.

Merfort, I. (2007): *Arnica*. In: Blaschek, W., Ebel, S., Hackenthal, E., Holzgrabe, U., Keller, K., Reichling, J., Schulz, V. (Hg): *Hagers Enzyklopädie der Drogen und Arzneistoffe*, 6. neu bearbeitete und ergänzte Auflage Stuttgart: Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft.

Michler, B.; Preitschopf, A.; Erhard, P.; Arnold, C. G. (1992): *Achillea millefolium*: Zusammenhänge zwischen Standortfaktoren, Ploidiegrad, Vorkommen von Proazulen und Gehalt an Chamazulen im ätherischen Öl. In: *Pharmazeutische Zeitung Wissenschaft* 137 (1), S. 23–29.

Misko, T. P.; Schilling, R. J.; Salvemini, D.; Moore, W. M.; Currie, M. G. (1993): A fluorometric assay for the measurement of nitrite in biological samples. In: *Analytical Biochemistry* 214 (1), S. 11–16.

Mitich, L. W. (1990): Intriguing world of weeds: yarrow-the herb of Achilles. In: *Weed Technology* 4, S. 451–453.

Moilanen, E.; Vapaatalo, H. (1995): Nitric oxide in Inflammation and immune response. In: *Annals of Medicine* 27, S. 359–367.

Monschein, M.; Neira, J. I.; Kunert, O.; Bucar, F. (2010): Phytochemistry of heather (*Calluna vulgaris* (L.) Hull) and its altitudinal alteration. In: *Phytochemistry Reviews* 9 (2), S. 205–215.

Morgan, M. (1996): Chamomile from a clinical perspective. In: *Modern Phytotherapist* 3 (2), S. 17–19.

Mosmann, T. (1983): Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. In: *Journal of Immunological Methods* 65 (1), S. 55–63.

Mureşan, A. (2009): Relationship between the bed material size and the amount of metamorphic and volcanic rocks in hydrographic basins regarding two rivers from

Maramures Mountains (Eastern Carpathians-Romania). In: *Carpathian Journal of Earth and Environmental Sciences* 4 (1), S. 19–29.

Mustakerova, E.; Todorova, M.; Tsankova, E. (2002): Sesquiterpene lactones from *Achillea collina* Becker. In: *Zeitschrift für Naturforschung* (57c), S. 568–570.

Mutschler, E.; Thews, G.; Vaupel, P.; Schaible, H.-G. (2007): Anatomie, Physiologie, Pathophysiologie des Menschen. 6. Aufl. Stuttgart: Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft mbH.

Nakagawa, T.; Yokozawa, T. (2002): Direct scavenging of nitric oxide and superoxide by green tea. In: *Food and Chemical Toxicology* 40 (12), S. 1745–1750.

Năstase, M.; Cuculici, R.; Murătoreanu, G.; Grigorescu, I.; Dragotă, C.-S. (2012): A GIS-based assessment of geodiversity in the Maramures Mountains Natural Park. A preliminary approach. European SCGIS Conference "Best practices: Application of GIS technologies for conservation of natural and cultural heritage sites (2012)". proc.scgis.scgisbg.com.

Nemeth, E.; Bernath, J. (2008): Biological activities of yarrow species (*Achillea* spp.). In: *Current Pharmaceutical Design* 14 (29), S. 3151–3167.

Ness, A.; Metzger, J. W.; Schmidt, P. C. (1996): Isolation, identification and stability of 8-desacetylmatricine, a new degradation product of matricine. In: *Pharmaceutica Acta Helveticae* 71 (4), S. 265–271.

Neuwald, F. (1948): Über die entzündungswidrige Wirkung von Extractum Chamomillae Fluidum. In: *Süddeutsche Apotheker Zeitung* 88, S. 362–363.

Nussler, A. K.; Billiar, T. R. (1993): Inflammation, immunoregulation, and inducible nitric oxide synthase. In: *Journal of Leukocyte Biology* 54 (2), S. 171–178.

Ochir, G.; Buděšínský, M.; Motl, O. (1991): 3-Oxa-guaianolides from *Achillea millefolium*. In: *Phytochemistry* 30 (12), S. 4163–4165.

Oettel, H.; Wilhelm-Kollmannsperger, G. (1955): Zur Frage der antiphlogistischen Wirkung von Azulen. In: *Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology* 226 (5), S. 473–485.

Ornano, L.; Venditti, A.; Ballero, M.; Sanna, C.; Quassinti, L.; Bramucci, M. et al. (2013): chemopreventive and antioxidant activity of the chamazulene-rich essential oil obtained

from *Artemisia arborescens* L. Growing on the isle of La Maddalena, Sardinia, Italy. In: *Chemistry & Biodiversity* 10 (8), S. 1464–1474.

Orth, M.; Van den Berg, Th.; Czygan, F-C. (1994): Die Schafgarbe-*Achillea millefolium* L. Portrait einer Arzneipflanze. In: *Zeitschrift für Phytotherapie* 15, S. 176–182.

Panés, J.; Gerritsen, M. E.; Anderson, D. C.; Miyasaka, M.; Granger, D. N. (1996): Apigenin inhibits Tumor Necrosis Factor-Induced Intercellular Adhesion Molecule-1 upregulation *In Vivo*. In: *Microcirculation* 3 (3), S. 279–286.

Park, H.-J.; Jeong, S.-K.; Kim, S.-R.; Bae, S.-K.; Kim, W.-S.; Jin, S.-D. et al. (2009): Resveratrol inhibits *Porphyromonas gingivalis* lipopolysaccharide-induced endothelial adhesion molecule expression by suppressing NF-κB activation. In: *Archives of Pharmacal Research* 32 (4), S. 583–591.

Passreiter, C. M. (1992): Co-occurrence of 2-pyrrolidineacetic acid with the pyrrolizidines tussilaginic acid and isotussilaginic acid and their 1-epimers in *Arnica* species and *Tussilago farfara*. In: *Phytochemistry* 31 (12), S. 4135–4137.

Passreiter, C. M.; Isman, M. B. (1997): Antifeedant bioactivity of sesquiterpene lactones from *Neurolaena lobata* and their antagonism by γ-aminobutyric acid. In: *Biochemical Systematics and Ecology* 25 (5), S. 371–377.

Peng, H.-B.; Libby, P.; Liao, J. K. (1995): Induction and stabilization of IB by nitric oxide mediates inhibition of NF-κB. In: *Journal of Biological Chemistry* 270 (23), S. 14214–14219.

Perry, N. B.; Burgess, E. J.; Gutián, M. A. R.; Franco, R. R.; Mosquera, E. L.; Smallfield, B. M. et al. (2009): Sesquiterpene lactones in *Arnica montana*: helenalin and dihydrohelenalin chemotypes in Spain. In: *Planta Medica* 75 (06), S. 660–666.

Petronilho, S.; Maraschin, M.; Coimbra, M. A.; Rocha, S. M. (2012): *In vitro* and *in vivo* studies of natural products: a challenge for their valuation. The case study of chamomile (*Matricaria recutita* L.). In: *Industrial Crops and Products* 40, S. 1–12.

Pichersky, E.; Gang, D. R. (2000): Genetics and biochemistry of secondary metabolites in plants: an evolutionary perspective. In: *Trends in Plant Science* 5 (10), S. 439–445.

Picman, A. K. (1986): Biological activities of sesquiterpene lactones. In: *Biochemical Systematics and Ecology* 14 (3), S. 255–281.

Pires, J. M.; Mendes, F. R.; Negri, G.; Duarte-Almeida, J. M.; Carlini, E. A. (2009): Antinociceptive peripheral effect of *Achillea millefolium* L. and *Artemisia vulgaris* L.: both plants known popularly by brand names of analgesic drugs. In: *Phytotherapy Research* 23 (2), S. 212–219.

Ramadan, M. (2005): Isolierung und Pharmakokinetik des Proazulens Matricin aus *Matricaria recutita* L. Dissertation. Philipps-Universität Marburg.

Ramadan, M.; Goeters, S.; Watzer, B.; Krause, E.; Lohmann, K.; Bauer, R. et al. (2006): Chamazulene carboxylic acid and matricin: a natural profen and its natural prodrug, identified through similarity to synthetic drug substances. In: *Journal of Natural Products* 69 (7), S. 1041–1045.

Rao, M.A.N. (1997): Nitric oxide scavenging by curcuminoids. In: *Journal of Pharmacy and Pharmacology* 49 (1), S. 105–107.

Raschke, W. C.; Baird, S.; Ralph, P.; Nakoinz, I. (1978): Functional macrophage cell lines transformed by Abelson leukemia virus. In: *Cell* 15 (1), S. 261–267.

Reddy, A. M.; Lee, J.-Y.; Seo, J. H.; Kim, B. H.; Chung, E. Y.; Ryu, S. Y. et al. (2006): Artemisolide from *Artemisia asiatica*: Nuclear Factor-κB (NF-κB) inhibitor suppressing prostaglandin E2 and nitric oxide production in macrophages. In: *Archives of Pharmacal Research* 29 (7), S. 591–597.

Reed, D. H.; Frankham, R. (2003): Correlation between fitness and genetic diversity. In: *Conservation Biology* 17 (1), S. 230–237.

Rekka, E. A.; Kourounakis, A. P.; Kourounakis, P. N. (1996): Investigation of the effect of chamazulene on lipid peroxidation and free radical processes. In: *Research Communications in Molecular Pathology and Pharmacology* 92 (3), S. 361–364.

Roebuck, K. A.; Finnegan, A. (1999): Regulation of intercellular adhesion molecule-1 (CD54) gene expression. In: *Journal of Leukocyte Biology* 66 (6), S. 876–888.

Rohloff, J.; Skagen, E. B.; Steen, A. H.; Iversen, T.-H. (2000): Production of yarrow (*Achillea millefolium* L.) in Norway: essential oil content and quality. In: *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 48 (12), S. 6205–6209.

Rotar, I.; Păcurar, F.; Gărdă, N.; Vicidan, R. (2009): *Arnica montana* L.-a valuable medicinal plant of the oligotrophic grasslands. In: *Bulletin UASVM Agriculture* 1 (66), S. 471–475.

Rücker, G.; Manns, D.; Breuer, J. (1991): Guaianolidperoxide aus der Schafgarbe, *Achillea millefolium* L., Auslöser der Schafgarbendermatitis. In: *Archiv der Pharmazie (Weinheim)* (324), S. 979–981.

Rücker, G.; Manns, D.; Breuer, J. (1993): Peroxide als Pflanzeninhaltsstoffe, 14. Mitt.: Über weitere Guaianolid-Peroxide aus der Schafgarbe, *Achillea millefolium* L. In: *Archiv der Pharmazie* 326 (11), S. 901–905.

Ruhemann, S.; Lewy, K. (1927): Über das blaue Öl des Braunkohlen-Generatortees und seine Beziehung zu dem Azulen und den Sesquiterpenen des Kamillenöles. In: *Berichte der deutschen chemischen Gesellschaft (A and B Series)* 60 (11), S. 2459–2469.

Safayhi, H.; Sabieraj, J.; Sailer, E-R; Ammon, H.P.T. (1994): Chamazulene: an antioxidant-type inhibitor of leukotriene B4 formation. In: *Planta Medica* 60 (05), S. 410–413.

Sato, H.; Kita, M.; Seiki, M. (1993): v-Src activates the expression of 92-kDa type IV collagenase gene through the AP-1 site and the GT box homologous to retinoblastoma control elements. A mechanism regulating gene expression independent of that by inflammatory cytokines. In: *Journal of Biological Chemistry* 268 (31), S. 23460–23468.

Saukel, J.; Länger, R. (1992): Die *Achillea millefolium*-Gruppe (Asteraceae) in Mitteleuropa. Problemstellung, Merkmalserhebung und Untersuchungsmaterial. In: *Phytton (Horn, Austria)* 31 (2), S. 185–207.

Schall, A.; Reiser, O. (2008): Synthesis of biologically active guaianolides with a trans-annulated lactone moiety. In: *European Journal of Organic Chemistry* 2008 (14), S. 2353–2364.

Scheidel, U.; Bruelheide, H. (1999): Selective slug grazing on montane meadow plants. In: *Journal of Ecology* 87 (5), S. 828–838.

Scheidel, U.; Bruelheide, H. (2005): Effects of slug herbivory on the seedling establishment of two montane Asteraceae species. In: *Flora-Morphology, Distribution, Functional Ecology of Plants* 200 (4), S. 309–320.

Schilcher, H. (1987): Die Kamille: Handbuch für Ärzte, Apotheker und andere Naturwissenschaftler. Stuttgart: Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft mbH.

Schmidt, P.C.; Ness, A. (1993): Isolierung und Charakterisierung eines Matricin-Standards. In: *Pharmazie* 48 (H.2).

Schmidt, T. J. (2006): Structure-activity relationships of sesquiterpene lactones. In: *Studies in Natural Products Chemistry* 33, S. 309–392.

Schmidt, T. J.; Bomme, U.; Alfermann, A. W. (1998): Sesquiterpene lactone content in leaves of in vitro and field cultivated *Arnica montana*. In: *Planta Medica* 64 (03), S. 268–270.

Schmidt, T. J.; Lyß, G.; Pahl, H. L.; Merfort, I. (1999): Helenanolide type sesquiterpene lactones. Part 5: the role of glutathione addition under physiological conditions. In: *Bioorganic & Medicinal Chemistry* 7 (12), S. 2849–2855.

Schröder, H.; Kastner, U.; Gargula, K.; Budešínský, M.; Haslinger, E.; Jurenitsch, J.; Kubelka, W. (1994): Artabsin and 3-oxa-artabsin derivatives from *Achillea millefolium* species. In: *Phytochemistry* 36 (6), S. 1449–1451.

Schulze, E.-D.; Beck, E.; Müller-Hohenstein, K. (2002): Pflanzenökologie. Heidelberg: Spektrum Akademischer Verlag.

Seaman, F. C. (1982): Sesquiterpene lactones as taxonomic characters in the Asteraceae. In: *The Botanical Review* 48 (2), S. 121–594.

Sebald, O.; Seybold, S.; Philippi, G.; Wörz, A. (1996): Die Farn-und Blütenpflanzen Baden-Württembergs. Band 6: Spezieller Teil (Spermatophyta, Unterklasse Asteridae) Valerianaceae bis Asteraceae. 577 S: Eugen Ulmer Verlag, Stuttgart.

Seemann, A.; Wallner, T.; Poschlod, P.; Heilmann, J. (2010): Variation of sesquiterpene lactone contents in different *Arnica montana* populations: influence of ecological parameters. In: *Planta Medica* 76 (08), S. 837–842.

Senghas, K.; Seybold, S. (2003): Schmeil-Fitschen, Flora von Deutschland und angrenzender Länder. 92. Aufl. Wiebelsheim: Quelle und Meyer.

Shalaby, A. F.; Richter, G. (1964): Chromatographic investigation of the essential oil of *Achillea fragrantissima*. In: *Journal of Pharmaceutical Sciences* 53 (12), S. 1502–1505.

Shin, G. S.; Kang, J. K.; Lee, K. R.; Lee, H. W.; Han, J. W.; Choi, W. S. (2005): Suppression of inducible nitric oxide synthase and cyclooxygenase-2 expression in RAW 264.7 macrophages by sesquiterpene lactones. In: *Journal of Toxicology and Environmental Health, Part A* 68 (23–24), S. 2119–2131.

- Shipochliev, T.; Dimitrov, A.; Aleksandrova, E. (1981): Anti-inflammatory action of a group of plant extracts. In: *Veterinario-meditsinski nauki* 18 (6), S. 87–94.
- Si, X.-T.; Zhang, M.-L.; Shi, Q.-W.; Kiyota, H. (2006): Chemical Constituents of the Plants in the Genus *Achillea*. In: *Chemistry & Biodiversity* (3), S. 1163–1180.
- Siedle, B.; García-Piñeres, A. J.; Murillo, R.; Schulte-Mönting, J.; Castro, V.; Rüngeler, P. et al. (2004): Quantitative structure-activity relationship of sesquiterpene lactones as inhibitors of the transcription factor NF-κB. In: *Journal of Medicinal Chemistry* 47 (24), S. 6042–6054.
- Sikorski, K.; Chmielewski, S.; Przybyl, L.; Heemann, U.; Wesoly, J.; Baumann, M.; Bluyssen, H. A. R. (2011a): STAT1-mediated signal integration between IFNy and LPS leads to increased EC and SMC activation and monocyte adhesion. In: *American Journal of Physiology - Cell Physiology* 300 (6), S. C1337-C1344.
- Sikorski, K.; Czerwoniec, A.; Bujnicki, J. M.; Wesoly, J.; Bluyssen, H. A. R. (2011b): STAT1 as a novel therapeutical target in pro-atherogenic signal integration of IFNy, TLR4 and IL-6 in vascular disease. In: *Cytokine & Growth Factor Reviews* 22 (4), S. 211–219.
- Sosa, M. E.; Tonn, C. E. (2008): Plant secondary metabolites from Argentinean semiarid lands: bioactivity against insects. In: *Phytochemistry Reviews* 7 (1), S. 3–24.
- Sosa, S.; Tubaro, A.; Kastner, U.; Glasl, S.; Jurenitsch, J.; Della Loggia, R. (2001): Topical anti-inflammatory activity of a new germacrane derivative from *Achillea pannonica*. In: *Planta Medica* 67 (7), S. 654–658.
- Spitaler, R.; Schlorhaufer, P. D.; Ellmerer, E. P.; Merfort, I.; Bortenschlager, S.; Stuppner, H.; Zidorn, C. (2006): Altitudinal variation of secondary metabolite profiles in flowering heads of *Arnica montana* cv. ARBO. In: *Phytochemistry* 67 (4), S. 409–417.
- Spitaler, R.; Winkler, A.; Lins, I.; Yanar, S.; Stuppner, H.; Zidorn, C. (2008): Altitudinal variation of phenolic contents in flowering heads of *Arnica montana* cv. ARBO: a 3-year comparison. In: *Journal of Chemical Ecology* 34 (3), S. 369–375.
- Srivastava, J. K.; Gupta, S. (2007): Antiproliferative and apoptotic effects of chamomile extract in various human cancer cells. In: *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 55 (23), S. 9470–9478.
- Srivastava, J. K.; Pandey, M.; Gupta, S. (2009): Chamomile, a novel and selective COX-2 inhibitor with anti-inflammatory activity. In: *Life Sciences* 85 (19-20), S. 663–669.

- Stahl, E. (1954a): Über das Cham-Azulen und dessen Vorstufen, I. Mitteil.: Cham-Azulencarbonsäure aus Schafgarbe. In: *Chemische Berichte* 87 (2), S. 202–205.
- Stahl, E. (1954b): Über das Cham-Azulen und dessen Vorstufen, II. Mitteil.: Cham-Azulencarbonsäure aus Kamille. In: *Chemische Berichte* 87 (4), S. 505–507.
- Stahl, E. (1954c): Über das Cham-Azulen und dessen Vorstufen, III. Mitteil.: Zur Konstitution der Cham-Azulencarbonsäure. In: *Chemische Berichte* 87 (11), S. 1626–1628.
- Stahl, E.; Schild, W. (Hg.) (1981): Pharmazeutische Biologie; Drogenanalyse II: Inhaltstoffe und Isolierungen. Stuttgart: Gustav Fischer Verlag.
- Stahl, E.; Schild, W. (Hg.) (1986): Isolierung und Charakterisierung von Naturstoffen. Stuttgart, New York: Fischer.
- Stahl-Biskup, E. (2011): Schafgarbenkraut- Millefolii herba. In: Bacher, F., Heisig, P., Langguth, P., Mutschler, E., Rücker, G., Schirmeister, T., Scriba, G., Stahl-Biskup, E., Troschütz, R. (Hg): Kommentar zum Europäischen Arzneibuch 6.8, Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft, Stuttgart (Band 3).
- Stuehr, D. J.; Marletta, M. A. (1987): Synthesis of nitrite and nitrate in murine macrophage cell lines. In: *Cancer Research* 47 (21), S. 5590–5594.
- Suleimenov, Y. M.; Atazhanova, G. A.; Ozek, T.; Demirci, B.; Kulyjasov, A. T.; Adekenov, S. M.; Baser, K. H.C. (2001): Essential oil composition of three species of *Achillea* from Kazakhstan. In: *Chemistry of Natural Compounds* 37 (5), S. 447–450.
- Sumanont, Y.; Murakami, Y.; Tohda, M.; Vajragupta, O.; Matsumoto, K.; Watanabe, H. (2004): Evaluation of the nitric oxide radical scavenging activity of manganese complexes of curcumin and its derivative. In: *Biological and Pharmaceutical Bulletin* 27 (2), S. 170–173.
- Tak, P. P.; Firestein, G. S. (2001): NF-κB: a key role in inflammatory diseases. In: *Journal of Clinical Investigation* 107 (1), S. 7–11.
- Tholl, D. (2006): Terpene synthases and the regulation, diversity and biological roles of terpene metabolism. In: *Current Opinion in Plant Biology* 9 (3), S. 297–304.
- Todorova, M.; Trendafilova, A.; Mikhova, B.; Vitkova, A.; Duddeck, H. (2007): Chemotypes in *Achillea collina* based on sesquiterpene lactone profile. In: *Phytochemistry* 68 (13), S. 1722–1730.

Todorova, M. N.; Mikhova, B.; Trendafilova, A.; Vitkova, A.; Duddeck, H.; Anchev, M. (2006): Sesquiterpene lactones from *Achillea asplenifolia*. In: *Biochemical Systematics and Ecology* 34 (2), S. 136–143.

Tozyo, T.; Yoshimura, Y.; Sakurai, K.; Uchida, N.; Takeda, Y.; Nakai, H.; Ishii, H. (1994): Novel antitumor sesquiterpenoids in *Achillea millefolium*. In: *Chemical & Pharmaceutical Bulletin* 42 (5), S. 1096.

Trendafilova, A.; Todorova, M.; Mikhova, B.; Vitkova, A.; Duddeck, H. (2006): Sesquiterpene lactones from *Achillea collina* J. Becker ex Reichenb. In: *Phytochemistry* 67 (8), S. 764–770.

Tunón, H.; Thorsell, W.; Bohlin, L. (1994): Mosquito repelling activity of compounds occurring in *Achillea millefolium* L. (Asteraceae). In: *Economic Botany* 48 (2), S. 111–120.

Ulubelen, A.; Öksüz, S.; Schuster, A. (1990): A sesquiterpene lactone from *Achillea millefolium* subsp. *millefolium*. In: *Phytochemistry* 29 (12), S. 3948–3949.

Van de Stolpe, A.; Van der Saag, P.T. (1996): Intercellular adhesion molecule-1. In: *Journal of Molecular Medicine* 74 (1), S. 13–33.

Verzar-Petri, G.; Cuong, B. N.; Tamas, J.; Radics, L.; Ujzszaszi, K. (1979): The main azulenogenous sesquiterpene lactones of *Achillea millefolium* L. ssp. *collina* as compounds in the plant kingdom. In: *Planta Medica* 36.

Vitalini, S.; Beretta, G.; Iriti, M.; Orsenigo, S.; Basilico, N.; Dall'Acqua, S. et al. (2011): Phenolic compounds from *Achillea millefolium* L. and their bioactivity. In: *Acta Biochimica Polonica* 58, S. 203–209.

Vitalini, S.; Grande, S.; Visioli, F.; Agradi, E.; Fico, G.; Tome, F. (2006): Antioxidant activity of wild plants collected in Valsesia, an alpine region of Northern Italy. In: *Phytotherapy Research* 20 (7), S. 576–580.

Wagner, H. (2006): Multitarget therapy—the future of treatment for more than just functional dyspepsia. In: *Phytomedicine* 13, S. 122–129.

Wagner, H.; Ulrich-Merzenich, G. (2009): Synergy research: approaching a new generation of phytopharmaceuticals. In: *Phytomedicine* 16 (2), S. 97–110.

- Wang, S. Y.; Chen, C.-T.; Sciarappa, W.; Wang, C. Y.; Camp, M. J. (2008): Fruit quality, antioxidant capacity, and flavonoid content of organically and conventionally grown blueberries. In: *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 56 (14), S. 5788–5794.
- Wang, S. Y.; Chen, C.-T.; Wang, C. Y.; Chen, P. (2007): Resveratrol content in strawberry fruit is affected by preharvest conditions. In: *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 55 (20), S. 8269–8274.
- Wegner, E. (1950): Über den Azulengehalt wässriger Kamillenauszüge. In: *Archiv der Pharmazie* 283 (2), S. 127–136.
- Willuhn, G. (Hg.) (1998): Arnica Flowers: Pharmacology, Toxicology, and Analysis of the Sesquiterpene Lactones Their Main Active Substances. In: Lawson, L. D.; Bauer, R.: *Phytomedicines of Europe*. ACS Symposium Series: American Chemical Society Publications.
- Willuhn, G.; Leven, W. (1991): Zur qualitativen und quantitativen Analyse der Sesquiterpenlactone von Arnikablüten DAB 9. In: *Pharmazeutische Zeitung Wissenschaft* 4 (136), S. 32–39.
- Willuhn, G.; Leven, W.; Luley, C. (1994): Arnikablüten DAB 10. Untersuchungen zur qualitativen und quantitativen Variabilität des Sesquiterpenlactongehaltes der offizinellen Arnikadrogen. In: *Deutsche Apotheker Zeitung* 134, S. 4077–4085.
- Willuhn, G.; Merfort, I.; Paßreiter, C. M.; Schmidt, T. J. (1995): Chemistry and Systematics of the Genus *Arnica*. In: *Advances in Compositae systematics*. Hind, D.J.N.; Jeffrey, C.; Pope, G.V. (Editors), Royal Botanic Gardens, Kew, S. 167–195.
- Willuhn, G.; Röttger, P.-M.; Wendisch, D. (1984): 6-O-Isobutyryl-tetrahydrohelenalin aus Blüten von *Arnica montana*. In: *Planta Medica* 50 (01), S. 35–37.
- Willuhn, G.; Röttger, P.-M.; Matthiesen, U. (1983): Helenalin-und 11, 13-Dihydrohelenalinester aus Blüten von *Arnica montana*. In: *Planta Medica* 49 (12), S. 226–231.
- Wink, M. (2003): Evolution of secondary metabolites from an ecological and molecular phylogenetic perspective. In: *Phytochemistry* 64 (1), S. 3–19.
- Wurzer, W. (1994): Die Grosse Enzyklopädie der Heilpflanzen. Ihre Anwendung und Ihre Natürliche Heilkraft: Neuer Kaiser Verlag.

www.Floraweb.de (2013): floraweb. Hg. v. Bundesamt für Naturschutz (BfN). Bonn. Online verfügbar unter <http://www.floraweb.de/pflanzenarten/foto.xsql?suchnr=21248>.

www.gardencoachpictures.files.wordpress.com (2011):

http://gardencoachpictures.files.wordpress.com/2011/03/achillea_millefolium.jpg. *Achillea millefolium*.

www.ramusverlag.com (2013): <http://rasmusverlag.com/wp-content/uploads/2012/07/schafgarbe0002.jpg>. Illustration *Achillea millefolium*.

Zhao, J.; Davis, L. C.; Verpoorte, R. (2005): Elicitor signal transduction leading to production of plant secondary metabolites. In: *Biotechnology Advances* 23 (4), S. 283–333.

Zidorn, C. (2008): Sesquiterpene lactones and their precursors as chemosystematic markers in the tribe Cichorieae of the Asteraceae. In: *Phytochemistry* 69 (12), S. 2270–2296.

Zidorn, C. (2010): Altitudinal variation of secondary metabolites in flowering heads of the Asteraceae: trends and causes. In: *Phytochemistry Reviews* 9 (2), S. 197–203.

Zidorn, C.; Dirsch, V. M.; Rüngeler, P.; Sosa, S.; Della Loggia, R.; Merfort, I. et al. (1999): Anti-inflammatory Activities of Hypocretenolides from *Leontodon hispidus*. In: *Planta Medica* 65 (08), S. 704–708.

Zidorn, C.; Schubert, B.; Stuppner, H. (2005): Altitudinal differences in the contents of phenolics in flowering heads of three members of the tribe Lactuceae (Asteraceae) occurring as introduced species in New Zealand. In: *Biochemical Systematics and Ecology* 33 (9), S. 855–872.

Zitterl-Eglseer, K.; Jurenitsch, J.; Korhammer, S.; Haslinger, E.; Sosa, S.; Della Loggia, R. et al. (1991): Sesquiterpene lactones of *Achillea setacea* with antiphlogistic activity. In: *Planta Medica* 57 (5), S. 444–446.

Erklärung zur Eigenständigkeit

Hiermit erkläre ich, dass ich die vorliegende Arbeit eigenständig verfasst und keinen anderen Quellen und Hilfsmittel, als die hier angegebenen benutzt habe. Alle sinngemäß und wörtlich übernommenen Textstellen sind als solche kenntlich gemacht.

Regensburg, den _____ Unterschrift _____