Aus dem Institut für Pharmakologie
Direktor: Prof. Dr. W. Siegmund
der Universitätsmedizin der Ernst-Moritz-Arndt-Universität Greifswald

Und aus dem Institut für Pharmazie, Abt. Pharmazeutische Biologie
Leitung: Prof. Dr. U. Lindequist
der Ernst-Moritz-Arndt-Universität Greifswald

Thema:
„Zellbiologische Untersuchungen von Extrakten und Substanzen einer *Pittosporum*-Art“

Inaugural - Dissertation
zur
Erlangung des akademischen
Grades
Doktor der Medizin
(Dr. med.)
der
Universitätsmedizin
der
Ernst-Moritz-Arndt-Universität
Greifswald
2011

vorgelegt von:
Johanna Marei Sach
geb. am: 28.10.1982
in: Eutin, Deutschland

Dekan: Prof. Dr. Heyo Koemer

1. Gutachter: Prof. Dr. Ritter

2. Gutachter: Prof. Dr. Freund

Ort, Raum: Center of Drug Absoption and Transport (Greifswald), Seminarraum 1

Tag der Disputation: 24.10. 2012

I. Inhaltsverzeichnis

I. INHALTSVERZEICHNIS ..... **I**

II. ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS ..... **V**

III. ABBILDUNGSVERZEICHNIS ..... **VII**

IV. TABELLENVERZEICHNIS ..... **X**

1 EINLEITUNG **1**

2 THEMATISCHE EINFÜHRUNG **3**

2.1 DIE MEDIZIN DER ABORIGINES 3

2.1.1 Das Anwendungsritual von Pittosporum angustifolium bei den Aborigines *4*

2.2 BESCHREIBUNG DER PFLANZE *PITTOSPORUM ANGUSTIFOLIUM* 6

2.2.1 Botanik *6*

2.2.1.1 Taxonomie 6
2.2.1.2 Verbreitung und Habitat 7
2.2.1.3 Blätter, Blüten und Früchte 8
2.2.1.4 Auflistung einiger Synonyme 8

2.3 BISHERIGER KENNTNISSTAND ZU MEDIZINISCHEN ANWENDUNGSGEBIETEN VON *PITTOSPORUM ANGUSTIFOLIUM* 9

2.3.1 Anwendungsgebiete bei den Aborigines *9*

2.3.2 Anwendungsgebiete von Pittosporum-Produkten *9*

2.4 BISHERIGER KENNTNISSTAND ZU INHALTSSTOFFEN UND WIRKUNGEN VON *PITTOSPORUM ANGUSTIFOLIUM* 10

2.4.1 Inhaltsstoffe *10*

2.4.2 Biologische Aktivität *11*

3 ERGEBNISSE **13**

3.1 WACHSTUMSKURVE 13

3.2 ZYTOTOXIZITÄT DER EXTRAKTE VON *PITTOSPORUM ANGUSTIFOLIUM* GEGENÜBER U-5637-ZELLEN (NEUTRALROT-ASSAY) 13

3.2.1 Übersicht *13*

3.2.2 Zytotoxizität gelagerter und mehrfach eingefrorener/aufgetauter Extrakte *14*

3.2.3 Tee-Extrakt *15*

3.2.4 Wässriger-Ethanol-Extrakt nach saurer Hydrolyse (Aq.EtOH-sh-Extrakt) *16*

3.2.5 Wässriger MeOH-Extrakt (MeOH-Extrakt) *17*

3.2.6 Wässriger-EtOH-Extrakt (Aq.EtOH-Extrakt) *18*

3.2.7 50%EtOH–Extrakt *19*

3.2.8 Amylase-Extrakt *20*

3.3 ABHÄNGIGKEIT DER ZYTOTOXIZITÄT VON DER EINWIRKUNGSZEIT 22

3.3.1 Wässriger-Ethanol-Extrakt nach saurer Hydrolyse (Aq.EtOH-sh-Extrakt) *23*

3.3.2 Tee-Extrakt *24*

3.3.3 Wässriger MeOH-Extrakt (MeOH-Extrakt) *25*

3.3.4 Lösungsmittelkontrolle ... *26*

3.4 EINFLUSS DER EXTRAKTE UND REFERENZSUBSTANZEN AUF DEN ZELLZYKLUS ... 27

3.4.1 Tee-Extrakt ... *28*

3.4.1.1 Sub-G1-Phase ... 28
3.4.1.2 G1/G0-Phase ... 29
3.4.1.3 S-Phase ... 29
3.4.1.4 G2/M-Phase ... 30

3.4.2 Aq.EtOH-sh-Extrakt ... *31*

3.4.2.1 Sub-G1-Phase ... 31
3.4.2.2 G1/G0-Phase ... 32
3.4.2.3 S-Phase ... 32
3.4.2.4 G2/M-Phase ... 33

3.4.3 MeOH-Extrakt ... *34*

3.4.3.1 Sub-G1-Phase ... 34
3.4.3.2 G1/G0-Phase ... 35
3.4.3.3 S-Phase ... 35
3.4.3.4 G2/M-Phase ... 36

3.4.4 Referenzsubstanzen ... *37*

3.4.4.1 Etoposid ... 37
3.4.4.2 Staurosporin ... 37

3.5 ABHÄNGIGKEIT DER ZELLZYKLUSVERTEILUNG VON DER EINWIRKUNGSZEIT DER EXTRAKTE ... 38

3.5.1 Tee-Extrakt ... *38*

3.5.1.1 Sub-G1-Phase ... 39
3.5.1.2 G1-Phase ... 39
3.5.1.3 S-Phase ... 40
3.5.1.4 G2/M-Phase ... 40

3.5.2 Aq.EtOH-sh-Extrakt ... *41*

3.5.2.1 Sub-G1-Phase ... 41
3.5.2.2 G1-Phase ... 42
3.5.2.3 S-Phase ... 42
3.5.2.4 G2/M-Phase ... 43

3.5.3 Referenzsubstanzen ... *43*

3.5.3.1 Staurosporin ... 43
3.5.3.2 Triton ... 43

3.6 ZYTOTOXIZITÄT DER AUS *PITTOSPORUM ANGUSTIFOLIUM* ISOLIERTEN REINSUBSTANZEN GEGENÜBER U-5637-ZELLEN (NEUTRALROT-ASSAY) ... 44

3.6.1 Substanz 1 ... *44*

3.6.2 Substanz 2 ... *44*

3.6.3 Substanz 3 ... *45*

3.6.4 Substanz 4 ... *45*

3.6.5 Substanz 6 ... *46*

3.6.6 Substanz 7 ... *48*

3.6.7 Substanz 8 ... *49*

3.6.8 Wirkstärken-Rangliste ... *49*

3.7 BESTIMMUNG DER NEKROSE- UND/ ODER APOPTOSEINDUKTION DURCH EXTRAKTE UND SUBSTANZEN VON *PITTOSPORUM ANGUSTIFOLIUM* MITTELS DURCHFLUSSZYTOMETRIE ... 50

3.7.1 FITC/Annexin V- und Propidium-Iodidfärbung ... *50*

3.7.2 Auswertung ... *50*

3.7.3 Tee-, MeOH- und Aq.EtOH-sh-Extrakt ... *51*

3.7.4 Substanz 4 ... *51*

3.7.5 Substanz 6 ... *51*

3.7.6 Staurosporin ... *51*

3.7.7 Lösungsmittelkontrolle ... *52*

4 DISKUSSION ... 53

4.1 *IN VITRO* UNTERSUCHUNG ZUR ZYTOTOXIZITÄT VON *PITTOSPORUM-ANGUSTIFOLIUM*-EXTRAKTEN UND ISOLIERTEN SUBSTANZEN MITTELS NEUTRALROT-ASSAY ... 53

4.1.1 Extrakte ... *53*

4.1.2 Isolierte Substanzen ... *55*

4.2 *IN VITRO* UNTERSUCHUNG ZUR ZEITABHÄNGIGEN ZYTOTOXIZITÄT VON *PITTOSPORUM ANGUSTIFOLIUM*-EXTRAKTEN ... 56

4.3 UNTERSUCHUNG DES ZELLZYKLUS MITTELS DURCHFLUSSZYTOMETER UND PI-FÄRBUNG ... 56

4.3.1 Zellzyklusanalyse zu unterschiedlichen Zeiten ... *57*

4.3.2 Differenzierung von Apoptose und Nekroserate nach Inkubation mit Extrakten und den Substanzen 6 und 4 ... *58*

5 ZUSAMMENFASSUNG ... 60

6 AUSBLICK ... 62

7 MATERIAL UND METHODEN ... 63

7.1 MATERIAL ... 63

7.1.1 Geräte ... *63*

7.1.2 Chemikalien ... *65*

7.1.3 Lösungen und Puffer ... *66*

7.2 METHODEN ... 69

7.2.1 Verwendete Zelllinie ... *69*

7.2.2 Zellkultivierung ... *69*

7.2.2.1 Durchführung ... 69

7.2.3 Wachstumskurve ... *70*

7.2.4 Lösen der Extrakte ... *71*

7.2.4.1 Drogenmaterial ... 71

7.2.5 Überblick über die Extrakte und isolierten Verbindungen ... *71*

7.2.6 Herstellung des Amylase-Extraktes ... *72*

7.2.7 Herstellung der Extrakt-Stammlösungen ... *73*

7.2.7.1 Tee-Extrakt ... 73
7.2.7.2 Amylase-Extrakt ... 73
7.2.7.3 MeOH-Extrakt ... 74
7.2.7.4 Aq.EtOH-Extrakt ... 74
7.2.7.5 50%EtOH-Extrakt ... 74
7.2.7.6 Aq.EtOH-Extrakt nach saurer Hydrolyse (Aq.EtOH-sh-Extrakt) ... 74

7.2.8 Isolierte Substanzen ... *74*

7.2.9 Zytotoxizitätsuntersuchung mittels Neutralrot-Assay ... *75*

7.2.9.1 Theorie ... 75
7.2.9.2 Durchführung ... 75
7.2.9.3 Auswertung ... 77

7.2.10 Zellzyklusuntersuchungen, durchflusszytometrische Methoden ... *78*

7.2.10.1 Theorie 78
7.2.10.2 Durchführung 81
7.2.10.3 Auswertung 82

7.2.11 Bestimmung der Nekrose- und Apoptoseinduktion mittels Durchflusszytometer und Propidium-Iodid/Annexin-V-Färbung 85

7.2.11.1 Theorie 85
7.2.11.2 Durchführung 86
7.2.11.3 Auswertung 88

8 LITERATURVERZEICHNIS 90

9 ANHANG 95

II. Abkürzungsverzeichnis

°C	Grad Celsius
Abb.	Abbildung
Aq.	wässrig
Aq.EtOH-sh-Extrakt	Wässriger Ethanol Extrakt nach saurer Hydrolyse
Aqua bidest.	Aqua bidestillata
ca.	zirka
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Deoxyribonucleic acid
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EtOH	Ethanol
FACS	Fluorescence Activated Cell Sorting
Fcs	Fetale calf serum
h	Stunde(n)
HaCaT	Human adult Calcium Temperature
HBSS	Hank's Buffered Salt Solution
HEPES	2-(4-(2-Hydroxyethyl)- 1-piperazinyl)-ethansulfonsäure, eine Puffersubstanz
IC_{50}	Mittlere inhibitorische Konzentration
Konz.	Konzentration
MeOH	Methanol
min	Minute(n)
NRA	Neutralrot-Assay
PBS	Phosphate Buffered Saline
RNase	Ribonuklease

rpm	round per minute
RPMI	Roswell Park Memorial Institute
RT	Raumtemperatur
Tab.	Tabelle
TRIS	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan, auch Tromethamin
Vol-%	Volumenprozent

Des Weiteren werden Einheiten nach dem Internationalen Einheitensystem (SI, Système international d'unités) abgekürzt

III. Abbildungsverzeichnis

Abbildung 2.1: Verbreitung von *Pittosporum angustifolium* in Australien (Florabank). 7
Abbildung 2.2: *Pittosporum-angustifolium*-Baum in seinem natürlichen Habitat (Plantsystematic). 7
Abbildung 2.3: Blütenstand von *Pittosporum-angustifolium* (Australienplants). 8
Abbildung 2.4: *Pittosporum-angustifolium*-Kapselfrucht mit Klebsamen (Farm4). 8
Abbildung 2.5: *Pittosporum-angustifolium*-Pflanze im Institut für Pharmazie. 8
Abbildung 3.1: Wachstumskurve von U-5637-Zellen. 13
Abbildung 3.2: Darstellung der Viabilität von U-5637-Zellen nach 72stündiger Inkubation mit dem *Tee-Extrakt* 15
Abbildung 3.3: Dosis-Wirkungs-Kurve, *Tee-Extrakt.* 15
Abbildung 3.4: Darstellung der Viabilität von U-5637-Zellen nach 72stündiger Inkubation mit dem *Aq.EtOH-sh-Extrakt.* 16
Abbildung 3.5: Dosis-Wirkungs-Kurve, *Aq.EtOH-sh-Extrakt.* 16
Abbildung 3.6: Darstellung der Viabilität von U-5637-Zellen nach 72stündiger Inkubation mit dem *MeOH-Extrakt.* 17
Abbildung 3.7: Dosis-Wirkungs-Kurve, *MeOH-Extrakt.* 17
Abbildung 3.8: Darstellung der Viabilität von U-5637-Zellen nach 72stündiger Inkubation mit dem *Aq.EtOH-Extrakt.* 18
Abbildung 3.9: Dosis-Wirkungs-Kurve, *Aq.EtOH-Extrakt.* 18
Abbildung 3.10: Darstellung der Viabilität von U-5637-Zellen nach 72stündiger Inkubation mit dem *50%EtOH-Extrakt.* 19
Abbildung 3.11: Dosis-Wirkungs-Kurve, *50%EtOH-Extrakt.* 19
Abbildung 3.12: Darstellung der Viabilität von U-5637-Zellen nach 72stündiger Inkubation mit dem *Amylase-Extrakt.* 20
Abbildung 3.13: Dosis-Wirkungs-Kurve, *Amylase-Extrakt.* 20
Abbildung 3.14: Darstellung der Viabilität von U-5637-Zellen in Anhängigkeit von der Zeit der Inkubation mit *Aq.EtOH-sh-Extrakt.* 23
Abbildung 3.15: Darstellung Viabilität von U-5637-Zellen in Abhängigkeit von der Zeit der Inkubation mit *Tee-Extrakt.* 24
Abbildung 3.16: Darstellung Viabilität von U-5637-Zellen in Anhängigkeit von der Zeit der Inkubation mit *MeOh-Extrakt.* 25
Abbildung 3.17: U-5637-Zellen nach 72stündiger Inkubation mit 100 µg/ml *Tee-Extrakt.* 28
Abbildung 3.18: U-5637-Zellen nach 72stündiger Inkubation mit der Lösungsmittelkontrolle. 28
Abbildung 3.19: Zellzyklusdarstellung von U-5637-Zellen, Sub-G1-Phase nach 72stündiger Inkubation mit dem *Tee*-Extrakt. 28
Abbildung 3.20: Zellzyklusdarstellung von U-5637-Zellen, G1/G0-Phase nach 72stündiger Inkubation mit dem *Tee-Extrakt.* 29
Abbildung 3.21: Zellzyklusdarstellung von U-5637-Zellen, S-Phase nach 72stündiger Inkubation mit dem *Tee-Extrakt.* 29

Abbildung 3.22: Zellzyklusdarstellung von U-5637-Zellen, G2/M-Phase nach 72stündiger Inkuabtion mit dem *Tee-Extrakt*. 30
Abbildung 3.23: U-5637-Zellen nach 72stündiger Inkubation mit 20 µg/ml *Aq.EtOH-sh-Extrakt*.
Abbildung 3.24: U-5637-Zellen nach 72stündiger Inkubation mit der Lösungsmittelkontrolle. 31
Abbildung 3.25: Zellzyklusdarstellung von U-5637-Zellen, Sub-G1-Phase nach 72stündiger Inkubation mit dem *Aq.EtOH-sh-Extrakt*. 31
Abbildung 3.26: Zellzyklusdarstellung von U-5637-Zellen, G1/G0-Phase nach 72stündiger Inkubation mit dem *Aq.EtOH-sh-Extrakt*. 32
Abbildung 3.27: Zellzyklusdarstellung von U-5637-Zellen, S-Phase nach 72stündiger Inkubation mit dem *Aq.EtOH-sh-Extrakt*. 32
Abbildung 3.28: Zellzyklusdarstellung von U-5637-Zellen, G2/M-Phase nach 72stündiger Inkubation mit dem *Aq.EtOH-sh-Extrakt*. 33
Abbildung 3.29: U-5637-Zellen nach einer 72stündigen Inkubation mit 50 µg/ml *MeOH-Extrakt*.
Abbildung 3.30: U-5637 Zellen nach 72stündiger Inkubation mit der Lösungsmittelkontrolle. 34
Abbildung 3.31: Zellzyklusdarstellung von U-5637-Zellen, Sub-G1-Phase nach 72stündiger Inkubation mit dem *MeOH-Extrakt*. 34
Abbildung 3.32: Zellzyklusdarstellung von U-5637-Zellen, G1/G0-Phase nach 72stündiger Inkubation mit dem MeOH-Extrakt. 35
Abbildung 3.33: Zellzyklusdarstellung von U-5637-Zellen, S-Phase nach 72stündiger Inkubation mit dem *MeOH-Extrakt*. 35
Abbildung 3.34: Zellzyklusdarstellung von U-5637-Zellen, G2/M-Phase nach 72stündiger Inkubation mit dem *MeOH-Extrakt*. 36
Abbildung 3.35: U-5637-Zellen nach 72stündiger Inkubation mit 0,5 µM Etoposid. 37
Abbildung 3.36: U-5637-Zellen nach einer 72stündigen Inkubation mit 8 nM Staurosporin. 37
Abbildung 3.37: Zellzyklusdarstellung von U-5637-Zellen nach 100 µg/ml *Tee-Extrakt*-Inkubation, Sub-G1-Phase in Abhängigkeit von der Zeit. 39
Abbildung 3.38: Zellzyklusdarstellung von U-5637-Zellen nach 100 µg/ml *Tee-Extrakt*-Inkubation, G1-Phase in Abhängigkeit von der Zeit. 39
Abbildung 3.39: Zellzyklusdarstellung von U-5637-Zellen nach 100 µg/ml *Tee-Extrakt*-Inkubation, S-Phase in Abhängigkeit von der Zeit. 40
Abbildung 3.40: Zellzyklusdarstellung von U-5637-Zellen nach *Tee-Extrakt*-Inkubation, G2/M-Phase in Abhängigkeit von der Zeit. 40
Abbildung 3.41: Zellzyklusdarstellung von U-5637-Zellen nach *Aq.EtOH-sh-Extrakt*-Inkubation, Sub-G1-Phase in Abhängigkeit von der Zeit. 41
Abbildung 3.42: Zellzyklusdarstellung von U-5637-Zellen nach 20 µg/ml *Aq.EtOH-sh-Extrakt*-Inkubation, G1-Phase in Abhängigkeit von der Zeit. 42
Abbildung 3.43: Zellzyklusdarstellung von U-5637-Zellen nach *Aq.EtOH-sh-Extrakt*-Inkubation, S-Phase in Abhängigkeit von der Zeit. 42
Abbildung 3.44: Zellzyklusdarstellung von U-5637-Zellen nach *Aq.EtOH-sh-Extrakt*-Inkubation, G2/M-Phase in Abhängigkeit von der Zeit. 43

Abbildung 3.45: Darstellung der Viabilität von U-5637-Zellen nach 72stündiger Inkubation mit *Substanz 1*.... 44
Abbildung 3.46: Darstellung der Viabilität von U-5637-Zellen nach 72stündiger Inkubation mit *Substanz 2*.... 45
Abbildung 3.47: Darstellung der Viabilität von U- 5637-Zellen nach 72stündiger Inkubation mit *Substanz 3*... 45
Abbildung 3.48: Darstellung der Viabilität von U-5637-Zellen nach 72stündiger Inkubation mit *Substanz 4*.... 46
Abbildung 3.49: Dosis-Wirkungs-Kurve, *Substanz 4.* 46
Abbildung 3.50: Darstellung der Viabilität von U-5637-Zellen nach 72stündiger Inkubation mit *Substanz 6*.... 47
Abbildung 3.51: Darstellung der Viabilität von U-5637-Zellen nach 72stündiger Inkubation mit *Substanz 6*..... 47
Abbildung 3.52: Darstellung der Viabilität von U-5637-Zellen nach 72stündiger Inkubation mit *Substanz 6*.... 47
Abbildung 3.53: Darstellung der Viabilität von U-5637-Zellen Nach 72stündiger Inkubation mit *Substanz 7*... 48
Abbildung 3.54: Darstellung der Viabilität von U-5637-Zellen nach 72stündiger Inkubation mit *Substanz 8*... 49
Abbildung 3.55: Dosis-Wirkungs-Kurve, *Substanz 8*. 49
Abbildung 3.56: Durchflusszytometrische Bestimmung der Apoptose und Nekroseinduktion in U-5637 Zellen nach 24stündiger Inkubation. 52
Abbildung 3.57: Durchflusszytometrische Bestimmung der Apoptose- und Nekroseinduktion in U-5637-Zellen nach 24stündiger Inkubation. 52
Abbildung 7.1: Einteilung der 96-Mikrotiterplatte für den Neutralrot-Assay. 76
Abbildung 7.2: 96-Mikrotiterplatte nach Neutralrotinkubation. 77
Abbildung 7.3: *Dot-plot-Diagramm.* 82
Abbildung 7.4*: Dot-plot-Diagramm.* 83
Abbildung 7.5: Zellzyklusdarstellung mittels Histogramm nach Propidium-Iodid-Färbung. 84
Abbildung 7.6: Quantitative Zellzyklusdarstellung, Markerstatistik. 84
Abbildung 7.7: Darstellung der Auswertungsstrategie der Durchflusszytometrie. 89
Abbildung 9.1: Darstellung der Viabilität von U-5637-Zellen in Abhängigkeit von der Zeit, Lösungsmittelkontrolle. 95
Abbildung 9.2: Darstellung der Viabilität von U-5637-Zellen in Abhängigkeit von der Zeit, Referenzsubstanzen. 95
Abbildung 9.3: Durchflusszytometrische Bestimmung der Apoptoserate von U-5637 Zellen nach 24stündiger Inkubation. 96
Abbildung 9.4: Durchflusszytometrische Bestimmung der Nekroserate von U-5637 Zellen nach 24stündiger Inkubation. 96

IV. Tabellenverzeichnis

Tabelle 3.1: IC_{50}-Rangliste. *Pittosporum-angustifolium*-Extrakte gegen U-5637-Zellen. 21
Tabelle 3.2: Darstellung der verwendeten Referenzsubstanzen mit dem zugehörigen Effekt auf Zellebene. 22
Tabelle 3.3: Darstellung der Auswertungsstrategie der Durchflusszytometrie. 50
Tabelle 4: Übersicht über die Herstellung der *Pittosporum angustifolium*-Extrakte 72

1 Einleitung

Die Therapie von malignen Neoplasien stellt trotz vieler Fortschritte der medizinischen und pharmazeutischen Grundlagenforschung (Antikörpertherapie, Gentherapie) noch immer eine Herausforderung dar.

Maligne Neoplasien sind eine der führenden Todesursachen weltweit[1]. Mit dem Anstieg des Lebensstandards steigt zudem die globale Prävalenz (Bsp. China; Zhao et al. 2010).

Darüber hinaus nimmt - trotz bemerkenswerter Fortschritte in der Tumorchemotherapie - das Bedürfnis der Patienten nach einer sanfteren Therapie zu als sie derzeit in der konventionellen Therapie gängig ist. Die Diagnose „Krebs“ ist für jeden Patienten lebenseinschneidend; emotional herrscht in ihm oft Hoffnungslosigkeit und Verzweiflung. Der Patient leidet allerdings nicht nur an psychischen Belastungen, der Tumorerkrankung selbst sowie den paraneoplastischen Effekten, sondern auch an den Nebenwirkungen der Therapie. Viele Chemotherapeutika beinhalten Nebenwirkungen, die die Lebensqualität stark einschränken und zu zusätzlichen physischen und psychischen Belastungen führen. Einer Umfrage zufolge greifen 7- 48% britischer Tumorpatienten über die schulmedizinischen Ansätze hinaus zu alternativen Heilmethoden, darunter vor allem pflanzliche Präparate.[2] Insbesondere im Internet finden die Patienten auch Informationen über angeblich wirksame Behandlungsmethoden und Antitumormittel, deren Wirksamkeit bis jetzt jedoch nicht wissenschaftlich belegt ist.

Die Suche der pharmazeutischen Forschung gilt Wirkstoffen mit einer starken sowie selektiven Wirkung und möglichst geringen Nebenwirkungen.

Ein aussichtsreicher Weg ist hierbei unter anderem die Suche nach potenten Naturstoffen. Nach Cragg und Newmann (2007) wurden von 1981 bis 2006 zahlreiche Wirkstoffe aus Naturstoffen und -derivaten hergestellt. Als Beispiele hierfür seien Paclitaxel aus der Pazifischen Eibe (*Taxus brevifolia*), Camptothecin aus *Camptotheca acuminata* oder die Vincristine aus *Catharanthus roseus* genannt.

Im Mittelpunkt der vorliegenden Arbeit steht die australische Pflanze *Pittosporum angustifolium*. Die Blätter des Baumes gelten bei den Aborigines als vielseitiges Heilmittel. In Australien werden *Pittosporum*-Präparate heute als wirksam gegen Tumorerkrankungen

übers Internet empfohlen und vermarktet. Eine in Queensland praktizierende deutsche Ärztin (Dr. Cornelia Krasselt) und ein aus Deutschland stammender Heilpraktiker (Klaus von Gliszczynski) erzielten laut mündlicher Information bei mehreren Tumorpatienten Therapieerfolge. Es liegen jedoch noch keinerlei publizierte wissenschaftliche Untersuchungen zum Wirkungsnachweis *in vitro* und *in vivo* zu den verantwortlichen Wirkstoffen und zu Wirkmechanismen von *Pittosporum angustifolium* vor. Die im Internet zugänglichen Daten, die als Quelle die an der Universität Greifswald angefertigte Diplomarbeit von Steffi Hellmund angeben, wurden nicht-autorisiert ins Netz gestellt.

Dr. Rudolf Kunze, ehem. Vorsitzender der Freunde der Universität Greifswald e.V., regte die Durchführung wissenschaftlicher Untersuchungen zu *P. angustifolium* im Institut für Pharmazie in Greifswald an, stellte den Kontakt nach Australien her und ermöglichte die Materialbeschaffung. In der bereits vorliegenden Diplomarbeit von Hellmund (Hellmund 2007) gelang der Nachweis einer zytotoxischen Wirkung von Extrakten von *Pittosporum angustifolium* gegenüber Zellen der Lungenkarzinomzelllinie 427 *in vitro*. Vermutlich verantwortliche Wirkstoffe wurden (DA Crüsemann) und werden aktuell isoliert und charakterisiert.

In der vorliegenden Arbeit sollte die mögliche zytotoxische Wirkung von Extrakten und Substanzen aus *P. angustifolium* vertieft untersucht und folgenden Fragestellungen nachgegangen werden:

Unter Verwendung des Neutralrot Assays:

- Bestätigt sich die *in vitro* Zytotoxizität von *Pittosporum-angustifolium*-Extrakten gegen eine weitere Tumorzelllinie (U-5637)?
- Wann tritt die maximale zellschädigende Wirkung ein?
- Besitzen die aus einem alkoholischen Extrakt isolierten Verbindungen zytotoxisches Potenzial gegen die Tumorzelllinie?

Mittels der Durchflusszytometrie:

- Arretieren die Extrakte/ein Extrakt eine Phase des Zellzyklus?
- In welchem Ausmaß induzieren die Extrakte und isolierten Verbindungen Nekrose- und Apoptoseprozesse in U-5637-Zellen?

2 Thematische Einführung

2.1 Die Medizin der Aborigines

„Achtet die Natur und haltet bewusst Kontakt, nutzt ihre Kräfte, und lasst zu, dass sie euch auftankt.“

Botschaft der Nangkaris (Hobert 2007)

Der Name Aborigines leitet sich vom Lateinischen ab: aborigine → ab origine, „von Beginn an“. Die Aborigines bewohnen seit ca. 50 000 Jahren den australischen Kontinent. Es ist eines der ältesten indigenen Völker der Welt. Das Volk besteht aus unterschiedlichen Stämmen mit mehr als zweihundert verschiedenen Sprachen. Vor der Kolonisationsherrschaft, die 1977 einsetzte, lebten die meisten Aborigines in Stämmen als Nomaden, Jäger und Sammler.

Wie Hobert (2007) in seinem Buch darstellt, fußt die Lebensphilosophie der Aborigines auf einer „emotionalen Verbindung zur Natur mit einem gleichzeitigen Verständnis für das Netzwerk der gegenseitigen Abhängigkeit“. Diese Einstellung ermöglichte ihnen ein stabiles Überleben in der extremen Wildnis Australiens.

Das Verständnis der Aborigines von Gesundheit bzw. Krankheit steht in einem ganzheitlichen Konzept. Zur körperlichen Heilung gehört auch die geistige Heilung. Die medizinische Behandlung ist ein Zusammenspiel von spirituellen Ritualen mit den effektiven Inhaltsstoffen der Heilmittel.

Das Volk ist tausende von Jahren alt. Ebenso alt sind auch die Erfahrungen der Menschen mit den Heilpflanzen ihrer Umgebung. Das medizinische Repertoire der Aborigines bedient sich einer Vielzahl von Arzneimitteln aus Pflanzen (Öle, Kräutertees, Früchte), insbesondere Wildblütenessenzen (*Love-Remedies*) und aus tierischen Stoffen (z.B. Emuöl). Des Weiteren gibt es eine Vielzahl an schamanischen Elementen wie z.B. die Heilung durch Kraft der Elemente oder das Aufsuchen von Kraftorten (Hobert 2007).

Zwei Medizinalpflanzen der Aborigines, die in der westlichen Welt populär geworden sind, sollen hier genannt werden:

1. Der australische Teebaum, *Melaleuca alternifolia.* Das Teebaumöl wirkt antiviral, antimykotisch (Concha et al. 1998), antibakteriell (Carson & Riley 1995), hautregenerierend, zellregenerativ, anti-inflammatorisch und immunstärkend (Carson et al. 2006).

2. Der Papaya-Baum (*Carica papaya*), der von einigen Aboriginal-Stämme u.a. als Krebsmedikament angewendet wird (Hobert 2007). Der effektive Wirkstoff ist vermutlich das enthaltene Papain. Das Enzym ist in der westlichen Medizin in Präparaten enthalten, die in klinischen Studien (EBM Level II) eine Reduktion von Nebenwirkungen von Chemo- und Strahlentherapie bei Tumorpatienten zeigten (Beuth 2008).

Das Heilwissen der Aborigines wird im Übrigen im Fachbereich Ethnomedizin als Weiterbildung für Ärzte und Heilpraktiker in Deutschland angeboten.

2.1.1 Das Anwendungsritual von Pittosporum angustifolium bei den Aborigines

Pittosporum angustifolium ist die einzige *Pittosporum* Art, die von den Aborigines zu medizinischen Zwecken genutzt wird (Gumbi-Gumbi.com).

Im Folgenden wird ein Bericht von dem Heilpraktiker Klaus von Gliszczynski zitiert. Es ist die Geschichte über seine Begegnung mit der Aboriginal Frau, die ihn in die Anwendungsweise von *Gumby Gumby* (Aboriginal Name für *Pittosporum angustifolium*) einführte:

"Auf meiner langen Suche nach immer neuem Wissen knüpfte ich 1996-1998 starke Kontakte zu den Ureinwohnern Australiens, den Aboriginals.

Auf einer Erforschungsreise im australischen Outback in Queensland begegnete ich am Straßenrand einer sehr alten Aboriginal Frau.

Sie war die Elders[3] *aus ihrem Stamm und die Medizin Frau. In einem Bündel neben ihr, lagen GUMBY GUMBY Blätter und Samen.*

Ich setzte mich zu ihr und wir redeten für eine ganze Weile. Dann fragte ich sie, was sie mit den Blättern und Samen machen wollte und von welchem Baum die Blätter und Samen abstammen […] und sie begann zu erzählen:

Sie erzählte mir, dass diese Blätter von einem Baum namens GUMBY GUMBY stammen und dass sie diese für die Herstellung eines Heilmittels benötigt.

Weiter erzählte sie mir, dass ihr diese Lehre von Generation zu Generation immer wieder erzählt worden ist und, dass sie nun die Elders in ihrem Stamm ist und ihr als einzige erlaubt ist, mir diese Weisheit zu erzählen:

[3] Stammesälteste

Wenn Krankheiten in Ihrem Stamm Clan auftraten, die mit anderen Heilungsmittel nicht gelindert werden konnten, ist die Medizinfrau mit dieser kranken Person Bush-walking[4] *gegangen, auf der Suche nach einem GUMBY GUMBY Baum. Diese Suche konnte 1-2 Tage dauern.*

Wenn dieser Baum gefunden wurde, zündete man unter dem Baum ein Lagerfeuer an, in das man trockene GUMBY GUMBY Blätter hineinwarf, um durch den Rauch dem Spirit näher zu kommen.

Beide setzten sich an das Feuer und die Medizinfrau fing an einige FRISCHE GUMBY GUMBY Blätter im Mund zu zerkauen. Dann spuckte sie diesen Brei in eine Rindenschale. Dieses Zerkauen wiederholte sie so etwa 10-15 mal.

Danach wurde dieser Brei für Stunden in die Sonne gestellt und am Abend von der kranken Person gegessen.

Dieses Ritual wurde am nächsten Tag oder je nach Krankheitsstärke öfters wiederholt.

Dann sind sie zum Stamm zurückgegangen und die Heilung ist eingetreten.“

[4] Wanderung durch den Australischen Busch.

2.2 Beschreibung der Pflanze *Pittosporum angustifolium*

2.2.1 Botanik

2.2.1.1 Taxonomie

Ordnung: *Apiales*

Unterschiedliche Autoren ordnen die Pflanze den Ordnungen Rosales (Cronquist 1981), Saxifragales (Grund & Jensen 1981) oder Pittosporales (Stuhlfauth et al. 1985) zu. Gebräuchlich ist die Zuordnung zur Ordnung der Apiales (Chandler et al. 2007).

Familie: *Pittosporaceae* (Klebsamengewächse)

Zur der Familie gehören verholzte Pflanzen, wie Sträucher, Halbsträucher, Bäume oder Lianen. Diese sind meist immergrün. Harzgänge in der Rinde sind ein typisches Merkmal der Klebsamenfamilie. In neun Gattungen und 200-240 Arten wird sie unterteilt. Sieben Gattungen sind alleine in Australien endemisch. Die größte Gattung, mit 100 Arten, stellt *Pittosporum* dar.

Gattung: *Pittosporum* (Klebsamen)

Die Gattung *Pittosporum* Banks ex Gaertn. beinhaltet immergrüne Bäume und Sträucher. Die Wuchshöhe unterscheidet sich je nach Art und erreicht Maße von 1 bis 20 Metern. Die Laubblätter sind ungeteilt, wechselständig und von ledriger Konsistenz. Die Blütenfarbe variiert von weiß bis orange. Zu erkennen sind zwei bis drei, selten fünf Fruchtblätter, die zu einem synkarpen oberständigen Fruchtknoten gewachsen sind. Die Fruchtform zeigt sich als Beeren oder Kapseln. Die Morphologie des Samens gibt der Gattung ihren Namen. *Pittosporum* stammt aus dem Griechischen und übersetzt sich mit „klebriger Same“. Der Samen steckt in einer klebrigen Pulpa. Die Gattung gliedert sich in 150 Arten.

Art: *Pittosporum angustifolium* (Weinende Steinlinde)

1863 etablierte Bentham den Taxon *Pittosporum phillyraeoides* DC, der mehrere Arten beinhaltete. Crayzer et al. entwarf 2000 anhand morphologischer Merkmale eine Neuordnung, die die Art *Pittosporum phillyraeoides* DC *var. microcarpa* Moore als *Pittosporum angustifolium* auszeichnete. Der Name *Pittosporum phillyraeoides* DC *var. microcarpa* Moore wird in der Patentschrift für die Pflanzenextrakte verwendet (Patent.de).

2.2.1.2 Verbreitung und Habitat

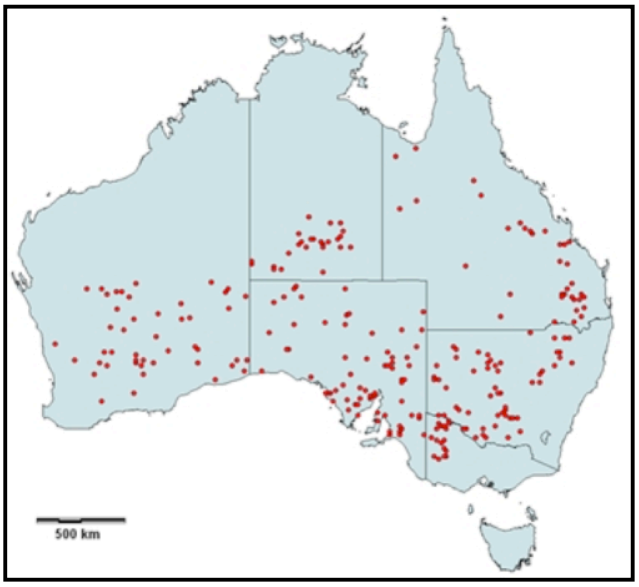


Abbildung 2.1: Verbreitung von *Pittosporum angustifolium* in Australien (Florabank).

Abbildung 2.2: *Pittosporum-angustifolium*-Baum in seinem natürlichen Habitat (Plantsystematic).

Pittosporum angustifolium Lodd. besiedelt fast den gesamten australischen Kontinent. Er verbreitet sich vom südlichen Western Australia über South Australia zum südlichen Northern Territory, nordöstlichen Victoria und über große Teile von west und zentral New South Wales und Queensland (Florabank). Die Bäume stehen isoliert.

Die Habitate sind trockene, sandige, kalkreiche oder lehmige Böden. Die Wuchshöhe beträgt bis zu 10 m (Florabank).

2.2.1.3 Blätter, Blüten und Früchte

Die 50-90 mm langen und circa 8 mm breiten hängenden Blätter sind dunkelgrün, unbehaart und ganzrandig linear bis lanzettlich. An der Blattspitze befindet sich ein Stachel, der bis zu 3 mm lang wird (Florabank).

Der Baum blüht von Juli bis Oktober. Die hermaphroditen Blüten sind glockenförmig und durch fünf Kelchblätter und fünf creme-weiße Kronblätter gekennzeichnet. Die orangefarbenen Früchte erscheinen wie kleine Aprikosen (Syn.: *Native Apricot*). Die Frucht bildet eine Kapsel, in der bis zu sechs klebrige Samen zu finden sind (Florabank). Die Samen sind sehr bitter und werden als Pulver zum Pflanzenschutz gegen Vögel eingesetzt (Naturalmed).

Abbildung 2.3: Blütenstand von *Pittosporum-angustifolium* (Australienplants).

Abbildung 2.4: *Pittosporum-angustifolium*-Kapselfrucht mit Klebsamen (Farm4).

Abbildung 2.5: *Pittosporum-angustifolium*-Pflanze im Institut für Pharmazie.
E.M.A.Universität Greifswald. Foto 2008.

2.2.1.4 Auflistung einiger Synonyme

Pittosporum acacioides/ longifolium/ salicinum/ lanceolatum, Weeping Pittosporum, Weinende Steinlinde, Butter Bush, Meemeei, Poison Berry Tree, Willow Tree, Native Willow (E-Flora).

2.3 Bisheriger Kenntnisstand zu medizinischen Anwendungsgebieten von *Pittosporum angustifolium*

2.3.1 Anwendungsgebiete bei den Aborigines

→ Myalgie, Verstauchungen, Prellungen, Grippale Infekte, Husten, und Galaktogogum. (Webb 1969, Barr et al. 1993, Goddard & Kalotas 1988).

→ Das Dekokt der Früchte für Ekzeme und Pruritus (Lassak et al. 1987).

→ Der Stamm der Pitjanjara verwendet die Samen als Kataplasma (Hayden 1979).

2.3.2 Anwendungsgebiete von Pittosporum-Produkten

Tee und Flüssig-Exrakt werden bei folgenden Beschwerden empfohlen (Gliszczynski):

Krebs, Hypertonie, Immundepression, Autoimmunerkrankungen, Morbus Menière, Arthritis, Divertikulitis, Ross-River-Virus-Infektionen, Chronic-fatigue-Syndrom und Depressionen.

Der Flüssig-Exrakt ist zehnmal stärker konzentriert als der Tee. Klaus v. Gliszczynski bietet insbesondere den Flüssig-Extrakt zur begleitenden Tumorbehandlung an. In Zusammenarbeit mit Dr. med. C. Krasser stehen die Tumorpatienten ggf. unter klinischen Kontrollen (Bluttests, Röntgen).

Laut Gliszczynski richtet sich die Behandlungsdauer (Wochen bis Jahre) nach dem Grad der Erkrankung. Eine Verbesserung oder Veränderung sei meist nach vierzehn Tagen zu verzeichnen.

Die Salbe und der Badezusatz werden empfohlen bei:

Hauttumoren, Neurodermitis, Akne, chronischer Psoriasis, chronischen Ekzemen, Hämorrhoiden, Wundheilungsstörungen und Muskelkrämpfen.

2.4 Bisheriger Kenntnisstand zu Inhaltsstoffen und Wirkungen von *Pittosporum angustifolium*

2.4.1 Inhaltsstoffe

- Phillyrigenin
  28-20-Lacton der Taraxastansäure, an C3 und C 27 zweifach hydroxiliert. (Chopra et al. 1965).

- Hydroxyphillyrigenin
  Phillyrigenin-Derivate (Errington & Jefferies 1988).

- 27-Desoxyphillyrigenin
  Phillyrigenin-Derivate (Errington & Jefferies 1988).

- R_1-Barrigenol
  isoliert nach vorhergehender saurer Hydrolyse des wässrigen EtOH-Extraktes (Blätter) von Beckwith et al. (1956). Strukturaufklärung durch Errington et al. (1967) sowie Ito et al. (1967); ein an C3, C15, C16, C21, C22, C28 hydroxiliertes Triterpen vom Oleantyp, ist aus anderen Pflanzen, darunter auch anderen *Pittosporum*-Arten, bekannt (Jain et al. 1980; Higuchi et al. 1983; D'Aquarica et al. 2002).

- Barringtogenol C (Barua et al. 1961).

- Camelliagenin A (Itokawa et al. 1967).

- 16-Desoxybarringtogenol C (Yosioko et al. 1967).

- Crüsemann (2008) isolierte aus dem *wässrigen EtOH-Extrakt* acht Triterpensaponine bzw. -gemische. An der endgültigen Strukturklärung wird derzeit gearbeitet. Die Zucker der Saponine waren: Glucose, Arabinose, Mannose, Galactose.

Weitere Parameter :

- Gerbstoffgehalt der Blätter
  ca. 1,3% Tannine,
  ca. 0,54% Flavonoidgehalt (als relativ niedrig eingestuft) (Hellmund 2007).

- Kohlenhydratgehalt
  je nach Herstellungsart 29,17% bis 95,95% (Hellmund 2007).

- Proteingehalt
  ca. 4,54% (Hellmund 2007).

- Lipidgehalt
  ca. 6,24% (Hellmund 2007).

- Ätherische Öle sind auf Grund des aromatischen Geruchs der Blätter zu vermuten (Crüsemann 2008). Untersuchungsergebnisse dazu liegen in der Literatur nicht vor.

- Spurenelemente
  Angaben hierzu sind im Internet veröffentlicht (Gumbi-Gumbi.com).

2.4.2 Biologische Aktivität

Antioxidative Aktivität

Im Vergleich zur Ascorbinsäure zeigte sich eine mäßige radikalfangende Wirkung (polare Extrakt > lipophile Extrakte) (Hellmund 2007).

Antivirale Aktivität

Semple et al. (1998) zeigten die Wirksamkeit eines EtOH-Extraktes aus Holz, Früchten und Wurzeln gegen Ross-River-Viren. Das Ross-River-Fieber gehört zu den von Gliszczynski

empfohlenen Anwendungsgebieten von *Pittosporum angustifolium.* Gegen HCMV (Humanes Cytomegalie-Virus) und Polovirus wurde keine Aktivität gefunden.

Antibiotische Aktivität

Hellmund (2007) erzielte mit *Pittosporum-angustifolium*-Extrakten eine geringfügige Wachstumshemmung von *B. subtilis*. Die Extrakte waren unwirksam gegen *S. aureus, P. aeruginosa, M. flavus* und *C. maltosa.*

Zytotoxische Aktivität

Polare Extrakte zeigten *in vitro* Zytotoxizität gegen Amnionepithel-Zellen (FL-Zellen) und gegen die Lungen-Karzinom-Zelllinie A427 (Hellmund 2007).

Immunmodulierende Aktivität

→ Leukozytenstimulation

Untersuchungen ergaben stimulierende Effekte auf humane primäre Leukozyten bei einer Konzentration $\leq IC_{50}$ (IC_{50} für FL-Zellen). Sie waren beim *Amylase-Extrakt* relativ stark ausgeprägt. Unter einer Vielfachen IC_{50} (IC_{50} für FL-Zellen) wurden die Leukozyten geschädigt (Hellmund 2007).

Zytokinfreisetzung

Erste Ergebnisse der Firma Biometec zeigten erhöhte Zytokinfreisetzung nach *in vitro* Behandlung mit dem *Tee-, Amylase-* bzw. *Kalt-Ethanol-Extrakt* (Hellmund 2007).

3 Ergebnisse

3.1 Wachstumskurve

Die Wachstumskinetik der U-5637-Zelllinie ist in Abbildung 3.1 dargestellt. Die Daten der Graphik sind Mittelwerte aus zwei Zellernten pro Zeiteinheit. Die Generationsdauer beträgt 24 h. Das Zellwachstum folgt einem exponentiellen Wachstum, das sich nach 72 h Inkubation einstellt.

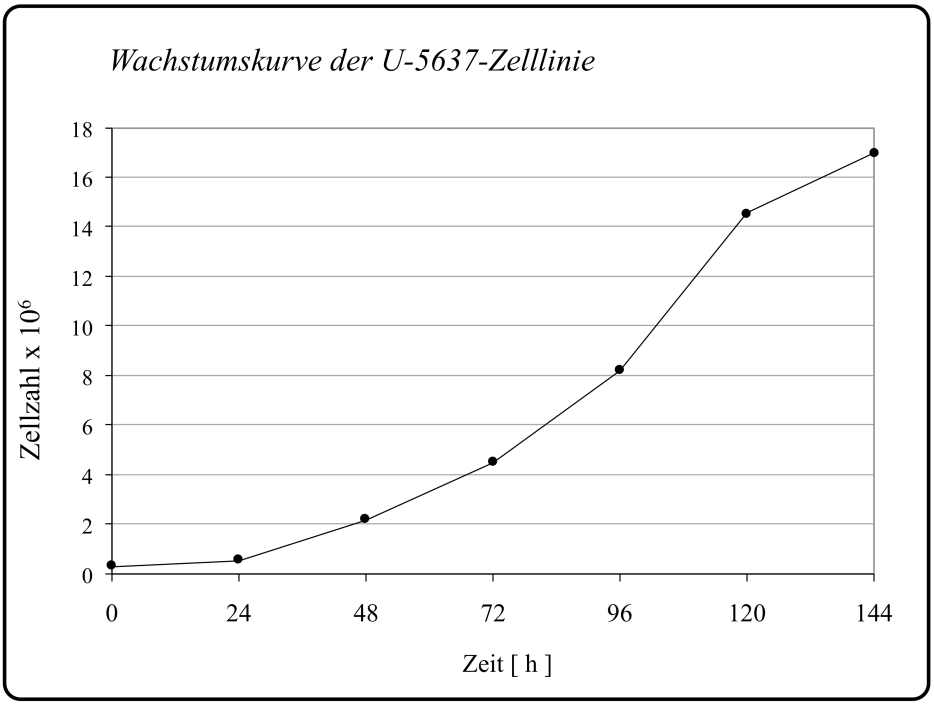


Abbildung 3.1: Wachstumskurve von U-5637-Zellen.
Darstellung der Wachstumskinetik der Zelllinie U-5637. Aufgetragen ist der Mittelwert (n = 2).

3.2 Zytotoxizität der Extrakte von *Pittosporum angustifolium* gegenüber U-5637-Zellen (Neutralrot-Assay)

3.2.1 Übersicht

Bekannt für verschiedene *Pittosporum angustifolium*-Extrakte ist ihr zytotoxisches Potenzial gegen FL-Zellen (Fibroblast-like-cells, humane Amnion-Epithelzellen) und 427-Zellen (humane Lungen-Karzinom-Zellen) (Hellmund 2007).

Mittels Neutralrot-Färbung (Neutralrot-Assay) sollte hier die zytotoxische Stärke gegen die Tumorzelllinie U-5637 (Urothel-Karzinom-Zelllinie) ermittelt werden. Die Inkubationszeit

betrug wiederum 72 h. Die Referenzsubstanzen waren das Zytostatikum Etoposid und das im Extrakt mitgeführte Lösungsmittel. Die Ergebnisse für den jeweils getesteten Extrakt sind in Abb.3.2. bis Abb.3.13 abzulesen. Die Darstellungen zeigen folgende Gemeinsamkeit der Extrakte: Alle Extrakte senken im verwendeten Konzentrationsfenster von 100 - 1,56 µg/ml die Viabilität der Tumorzelllinie deutlich; je höher die Konzentration desto stärker der Effekt. Die Extrakte unterscheiden sich in ihrer Wirkstärke. Die halbmaximalen Inhibitionsstärken (IC_{50}) sind in Tab.3.1 dargelegt. Die mitgeführten Lösungsmittelkontrollen reduzierten die Zellviabilität minimal.

3.2.2 Zytotoxizität gelagerter und mehrfach eingefrorener/aufgetauter Extrakte

Bei -20°C über 1 Woche verwahrte Aliquots der Extrakt-Stammlösungen, wurden ebenfalls im Neutralrot-Assay untersucht. Es sollte die Frage geklärt werden, ob die Lagerung zu Wirkverlust führt. Vor der Testung wurden die Extrakte dreimal getaut und wieder eingefroren. Im Ergebnis waren die Dosis-Wirkungs-Beziehungen identisch mit denen der Stammlösungen, die frisch verwendet worden waren.

3.2.3 Tee-Extrakt

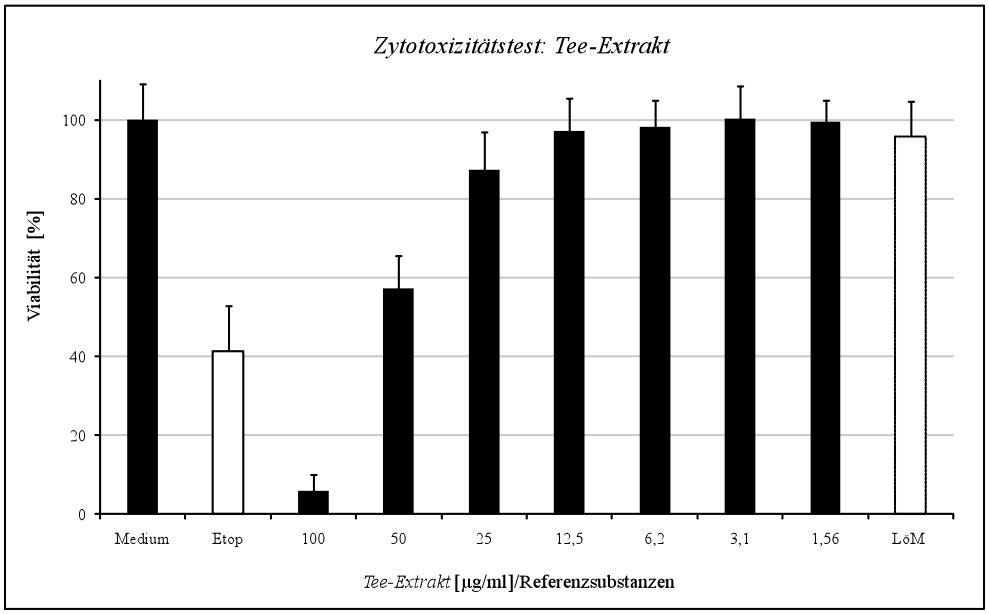


Abbildung 3.2: Darstellung der Viabilität von U-5637-Zellen nach 72stündiger Inkubation mit dem *Tee-Extrakt*.
Referenzsubstanzen: LöM = Lösungsmittelkontrolle: 0,3% EtOH und Etoposid [0,5 µM]. Bestimmung mittels Neutralrot-Assay. Viabilität der unbelasteten Zellkontrolle = 100 Prozent. Mittelwert (n = 18) ± Standardabweichung.

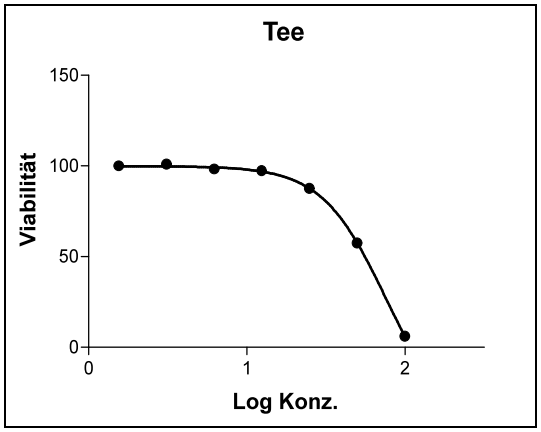


Abbildung 3.3: Dosis-Wirkungs-Kurve, *Tee-Extrakt*.
Darstellung der Dosis-Wirkungs-Beziehung zwischen dem *Tee-Extrakt* und U-5637-Zellen nach 72stündiger Inkubation. Die Viabilität wurde mittels Neutralrot-Assay bestimmt. Sie ist in Prozent zur unbelasteten Zellkontrolle angegeben. Die IC_{50} beträgt 52,15 µg/ml ± Standardabweichung 5,77.

3.2.4 Wässriger-Ethanol-Extrakt nach saurer Hydrolyse (Aq.EtOH-sh-Extrakt)

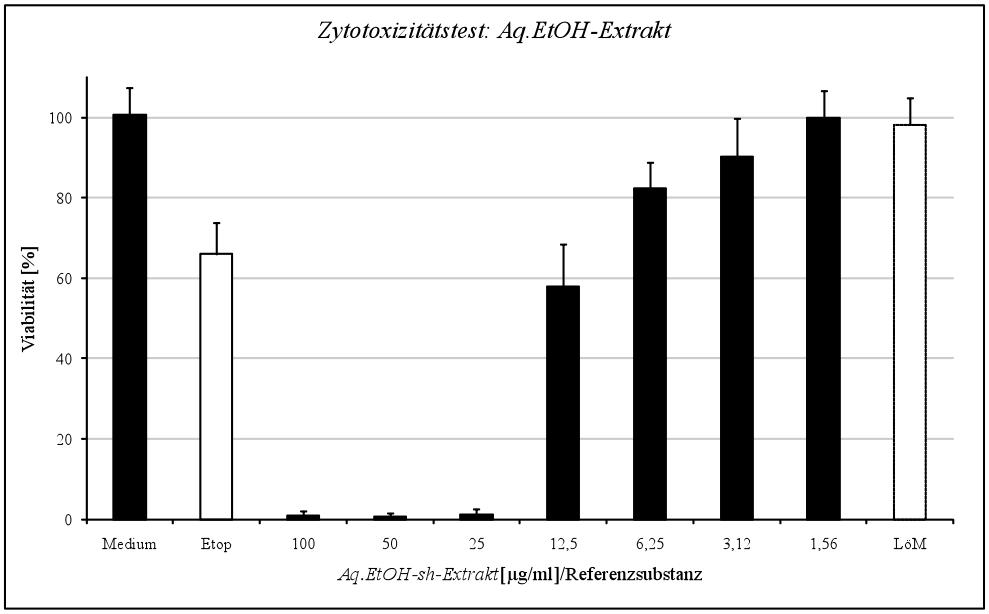


Abbildung 3.4: Darstellung der Viabilität von U-5637-Zellen nach 72stündiger Inkubation mit dem *Aq.EtOH-sh-Extrakt*..
Referenzsubstanzen: LöM = Lösungsmittelkontrolle: 0,4% MeOH; Etoposid [0,5 µM]. Bestimmung mittels Neutralrot-Assay. Viabilität der unbelasteten Zellkontrolle = 100 Prozent. Mittelwert (n = 18) ± Standardabweichung.

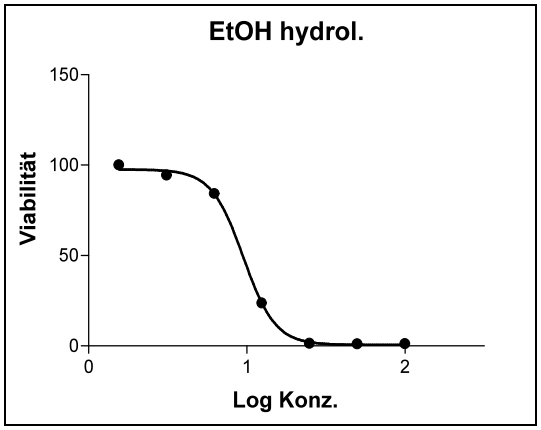


Abbildung 3.5: Dosis-Wirkungs-Kurve, *Aq.EtOH-sh-Extrakt.*
Darstellung der Dosis-Wirkungs-Beziehung zwischen U-5637-Zellen und dem *Aq.EtOH-sh-Extrakt* nach 72stündiger Inkubation. Die Viabilität wurde mittels Neutralrot-Assay bestimmt. Sie ist in Prozent zur unbelasteten Zellkontrolle angegeben. Die IC_{50} beträgt 10,77 µg/ml ± Standardabweichung 2,77.

3.2.5 Wässriger MeOH-Extrakt (MeOH-Extrakt)

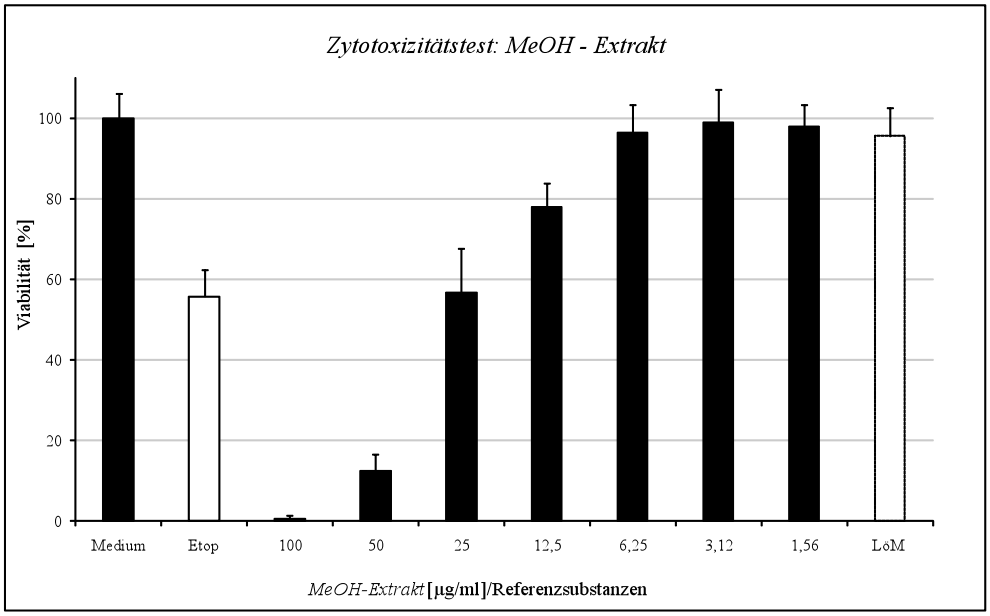


Abbildung 3.6: Darstellung der Viabilität von U-5637-Zellen nach 72stündiger Inkubation mit dem *MeOH-Extrakt*.
Referenzsubstanzen: LöM = Lösungsmittelkontrolle: 0,4% MeOH; Etop = Etoposid [0,5 µM]. Bestimmung mittels Neutralrot-Assay. Viabilität der unbelasteten Zellkontrolle = 100 Prozent. Mittelwert (n = 18) ± Standardabweichung.

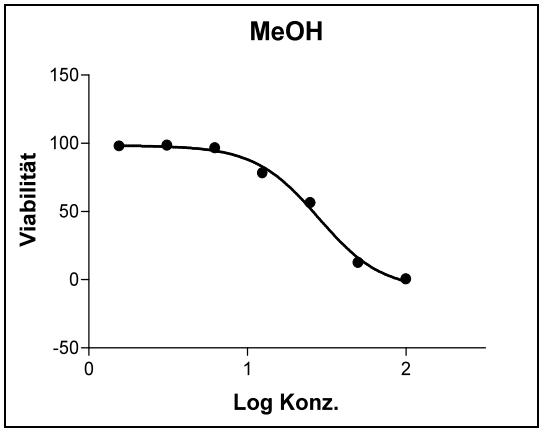


Abbildung 3.7: Dosis-Wirkungs-Kurve, *MeOH-Extrakt*.
Darstellung der Dosis-Wirkungs-Beziehung zwischen U-5637-Zellen und dem *MeOH-Extrakt* nach 72stündiger Inkubation. Die Viabilität wurde mittels Neutralrot-Assay bestimmt und ist in Prozent zur unbelasteten Zellkontrolle angegeben. Die IC_{50} beträgt 25,19 µg/ml ± Standardabweichung 3,34.

3.2.6 Wässriger-EtOH-Extrakt (Aq.EtOH-Extrakt)

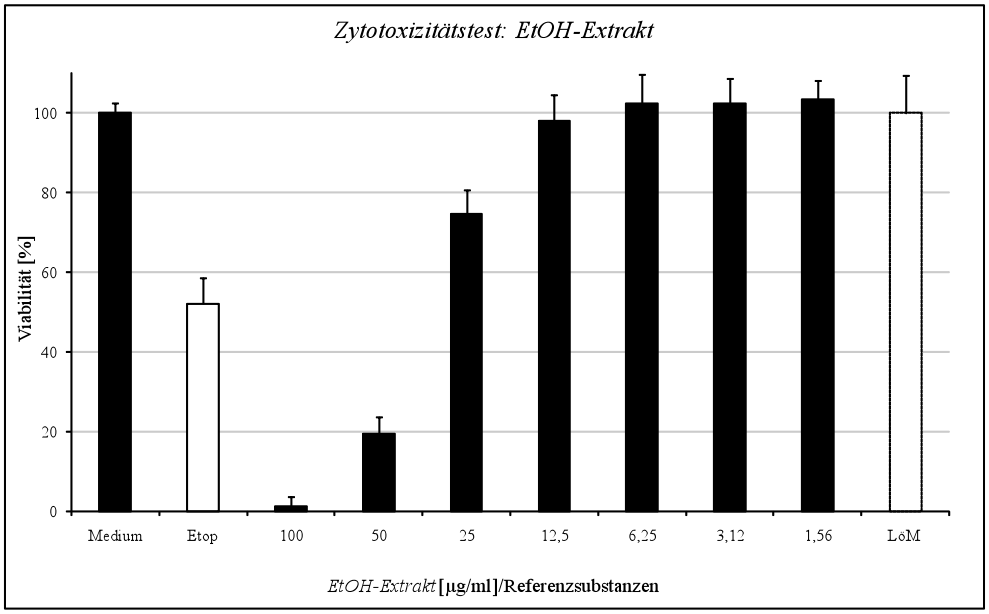


Abbildung 3.8: Darstellung der Viabilität von U-5637-Zellen nach 72stündiger Inkubation mit dem *Aq.EtOH-Extrakt*.
Referenzsubstanzen: LöM = Lösungsmittelkontrolle: 0,3% EtOH; Etop = Etoposid [0,5 µM]. Bestimmung mittels Neutralrot-Assay. Viabilität der unbelasteten Zellkontrolle = 100 Prozent. Mittelwert (n = 18) ± Standardabweichung.

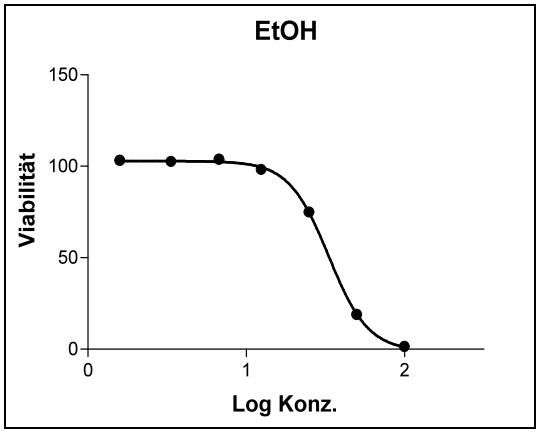


Abbildung 3.9: Dosis-Wirkungs-Kurve, *Aq.EtOH-Extrakt.*
Darstellung der Dosis-Wirkungs-Beziehung zwischen U-5637-Zellen und dem *Aq.EtOH-Extrakt* nach 72stündiger Inkubation. Die Viabilität wurde mittels Neutralrot-Assay bestimmt. Sie ist in Prozent zur unbelasteten Zellkontrolle angegeben. Die IC_{50} beträgt 33,62 µg/ml ± Standardabweichung 1,03 .

3.2.7 50%EtOH–Extrakt

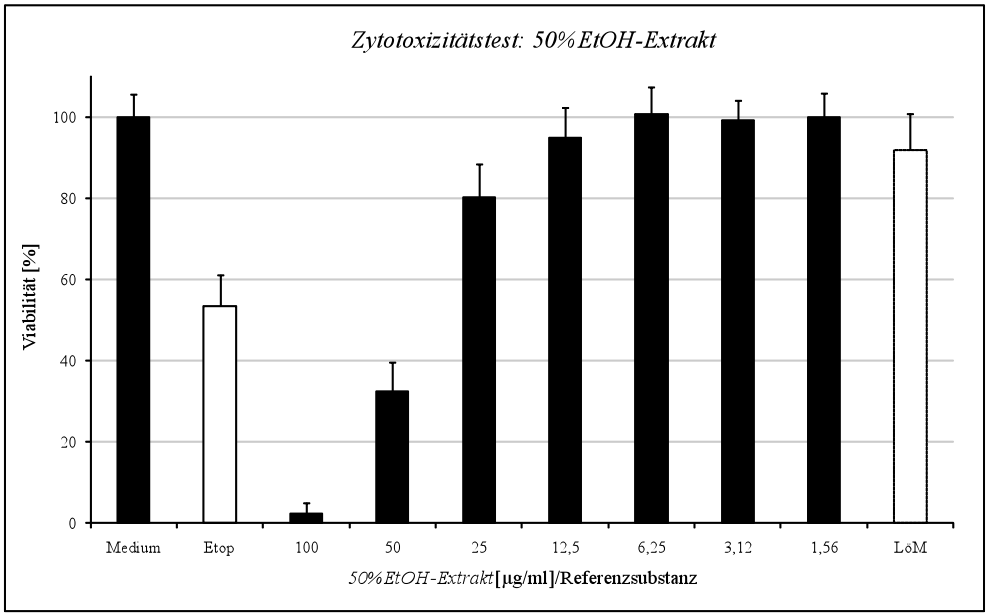


Abbildung 3.10: Darstellung der Viabilität von U-5637-Zellen nach 72stündiger Inkubation mit dem *50%EtOH-Extrakt.*
Referenzsubstanzen: LöM = Lösungsmittelkontrolle: 0,3% EtOH; Etop = Etoposid [0,5 µM]. Bestimmung mittels Neutralrot-Assay. Viabilität der unbelasteten Zellkontrolle = 100 Prozent. Mittelwert (n = 18) ± Standardabweichung.

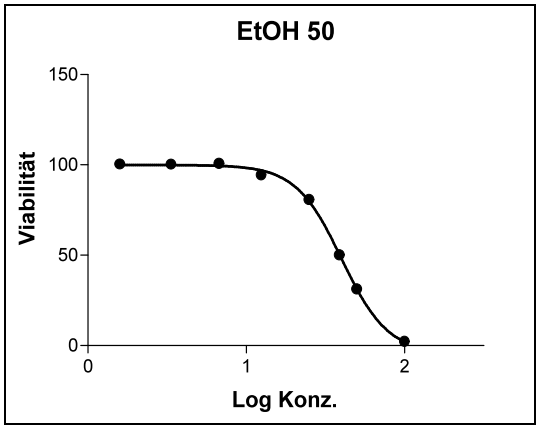


Abbildung 3.11: Dosis-Wirkungs-Kurve, *50%EtOH-Extrakt.*
Darstellung der Dosis-Wirkungs-Beziehung zwischen U-5637-Zellen und dem 50%EtOH-Extrakt nach 72stündiger Inkubation. Die Viabilität wurde mittels Neutralrot-Assay bestimmt. Sie ist in Prozent zur unbelasteten Zellkontrolle angegeben. Die IC_{50} beträgt 38,86 µg/ml ± Standardabweichung 3,33.

3.2.8 Amylase-Extrakt

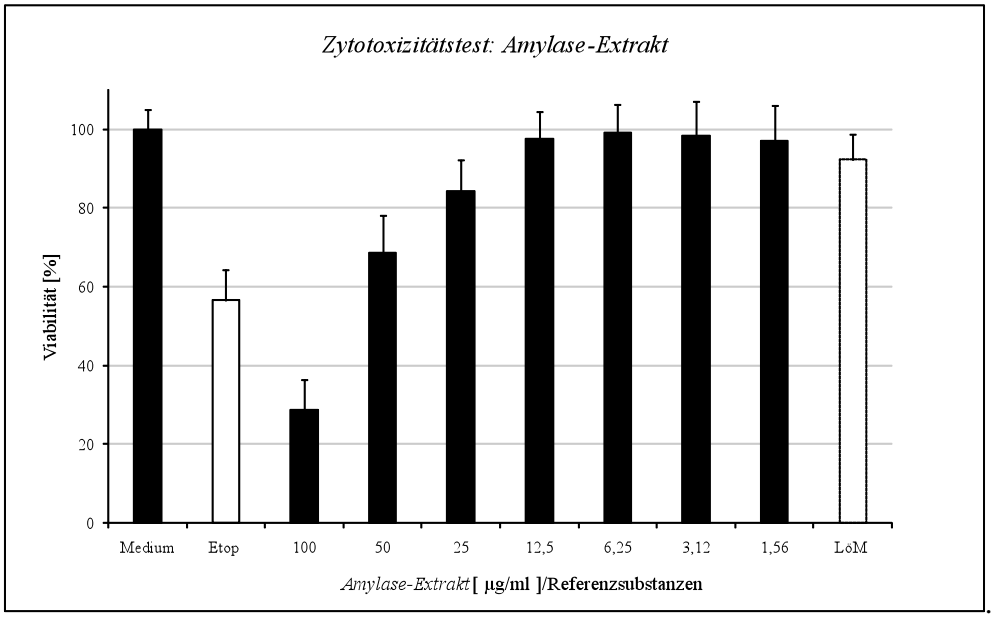


Abbildung 3.12: Darstellung der Viabilität von U-5637-Zellen nach 72stündiger Inkubation mit dem *Amylase-Extrakt*.
Referenzsubstanzen: LöM = Lösungsmittelkontrolle: 0,3% MeOH; Etop = Etoposid [0,5 µM]. Bestimmung mittels Neutralrot-Assay. Viabilität der unbelasteten Zellkontrolle = 100 Prozent. Mittelwert (n = 18) ± Standardabweichung.

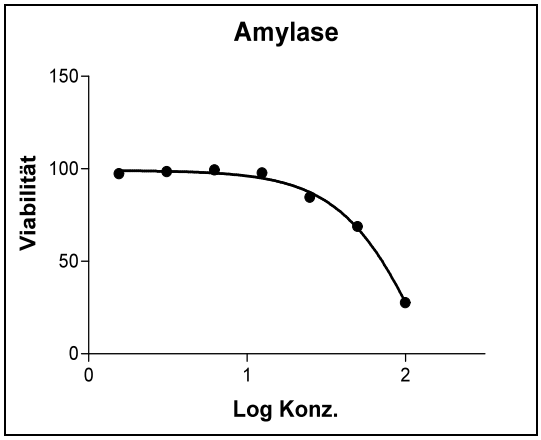


Abbildung 3.13: Dosis-Wirkungs-Kurve, *Amylase-Extrakt*.
Darstellung der Dosis-Wirk-Beziehung zwischen U-5637-Zellen und dem *Amylase-Extrakt* nach 72stündiger Inkubation. Die Viabilität wurde mittels Neutralrot-Assay bestimmt. Sie ist in Prozent zur unbelasteten Zellkontrolle angegeben. Die IC_{50} beträgt 66,55 µg/ml ± Standardabweichung 5,77.

Die ermittelten IC_{50}-Werte der Extrakte sind in Tabelle 3.1 in absteigender Systematik dargestellt. Die halbmaximale Wirkstärke liegt zwischen 10,77 - 66,55 µg/ml. Der *Aq.EtOH-sh-Extrakt* stellte sich als aktivster Extrakt heraus. Die alkoholischen Extrakte liegen im Mittelfeld. Der *Amylase-Extrakt* war am schwächsten wirksam. Der Effekt auf die Zellviabilität nimmt bei allen Extrakten mit steigender Konzentration zu.

Extrakt	***IC_{50} [µg/ml] ; (Standardabweichung)***
Aq.EtOH-sh-Extrakt	10,77 ; (2,77)
MeOH-Extrakt	25,19 ; (3,34)
Aq.EtOH-Extrakt	33,62 ; (1,03)
50% EtOH-Extrakt	38,86 ; (3,33)
Tee-Extrakt	52,15 ; (5,77)
Amylase-Extrakt	66,55 ; (8,63)

Tabelle 3.1: IC_{50}-Rangliste. *Pittosporum-angustifolium*-Extrakte gegen U-5637-Zellen.

3.3 Abhängigkeit der Zytotoxizität von der Einwirkungszeit

Alle getesteten Extrakte von *Pittosporum angustifolium* zeigten nach einer 72stündigen Inkubation zytotoxische Aktivität gegen die Tumorzelllinie U-5637 (siehe 3.2). Im Weiteren sollte der Zeitpunkt der maximalen Zellschädigung genauer eruiert werden. Es wurde dazu abermals der Neutralrot-Assay verwendet. Die Zellviabilität wurde 24, 48 und 72 h nach Extraktzugabe gemessen. Aus dem Extraktsortiment wurden drei Extrakte für die weiterführenden Untersuchungen verwendet:

Aq.EtOH-sh-Extrakt - größte Wirkstärke

Tee-Extrakt - therapeutisch empfohlen (Gliszczynski)

MeOH-Extrakt - Vertreter der alkoholischen Extrakte ohne Hydrolyse

Es wurden je Extrakt die IC_{50} und die 2fache IC_{50} eingesetzt. Als Referenz dienten drei Testsubstanzen, die durch unterschiedliche Mechanismen zur Zytotoxizität führen:

Substanz	***Zelleffekt***
Staurosporin	Apoptoseinduktion
Triton	Nekroseinduktion
Etoposid	G2-Phasen-Arrest

Tabelle 3.2: Darstellung der verwendeten Referenzsubstanzen mit dem zugehörigen Effekt auf Zellebene.

Als Negativkontrolle diente die in der Extraktlösung vorliegende Lösungsmittelkonzentration. Zur Darstellung der Ergebnisse wurde der Viabilitätswert der unbelasteten Zellkontrolle nach 72stündiger Inkubation als 100 Prozent gewertet. Die zeitabhängige Viabilitätszunahme entspricht einer Zellzahlzunahme. Die Ergebnisse zeigen folgendes:

3.3.1 Wässriger-Ethanol-Extrakt nach saurer Hydrolyse (Aq.EtOH-sh-Extrakt)

Abb.3.14 zeigt, dass die Viabilität der Zellpopulation, die mit einer Konzentration des *Aq.EtOH-sh-Extraktes*, die seiner IC_{50} entspricht, innerhalb der ersten 24 h im Vergleich zur Kontrollpopulation reduziert ist. Zwischen 24 und 72 h kommt es zu einer Zunahme des Zellwachstums. Die Zellzahl hat nach 72 h ca. 60% der Zellzahl unbelasteter Zellen erreicht.

Die Inkubation mit der 2fachen IC_{50} hemmt das Zellwachstum bis 48 h nach Extraktzugabe. Zwischen 48 und 72 h kommt es zu einer geringen Zunahme des Zellwachstums, so dass 72 h nach Extraktzugabe nur 30% der Zellzahl vorhanden sind. Eine Behandlung der Zellen mit 0,5 µM Etoposid weist einen Wachstumsverlauf ähnlich der Behandlung mit 10 µg/ml *Aq.EtOH-sh-Extrakt* auf.

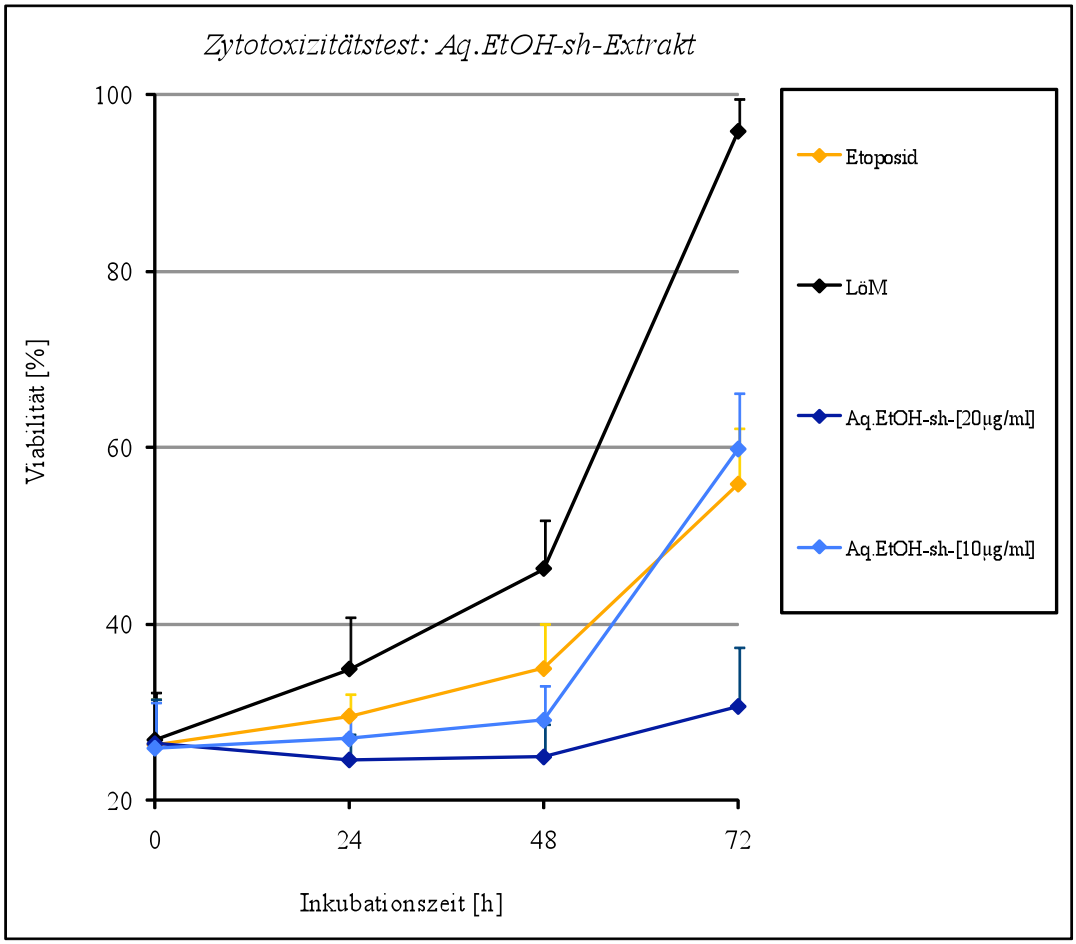


Abbildung 3.14: Darstellung der Viabilität von U-5637-Zellen in Anhängigkeit von der Zeit der Inkubation mit *Aq.EtOH-sh-Extrakt*. Referenzsubstanzen: LöM = Lösungsmittelkontrolle: EtOH [0,3%] und Etoposid [0,5 µM]. Bestimmung mittels Neutralrot-Assay. Viabilität der Zellkontrolle (72 h inkubiert) = 100 Prozent. Die Darstellung zeigt den Mittelwert (n = 18) ± Standardabweichung.

3.3.2 Tee-Extrakt

Abbildung 3.15 zeigt eine konzentrationsabhängige Wachstumshemmung durch den *Tee-Extrakt*. Diese Wachstumshemmung hält sowohl bei einer Inkubation mit 50 µg/ml wie mit 100 µg/ml *Tee-Extrakt* über 48 h an. Tatsächlich führt die Behandlung mit 100 µg/ml *Tee-Extrakt* sogar zu einer geringfügigen Reduktion der Zellzahl. Nach 48 h Inkubationszeit setzt bei beiden Konzentrationen Zellwachstum ein. Während bei der Behandlung mit 50 µg/ml *Tee-Extrakt* nach 72 h ca. 50% der Zellzahl der Kontrollpopulation erreicht werden, liegt diese bei der Behandlung mit 100 µg/ml *Tee-Extrakt* bei nur 30%. Die Inkubation mit Staurosporin hemmt das Zellwachstum über 24 h, anschließend kommt es zu einem Anstieg der Zellzahl. Das Zellwachstum unter Behandlung mit 8 nM Staurosporin ist mit dem der Behandlung mit 50 µg/ml *Tee-Extrakt* vergleichbar.

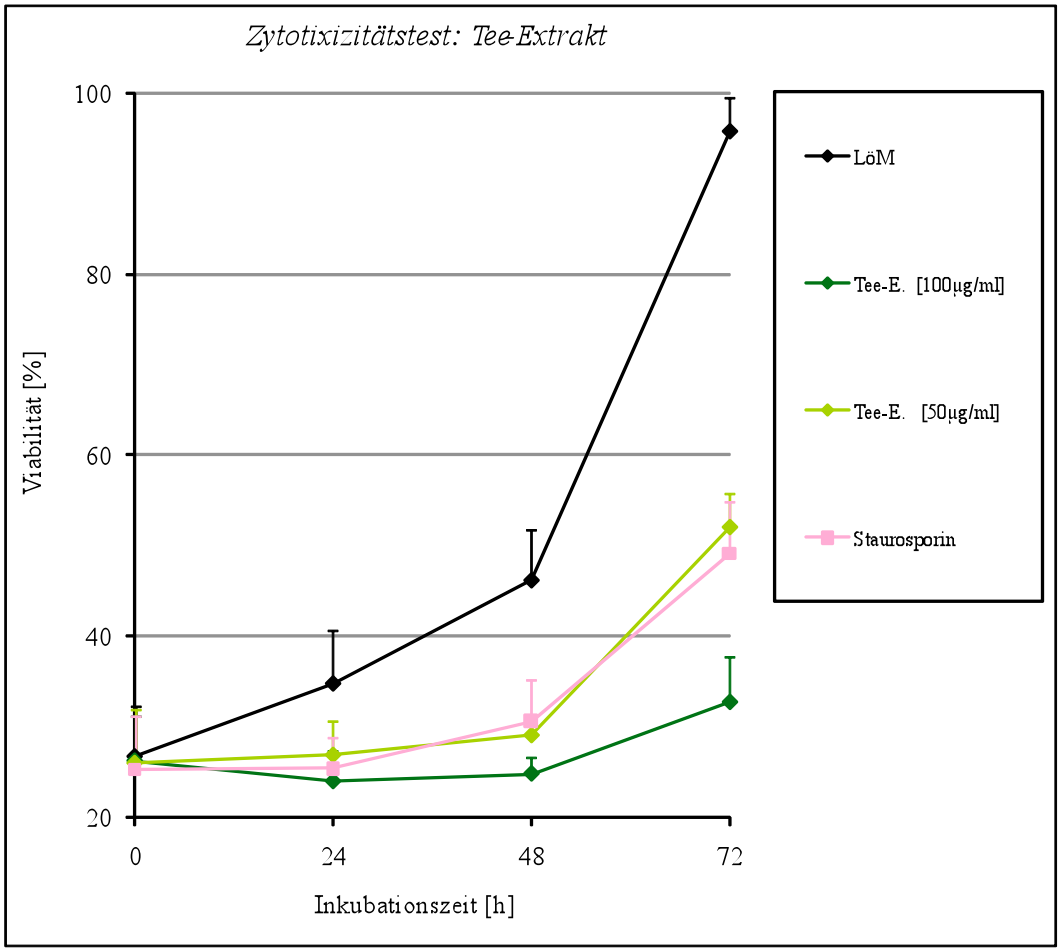


Abbildung 3.15: Darstellung Viabilität von U-5637-Zellen in Abhängigkeit von der Zeit der Inkubation mit *Tee-Extrakt*.
Referenzsubstanzen: LöM = Lösungsmittelkontrolle: EtOH [0,3%] und Staurosporin [8 nM]. Bestimmung mittels Neutralrot-Assay. Viabilität der Zellkontrolle (72 h inkubiert) = 100 Prozent. Die Darstellung zeigt den Mittelwert (n = 18) ± Standardabweichung.

3.3.3 Wässriger MeOH-Extrakt (MeOH-Extrakt)

Abb 3.16 stellt dar, dass mit steigender Extraktkonzentration das Zellwachstum gehemmt wird. Diese Wachstumshemmung hält sowohl bei einer Inkubation mit 25 µg/ml wie mit 50 µg/ml *Methanol-Extrakt* über 24 h an. Durch 25 µg/ml *Methanol-Extrakt* setzt nach 24 h Inkubation Zellwachstum ein. Bei 50 µg/ml *Methanol-Extrak*t kommt es nach gleicher Zeit zu einer deutlichen Zellzahlreduktion. Das Zellwachstum setzt erst nach 48 Inkubationsstunden ein. Während bei der Behandlung mit 25 µg/ml *MeOH-Extrakt* nach 72 h ca. 58% der Zellzahl der Kontrollpopulation erreicht werden, liegt diese bei der Behandlung mit 50 µg/ml *Methanol-Extrakt* bei nur ca 37%. Die Inkubation mit Staurosporin hemmt das Zellwachstum über 24 h, anschließend kommt es zu einem Anstieg der Zellzahl. Eine Behandlung der Zellen mit 8 nM Staurosporin weist einen Wachstumsverlauf ähnlich der Behandlung mit 25 µg/ml *Methanol-Extrakt* auf.

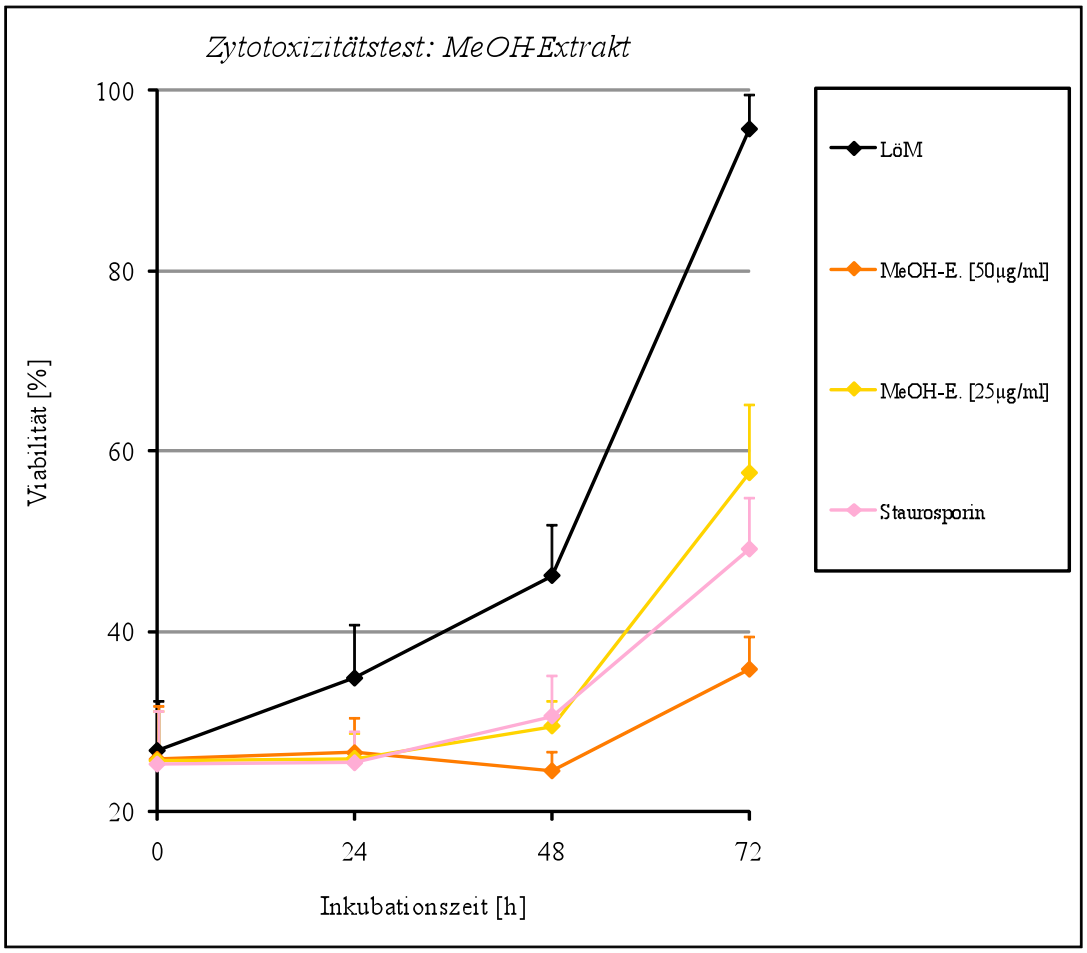


Abbildung 3.16: Darstellung Viabilität von U-5637-Zellen in Anhängigkeit von der Zeit der Inkubation mit *MeOh-Extrakt*.
Referenzsubstanzen: LöM = Lösungsmittelkontrolle: EtOH [0,3%]; Staurosporin [8 nM]. Bestimmung mittels Neutralrot-Assay. Viabilität der Zellkontrolle (72 h inkubiert) = 100 Prozent. Die Darstellung zeigt Mittelwerte (n = 18) ± Standardabweichung.

3.3.4 Lösungsmittelkontrolle

Zur Lösung der Extrakte in Medium wurde ein alkoholisches Lösungsmittel benötigt. Um die Effekte des Lösungsmittels von den Effekten der Extrakte abzugrenzen, wurde als Lösungsmittelkontrolle die höchste Lösungsmittelkonzentration, welche im *Tee-Extrakt* mitgeführt worden war, gewählt. Abb.3.14 und Abb. 9.1 (Anhang) zeigen die Ergebnisse. Ersichtlich ist, dass der Lösungsmitteleffekt die Viabilität der Population nur minimal reduziert. Der Effekt macht sich zwischen 24 und 48 h bemerkbar. Davor und danach besteht kein Unterschied zur unbehandelten Zellkontrolle.

3.4 Einfluss der Extrakte und Referenzsubstanzen auf den Zellzyklus

Bei der Inkubation mit den Extrakten von *Pittosporum angustifolium* kommt es zu einer konzentrations- und zeitabhängigen Viabilitätsminderung von U-5637 Zellen (3.3). Ursächlich kann eine Störung im Zellzyklus sein. Um diese Fragestellung detaillierter zu beantworten, wurde der Einfluss der Extrakte auf die Zellzyklusphasen mittels Durchflusszytometrie quantitativ bestimmt.

Die Tumorzellen wurden mit den Extrakten: *Tee-, Aq.EtOH-sh-* und *MeOH-Extrakt* unter drei Konzentrationen für 72 h inkubiert, fixiert, mit Propidium-Iodid angefärbt und im Durchflusszytometer gemessen. Es wurden folgende Kontroll-Substanzen mitgeführt:

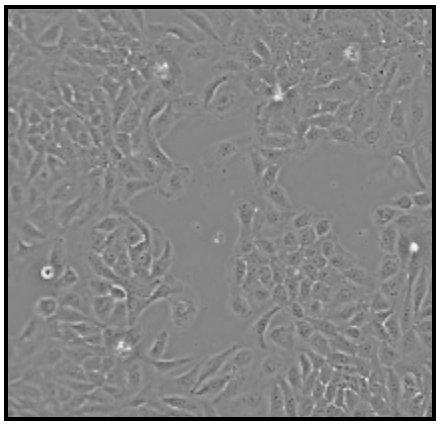
Staurosporin :

Staurosporin induziert Apoptose. Im Durchflusszytometer werden apoptotische Zellen in der Sub-G1-Phase dargestellt. Nach der Behandlung von U-5637-Zellen mit ihrer IC_{50} von 8 nM Staurosporin sollte ein Zellzahlanstieg in der Sub-G1-Phase im Durchflusszytometer messbar sein.

Etoposid:

Das Zytostatikum Etoposid inhibiert die intrazelluläre Topoisomerase II, deren Expression Zellzyklusabhängig ist (Schmoll et al. 1981). Die Inihibiton durch Etoposid lässt die Zelle in der G2-Phase des Zellzyklusses arretieren. Nach der Behandlung von U-5637-Zellen mit Etoposid sollte ein Zellzahlanstieg in der G_2-Phase messbar sein.

3.4.1 Tee-Extrakt



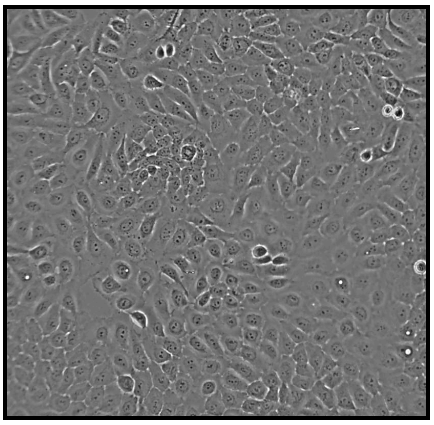


Abbildung 3.17 (li): U-5637-Zellen nach 72stündiger Inkubation mit 100 µg/ml *Tee-Extrakt*.
Der Zellrasen ist ausgedünnt. Die Zellmorphologie ist in Form und Größe heterogen. 100-fache Vergößerung.
Abbildung 3.18 (re): U-5637-Zellen nach 72stündiger Inkubation mit der Lösungsmittelkontrolle.
Es zeigt sich ein konfluentes Monolayer. 100-fache Vergößerung.

3.4.1.1 Sub-G1-Phase

Abb.3.19 zeigt eine Zellzahlerhöhung in der Sub-G1-Phase nach der Inkubation mit dem *Tee-Extrakt* ab [25 µg/ml] im Vergleich zur Zellkontrolle. Unter der Konzentration von 100 µg/ml *Tee-Extrakt* ist der Anstieg statistisch signifikant.

8 nM Staurosporin bewirken einen hoch signifikanten Anstieg der Zellzahl im Vergleich zur Zellkontrolle. Die Inkubation mit der Lösungsmittelkontrolle zeigt keinen Effekt.

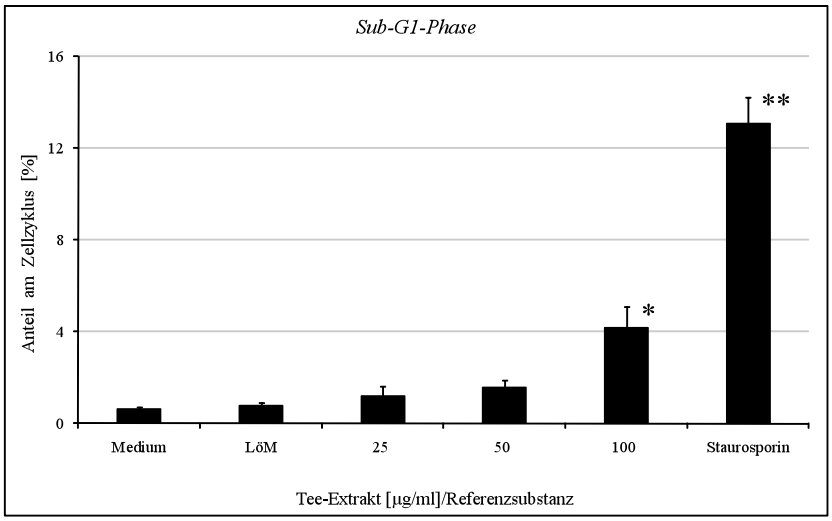


Abbildung 3.19: Zellzyklusdarstellung von U-5637-Zellen, Sub-G1-Phase nach 72stündiger Inkubation mit dem *Tee*-Extrakt.
Referenzsubstanzen: LöM = Lösungsmittelkontrolle: EtOH [0,3%], Staurosporin [8 nM]. Bestimmung mittels Durchflusszytometer/Propidium-Iodid-Färbung. Mittelwert (n = 3) ± Standardabweichung. * = signifikant ($p < 0,05$) ; ** = hoch signifikant ($p < 0,001$) im Bonferroni-Test.

3.4.1.2 G1/G0-Phase

Weder die *Tee-Extrakt*- noch die Lösungsmittelinkubation verändern den Anteil der Zellen in der G1/G0-Phase nach 72stündiger Inkubation (Abb.3.20).

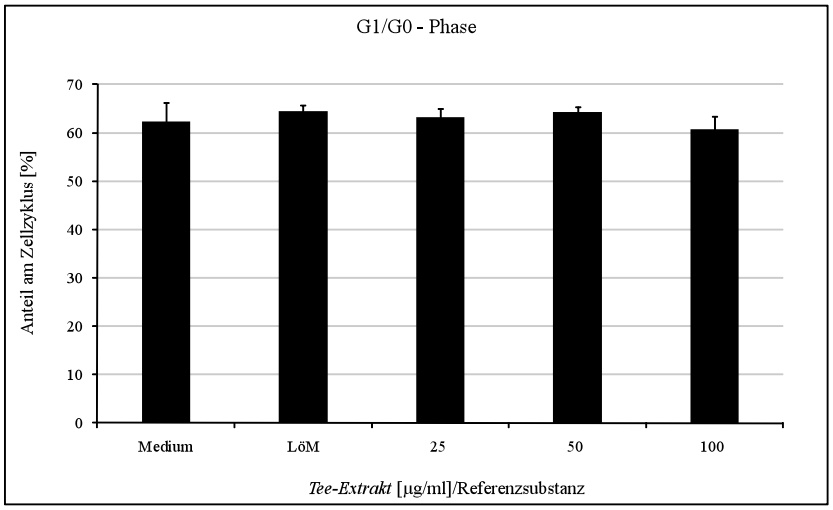


Abbildung 3.20: Zellzyklusdarstellung von U-5637-Zellen, G1/G0-Phase nach 72stündiger Inkubation mit dem *Tee-Extrakt*.
Referenzsubstanzen: LöM = Lösungsmittelkontrolle: EtOH [0,3%]. Bestimmung mittels Durchflusszytometer/ Propidium-Iodid-Färbung. Mittelwert (n = 3) ± Standardabweichung.

3.4.1.3 S-Phase

Es zeigt sich ein geringfügiger Anstieg des Anteils der Zellen in der S-Phase nach der Inkubation mit der Lösungsmittelkontrolle und dem *Tee-Extrakt* (Abb.3.21).

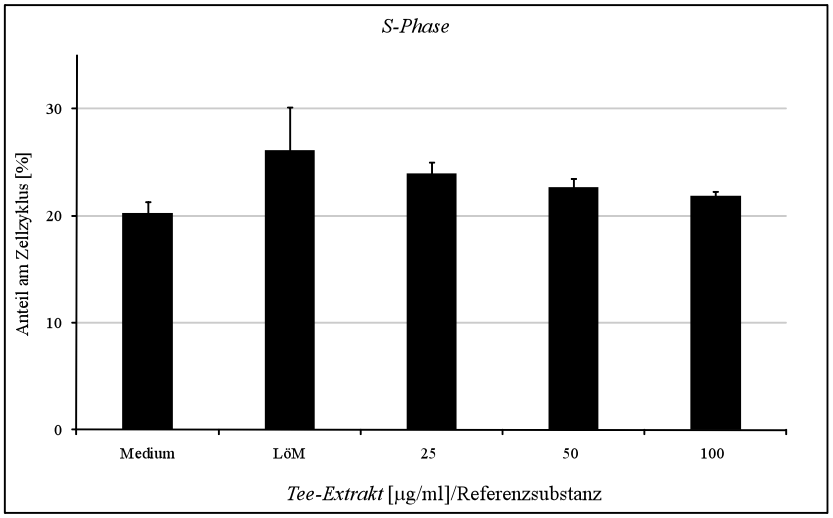


Abbildung 3.21: Zellzyklusdarstellung von U-5637-Zellen, S-Phase nach 72stündiger Inkubation mit dem *Tee-Extrakt*.
Referenzsubstanzen: LöM = Lösungsmittelkontrolle: EtOH [0,3%]. Bestimmung mittels Durchflusszytometer/Propidium-Iodid-Färbung. Mittelwert (n = 3) ± Standardabweichung.

3.4.1.4 G2/M-Phase

Abb.3.22 zeigt, dass die drei Extraktkonzentrationen 25, 50 und 100 µg/ml den Anteil der Zellen in der G2/M-Phase in etwa gleichem Maße leicht erniedrigen. Die mit dem Lösungsmittel behandelten Zellen zeigen ebenfalls kleinere Werte als die unbehandelte Zellkontrolle. Die Inkubation mit Etoposid erzielt einen statistisch hochsignifikanten Anstieg der Zellzahlen in dieser Zellzyklusphase.

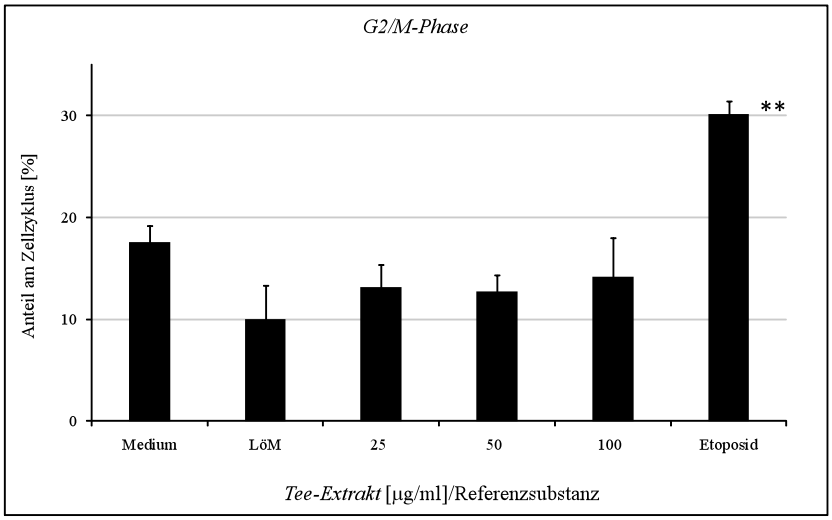
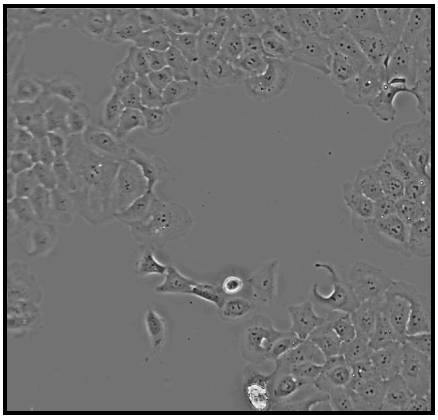


Abbildung 3.22: Zellzyklusdarstellung von U-5637-Zellen, G2/M-Phase nach 72stündiger Inkuabtion mit dem *Tee-Extrakt*. Referenzsubstanzen: LöM = Lösungsmittelkontrolle: EtOH [0,3%]; Etoposid [0,5 µM]. Bestimmung mittels Durchflusszytometer/Propidium-Iodid-Färbung. Mittelwert (n = 3) ± Standardabweichung.

3.4.2 Aq.EtOH-sh-Extrakt



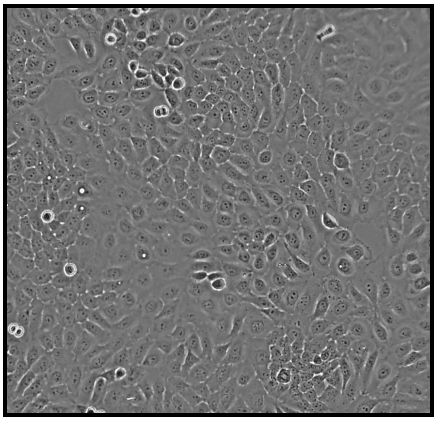


Abbildung 3.23 (li): U-5637-Zellen nach 72stündiger Inkubation mit 20 µg/ml *Aq.EtOH-sh-Extrakt*.
Der Zellrasen ist ausgedünnt. Die Zellmorphologie ist in Form und Größe heterogen. Extraktanteile sind während der Inkubation ausgefallen.
Abbildung 3.24 (re): U-5637-Zellen nach 72stündiger Inkubation mit der Lösungsmittelkontrolle.
Es zeigt sich ein konfluentes Monolayer. 100-fache Vergößerung.

3.4.2.1 Sub-G1-Phase

Abb.3.25 zeigt, dass 15 µg/ml des Extraktes zu einer Zellzahlerhöhung in der Sub-G1-Phase führen. Statistisch signifikant ist der Anstieg der Zellzahl durch Etoposid bzw. hochsignifikant durch Staurosporin.

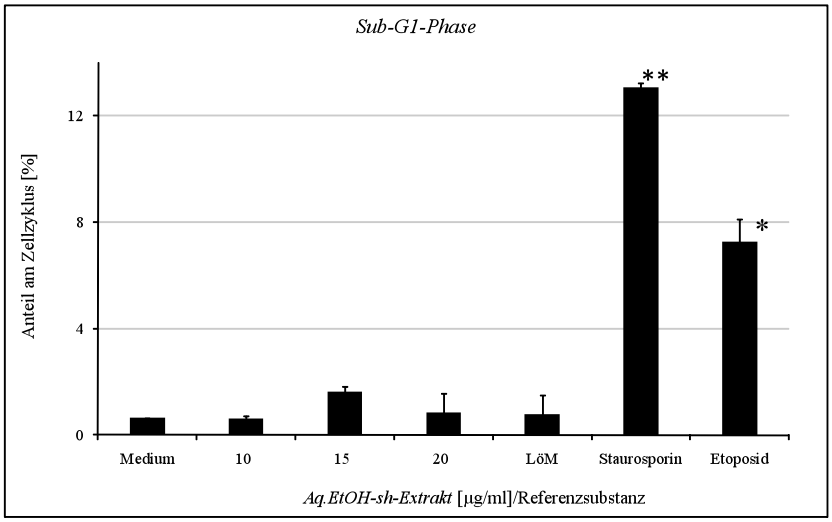


Abbildung 3.25: Zellzyklusdarstellung von U-5637-Zellen, Sub-G1-Phase nach 72stündiger Inkubation mit dem *Aq.EtOH-sh-Extrakt*.
Referenzsubstanzen: LöM = Lösungsmittelkontrolle: MeOH [0,4%]; Etoposid [0,5 µM]. Bestimmung mittels Durchflusszytometer/Propidium-Iodid-Färbung. Mittelwert (n = 3) ± Standardabweichung. * = signifikant ($p < 0,05$) ;** = hoch signifikant ($p < 0,001$) im Bonferroni-Test.

3.4.2.2 G1/G0-Phase

Abb.3.26 zeigt eine Abnahme der Zellzahl in der G1/G0-Phase nach 72stündiger Behandlung mit dem *Aq.EtOH-sh-Extrakt.* Der Effekt ist konzentrationsunabhängig.

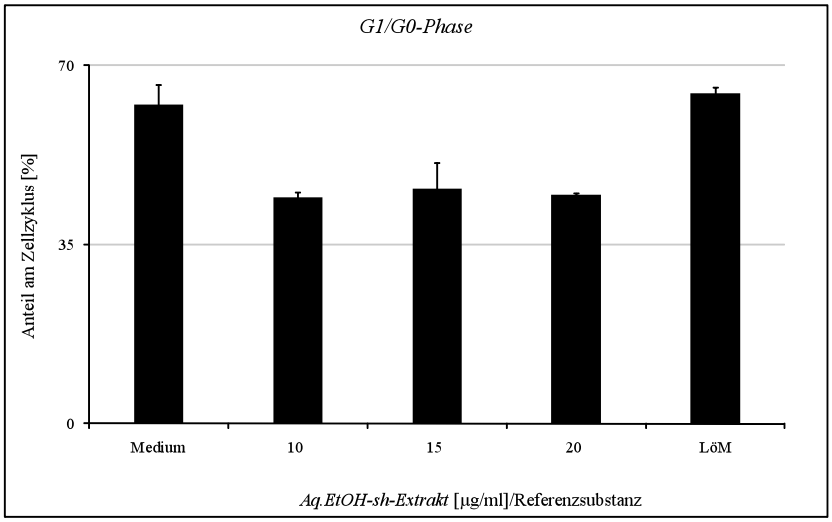


Abbildung 3.26: Zellzyklusdarstellung von U-5637-Zellen, G1/G0-Phase nach 72stündiger Inkubation mit dem *Aq.EtOH-sh-Extrakt.* LöM = Lösungsmittelkontrolle: MeOH [0,4%]. Bestimmung mittels Durchflusszytometer/ Propidium-Iodid-Färbung. Mittelwert (n = 3) ± Standardabweichung.

3.4.2.3 S-Phase

In der Abb.3.27 präsentieren sich die Zellzahlwerte für die S-Phase nach der Behandlung mit 15 bzw. 20 µg/ml *Aq.EtOH-sh-Extrakt*. Die Werte sind geringfügig höher als die Werte der unbehandelten Zellkontrolle.

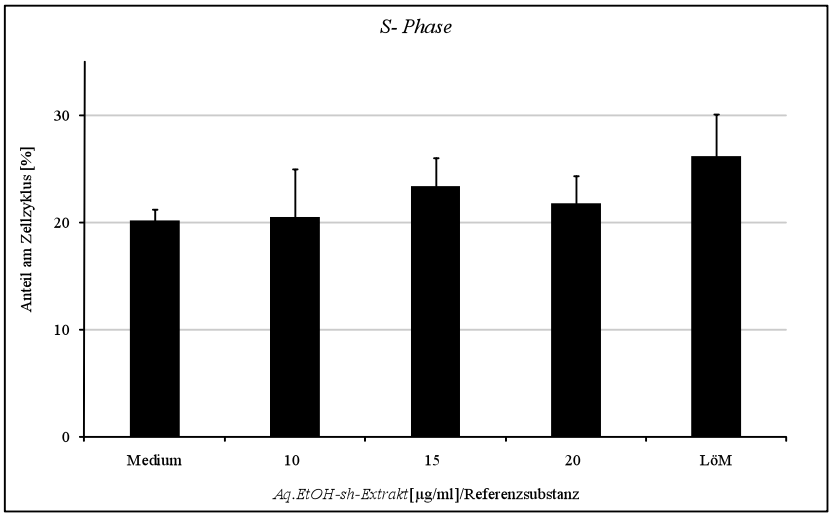


Abbildung 3.27: Zellzyklusdarstellung von U-5637-Zellen, S-Phase nach 72stündiger Inkubation mit dem *Aq.EtOH-sh-Extrakt.* Bestimmung mittels Durchflusszytometer/ Propidium-Iodid-Färbung. LöM = Lösungsmittelkontrolle: MeOH [0,4%]. Mittelwert (n = 3) ± Standardabweichung.

3.4.2.4 G2/M-Phase

Abb.3.28 zeigt eine Abnahme der Zellzahl in der G2/M-Phase nach 72stündiger Behandlung mit dem *Aq.EtOH-sh-Extrakt.* Die drei verschiedenen Konzentrationen haben einen gleichwertigen Effekt.

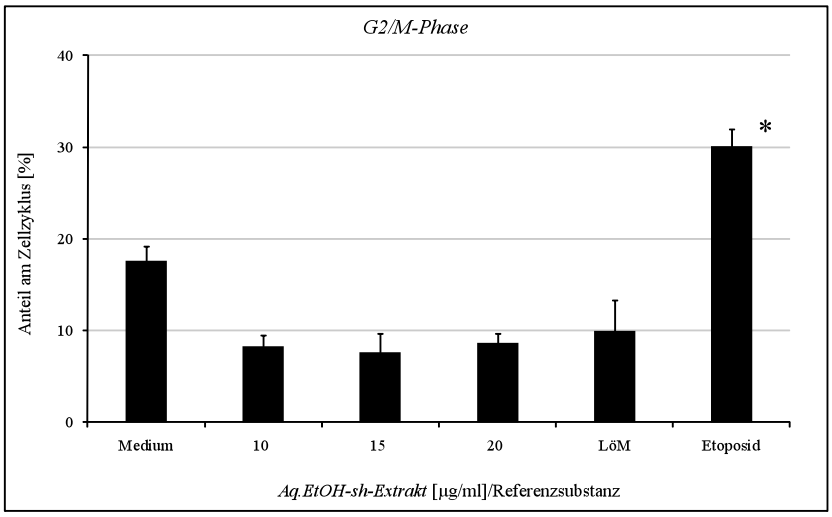
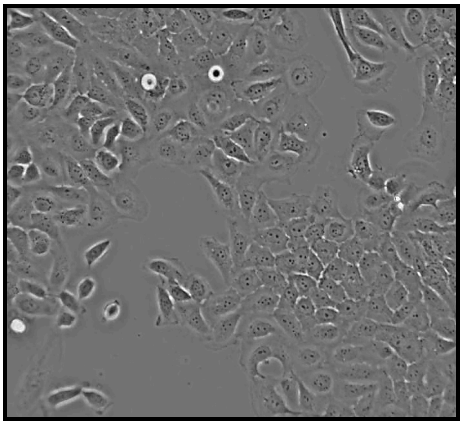


Abbildung 3.28: Zellzyklusdarstellung von U-5637-Zellen, G2/M-Phase nach 72stündiger Inkubation mit dem *Aq.EtOH-sh-Extrakt*. Referenzsubstanzen: LöM = Lösungsmittelkontrolle: MeOH [0,4%]; 0,5 µM Etoposid. Bestimmung mittels Durchflusszytometer/Propidium-Iodid-Färbung. Mittelwert (n = 3) ± Standardabweichung.* = signifikant ($p < 0,05$) im Bonferroni-Test.

3.4.3 MeOH-Extrakt



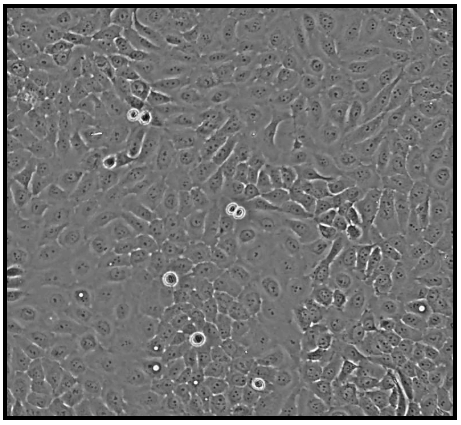


Abbildung 3.29 (li): U-5637-Zellen nach einer 72stündigen Inkubation mit 50 µg/ml *MeOH-Extrakt*.
Der Zellrasen ist ausgedünnt. 100-fache Vergößerung. Viele abgelöste Zellen fluktuieren im Medium
Abbildung 3.30 (re): U-5637 Zellen nach 72stündiger Inkubation mit der Lösungsmittelkontrolle.
Es zeigt sich ein konfluentes Monolayer. 100-fache Vergößerung.

3.4.3.1 Sub-G1-Phase

Abb.3.31zeigt eine steigende Zellzahl unter steigender Konzentration nach der Inkubation mit dem *MeOH-Extrakt*. 8 nM Staurosporin bewirken einen hoch signifikanten Anstieg der Zellzahl im Vergleich zur unbehandelten Zellkontrolle.

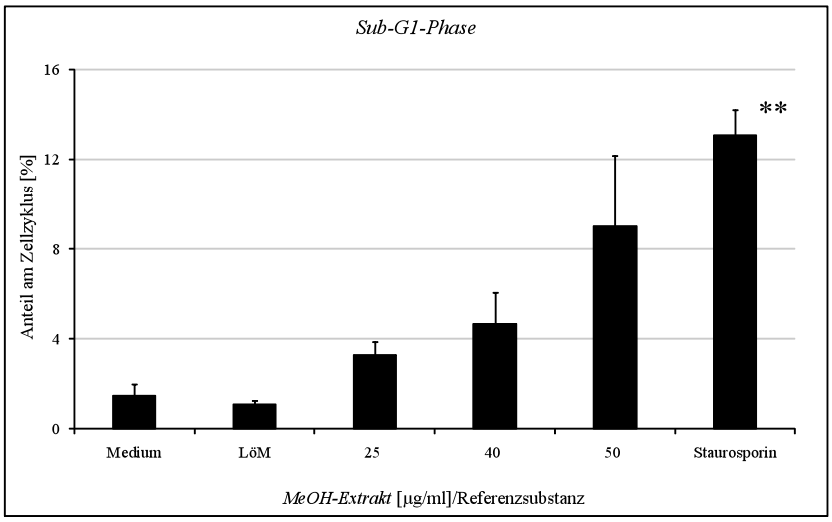


Abbildung 3.31: Zellzyklusdarstellung von U-5637-Zellen, Sub-G1-Phase nach 72stündiger Inkubation mit dem *MeOH-Extrakt*.
Referenzsubstanzen: LöM = Lösungsmittelkontrolle MeOH [0,4%]; Staurosporin [8 ηM]. Bestimmung mittels Durchflusszytometer/Propidium-Iodid-Färbung. Mittelwert (n = 3) ± Standardabweichung. ** = hoch signifikant ($p < 0{,}001$) im Bonferroni-Test.

3.4.3.2 G1/G0-Phase

Der *MeOH-Extrakt* zeigt keinen Einfluss auf den Anteil der Zellen in der G2/M-Phase. Das Lösungsmittel zeigt keinen Einfluss, Abb.3.32.

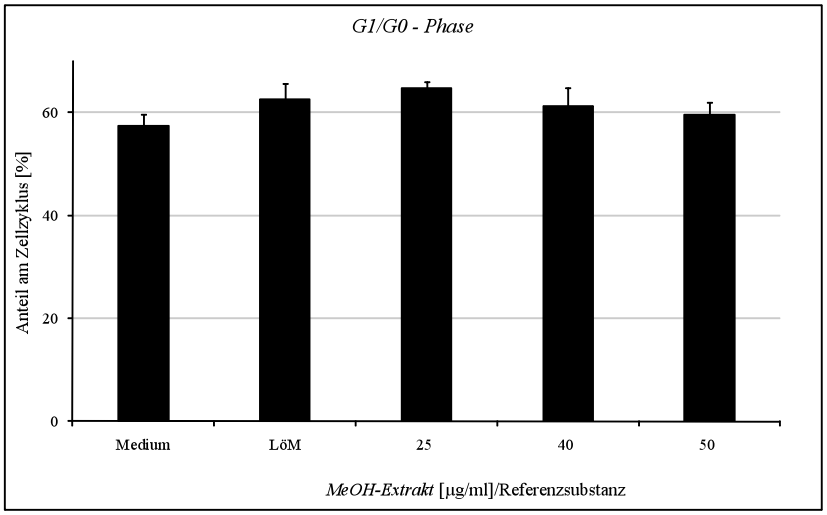


Abbildung 3.32: Zellzyklusdarstellung von U-5637-Zellen, G1/G0-Phase nach 72stündiger Inkubation mit dem MeOH-Extrakt. Referenzsubstanzen: LöM = Lösungsmittel: MeOH [0,4%]. Bestimmung mittels Durchflusszytometer/ Propidium-Iodid-Färbung. Mittelwert (n = 3) ± Standardabweichung.

3.4.3.3 S-Phase

Abb.3.33 zeigt, dass der *MeOH-Extrakt* keinen Einfluss auf den Anteil der Zellen in der S-Phase hat.

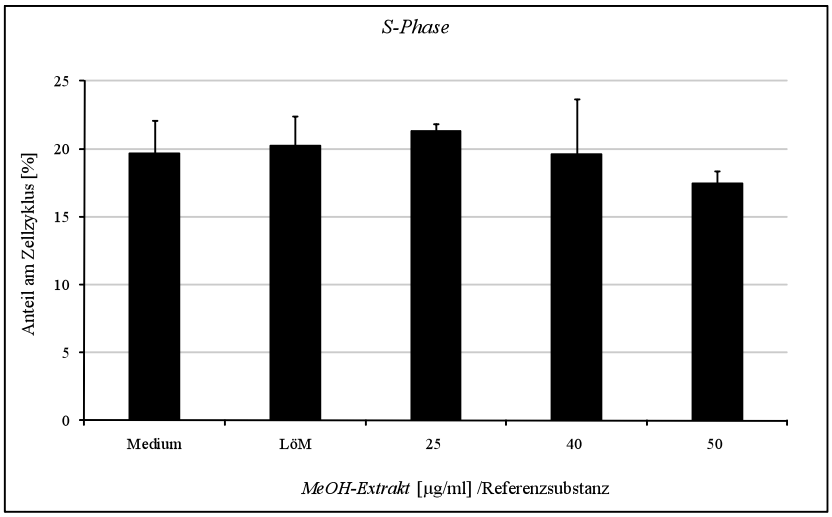


Abbildung 3.33: Zellzyklusdarstellung von U-5637-Zellen, S-Phase nach 72stündiger Inkubation mit dem *MeOH-Extrakt*. Referenzsubstanzen: LöM = Lösungsmittelkontrolle: MeOH [0,4%]. Bestimmung mittels Durchflusszytometer/Propidium-Iodid-Färbung. Mittelwert (n = 3) ± Standardabweichung.

3.4.3.4 G2/M-Phase

Der *MeOH-Extrakt* erniedrigt leicht den Anteil der Zellen in der G2/M-Phase. Etoposid dagegen zeigt einen signifikanten Anstieg, Abb.3.34.

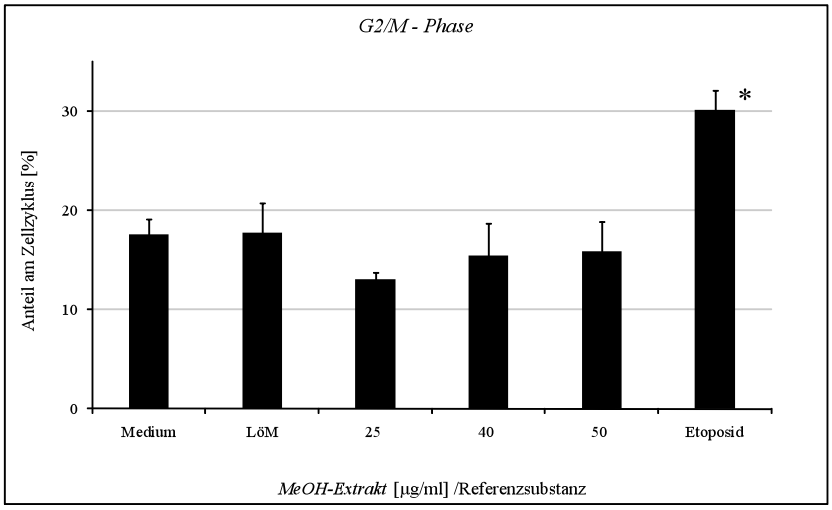


Abbildung 3.34: Zellzyklusdarstellung von U-5637-Zellen, G2/M-Phase nach 72stündiger Inkubation mit dem *MeOH-Extrakt*. Referenzsubstanzen: LöM = Lösungsmittelkontrolle: MeOH [0,4%]; Etoposid [0,5 µM]. Bestimmung mittels Durchflusszytometer/Propidium-Iodid-Färbung. Mittelwert (n = 3) ± Standardabweichung. * = signifikant ($p < 0,05$) im Bonferroni-Test.

3.4.4 Referenzsubstanzen

3.4.4.1 Etoposid

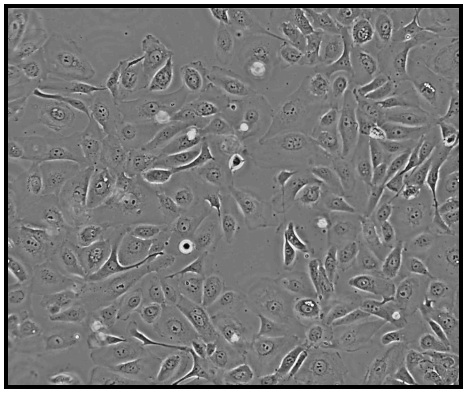


Abbildung 3.35: U-5637-Zellen nach 72stündiger Inkubation mit 0,5 µM Etoposid.
Der Zellrasen ist ausgedünnt. Die Zellkörper wirken geschwollen. Viele abgelöste Zellen fluktuierten im Mediumüberstand.

Beobachtete Effekte auf den Zellzyklus:

Abb.3.25 zeigt im Vergleich zur unbehandelten Zellkontrolle eine signifikante Zellzahlerhöhung in der Sub-G1-Phase nach der Inkubation mit 0,5 µM Etoposid. Abb.3.34 zeigt eine signifikante Zellzahlerhöhung in der G2/M-Phase.

3.4.4.2 Staurosporin

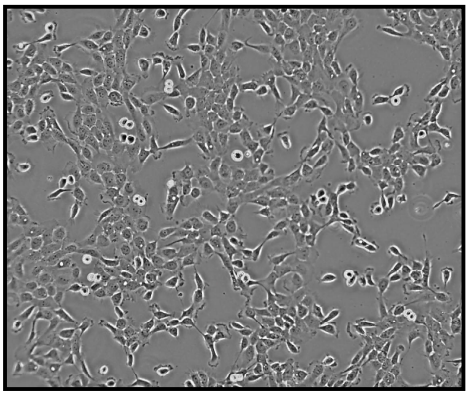


Abbildung 3.36: U-5637-Zellen nach einer 72stündigen Inkubation mit 8 nM Staurosporin.
Die Zellkörper sind in die Länge gezogen. Die Morphologie ähnelt nicht der Morphologie der mit Extrakt behandelter Zellen (vergleiche: Abb.3.17,Abb.3.23, Abb.29). Der Zellrasen ist ausgedünnt. Viele Zellen fluktuieren im Mediumüberstand.

Beobachtete Effekte auf den Zellzyklus:

Abb.3.25 zeigt einen hoch signifikant erhöhten Anteil an Zellen, die sich nach der Inkubation mit 8 nM in der Sub-G1 Phase befinden.

3.5 Abhängigkeit der Zellzyklusverteilung von der Einwirkungszeit der Extrakte

Die Behandlung mit drei Extrakten von *Pittosporum angustifolium* bewirkte einen Zellzahlanstieg in der Sub-G1-Phase von U-5637-Zellen nach einer Inkubationszeit von 72 h. Durch Zytotoxizitätstests zeigte sich (siehe 3.3), dass die stärksten Einflüsse auf die Viabilität innerhalb von 24 bzw. 48 h eintreten (IC_{50} bzw. 2fache IC_{50} verwendet). Die Betrachtung des Zellzyklus sollte daher zu den Zeiten 8, 24, 48 und 72 h nach Extraktzugabe erfolgen. Gemessen wurde die Beeinflussung des Zellzyklus der U-5637-Zelllinie nach einer Inkubation mit dem *Tee-Extrakt* und dem *Aq.EtOH-sh-Extrakt* mittels Durchflusszytometer und Propidium-Iodid-Färbung. Im Folgenden werden die Ergebnisse dargestellt.

3.5.1 Tee-Extrakt

Unter der Inkubation mit dem *Tee-Extrakt* erfolgt ein Zellzahlanstieg in der Sub-G1-Phase zu allen Messzeiten. Der Maximalwert liegt nach 24stündiger Inkubation vor (Abb.3.37). Für die G1-, S-, oder G2/M-Phase ergeben sich zu keinem Messzeitpunkt Veränderungen (Abb3.38, Abb.3.39, Abb.3.40).

Lösungsmittelkontrolle:

Die Lösungsmittelkontrolle zeigte keine deutlichen Verschiebungen (Abb.3.37, Abb.3.38, Abb.3.39 und Abb.3.40).

3.5.1.1 Sub-G1-Phase

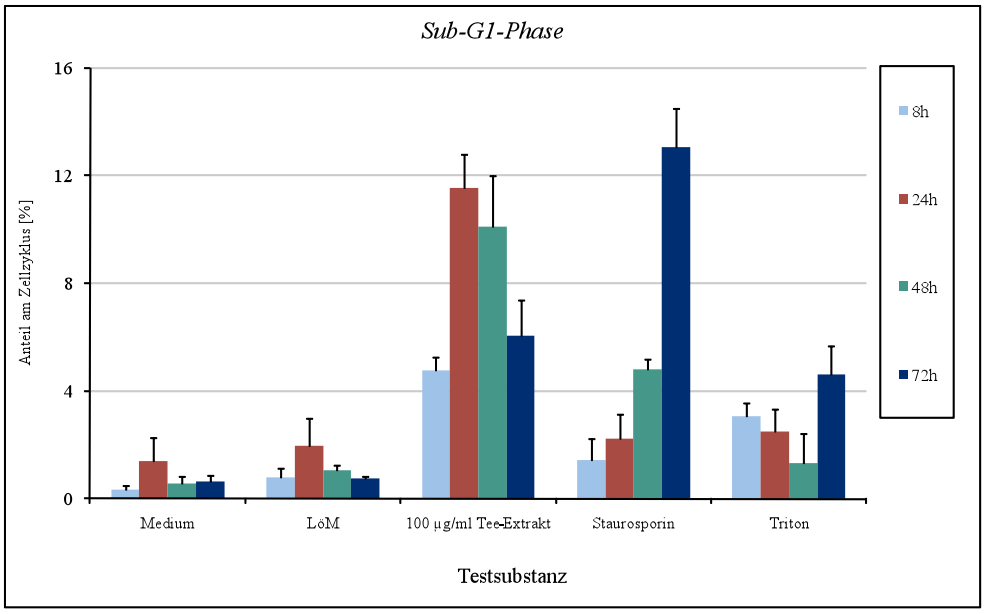


Abbildung 3.37: Zellzyklusdarstellung von U-5637-Zellen nach 100 µg/ml *Tee-Extrakt*-Inkubation, Sub-G1-Phase in Abhängigkeit von der Zeit.
Die Zellzyklusbetrachtung erfolgte mittels Durchflusszytometer/Propidium-Iodid-Färbung. Referenzsubstanzen: LöM = Lösungsmittelkontrolle: 0,3% EtOH, Staurosporin [8 nM], Triton [1 µg/ml]. Mittelwert (n = 3) ± Standardabweichung.

3.5.1.2 G1-Phase

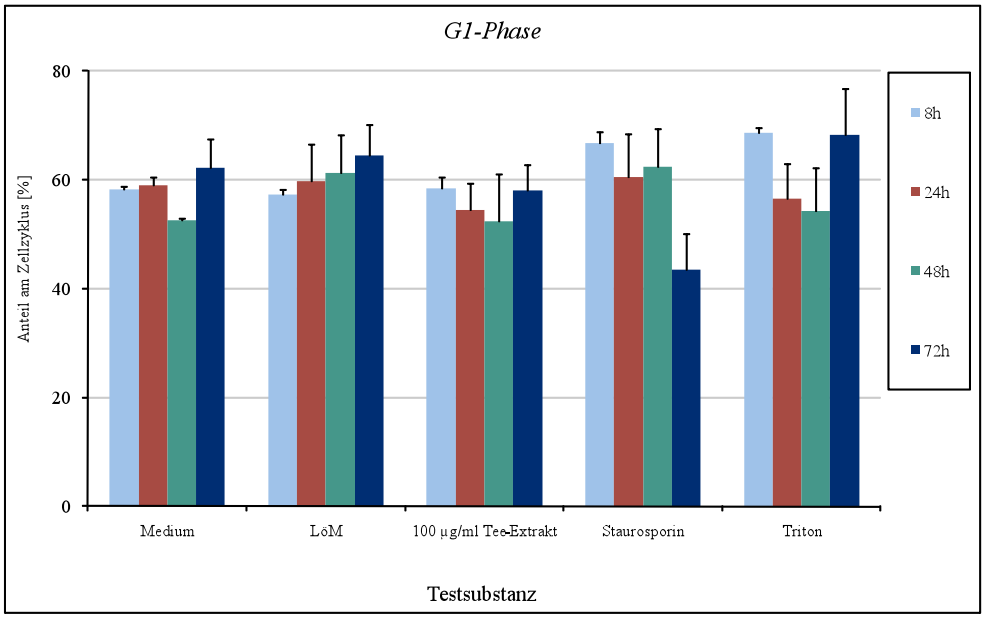


Abbildung 3.38: Zellzyklusdarstellung von U-5637-Zellen nach 100 µg/ml *Tee-Extrakt*-Inkubation, G1-Phase in Abhängigkeit von der Zeit.
Die Zellzyklusbetrachtung erfolgte mittels Durchflusszytometer/Propidium-Iodid-Färbung. Referenzsubstanzen: Staurosporin [8 nM], Triton [1 µg/ml] und LöM = Lösungsmittelkontrolle: 0,3% EtOH. Mittelwert (n = 3) ± Standardabweichung.

3.5.1.3 S-Phase

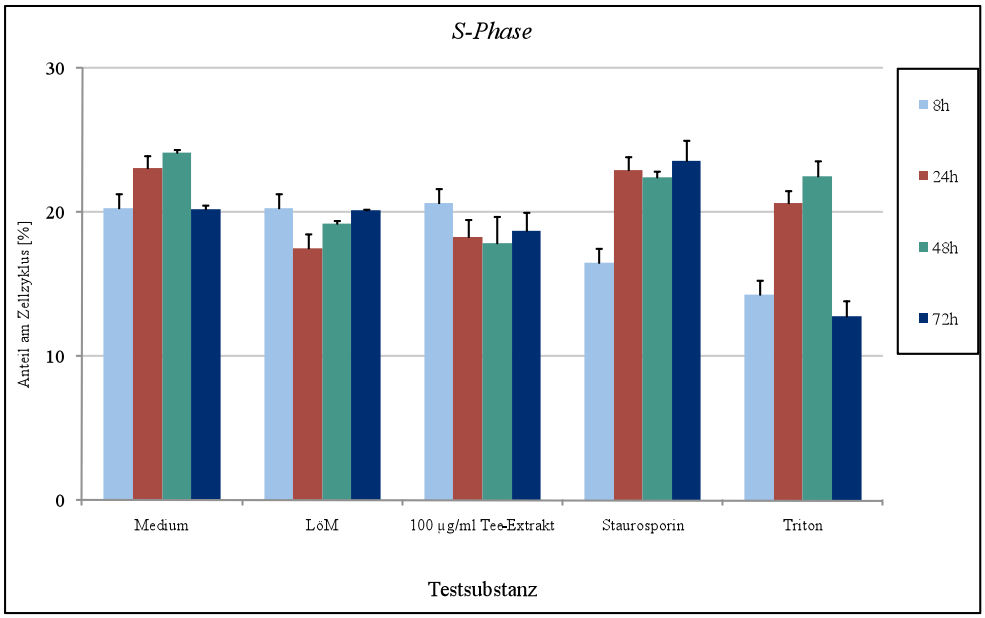


Abbildung 3.39: Zellzyklusdarstellung von U-5637-Zellen nach 100 µg/ml *Tee-Extrakt*-Inkubation, S-Phase in Abhängigkeit von der Zeit.
Die Zellzyklusbetrachtung erfolgte mittels Durchflusszytometer/Propidium-Iodid-Färbung. Referenzsubstanzen: LöM = Lösungsmittelkontrolle: 0,3% EtOH, Staurosporin [8 nM], Triton [1 µg/ml]. Mittelwert (n = 3) ± Standardabweichung.

3.5.1.4 G2/M-Phase

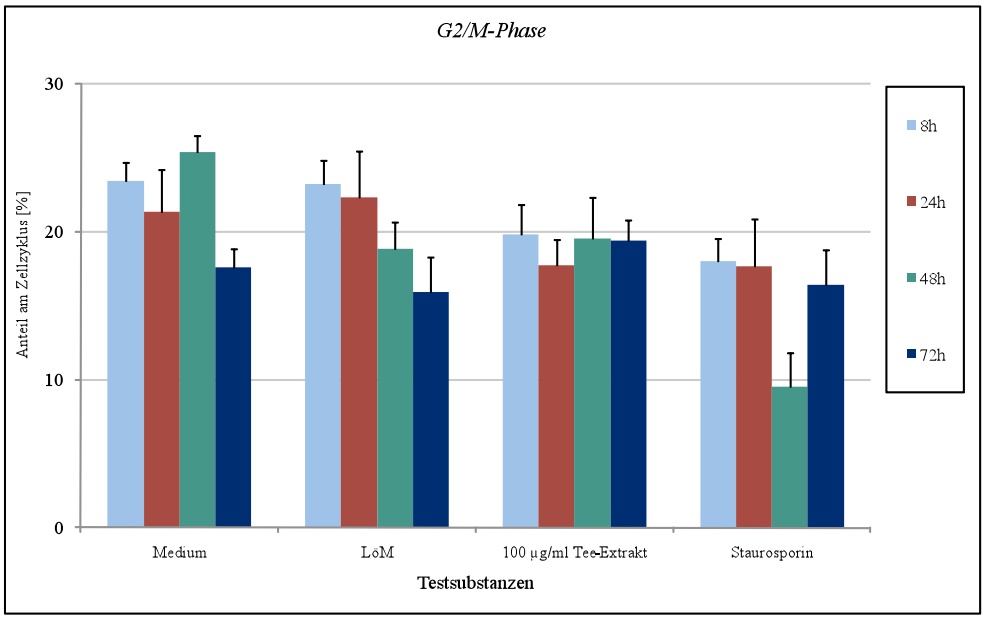


Abbildung 3.40: Zellzyklusdarstellung von U-5637-Zellen nach *Tee-Extrakt*-Inkubation, G2/M-Phase in Abhängigkeit von der Zeit.
Die Zellzyklusbetrachtung erfolgte mittels Durchflusszytometer/Propidium-Iodid-Färbung. Referenzsubstanzen: LöM = Lösungsmittelkontrolle: 0,3% EtOH, Staurosporin [8 nM], Triton [1 µg/ml]. Mittelwert (n = 3) ± Standardabweichung.

3.5.2 Aq.EtOH-sh-Extrakt

3.5.2.1 Sub-G1-Phase

Abb.3.41 zeigt im Vergleich zur Mediumkontrolle erhöhte Zellzahlen in der Sub-G_1-Phase nach 8, 24 und 72 h. Der Maximalwert liegt nach 24stündiger Inkubation vor. Des Weiteren zeigt sich keine Zellzyklusphase zu einem Zeitpunkt arretiert (Abb.3.42, Abb.3.43, Abb.3.44).

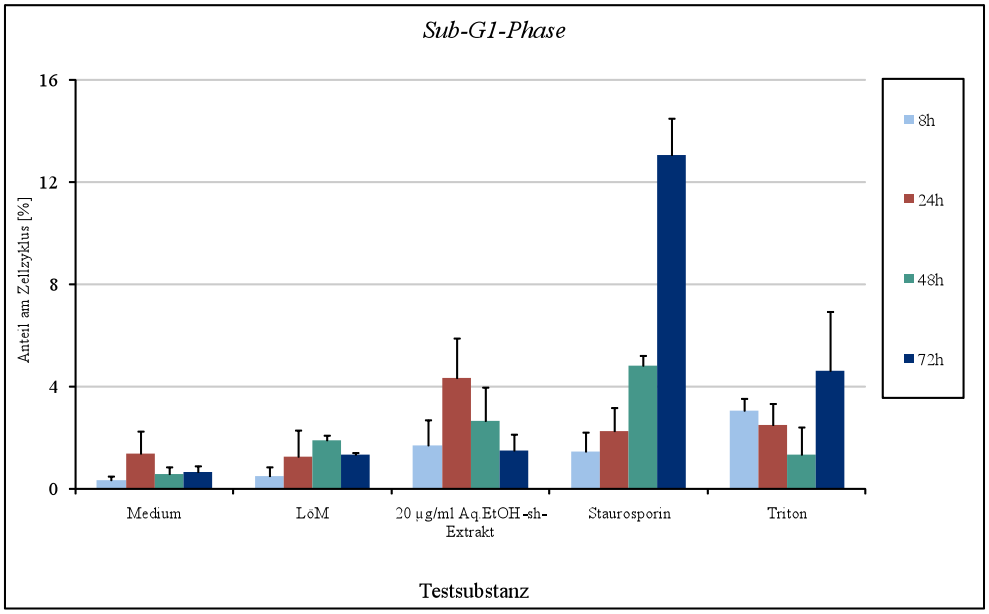


Abbildung 3.41: Zellzyklusdarstellung von U-5637-Zellen nach *Aq.EtOH-sh-Extrakt*-Inkubation, Sub-G1-Phase in Abhängigkeit von der Zeit.
Die Zellzyklusbetrachtung erfolgte mittels Durchflusszytometer/Propidium-Iodid-Färbung. Referenzsubstanzen: LöM = Lösungsmittelkontrolle: 0,3% EtOH, Staurosporin [8 nM], Triton [1 µg/ml]. Mittelwert (n = 3) ± Standardabweichung.

3.5.2.2 G1-Phase

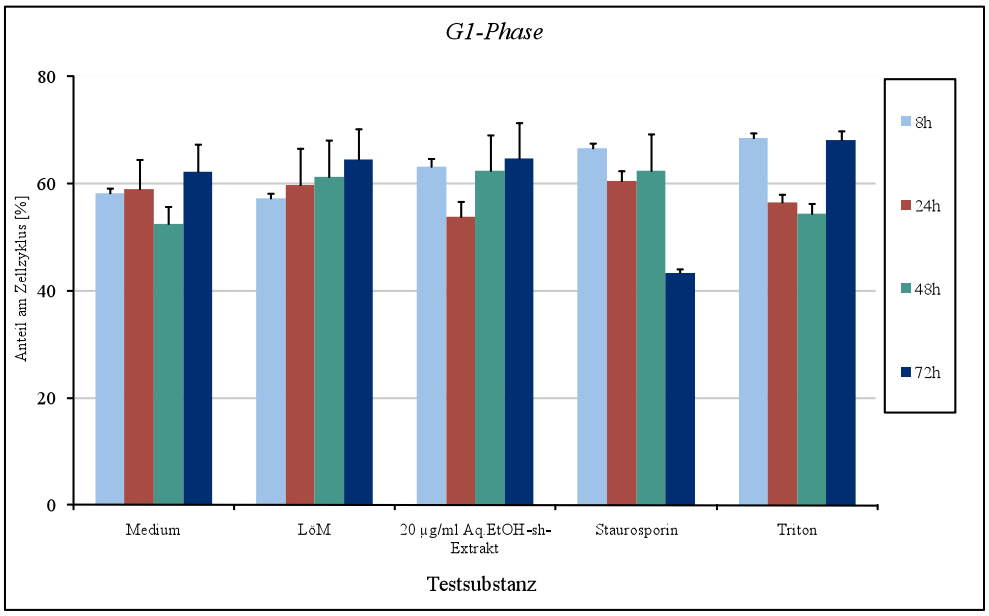


Abbildung 3.42: Zellzyklusdarstellung von U-5637-Zellen nach 20 µg/ml *Aq.EtOH-sh-Extrakt*-Inkubation, G1-Phase in Abhängigkeit von der Zeit.
Die Zellzyklusbetrachtung erfolgte mittels Durchflusszytometer/Propidium-Iodid-Färbung.
Referenzsubstanzen: LöM = Lösungsmittelkontrolle: 0,3% EtOH, Staurosporin [8 nM], Triton [1 µg/ml].
Mittelwert (n = 3) ± Standardabweichung.

3.5.2.3 S-Phase

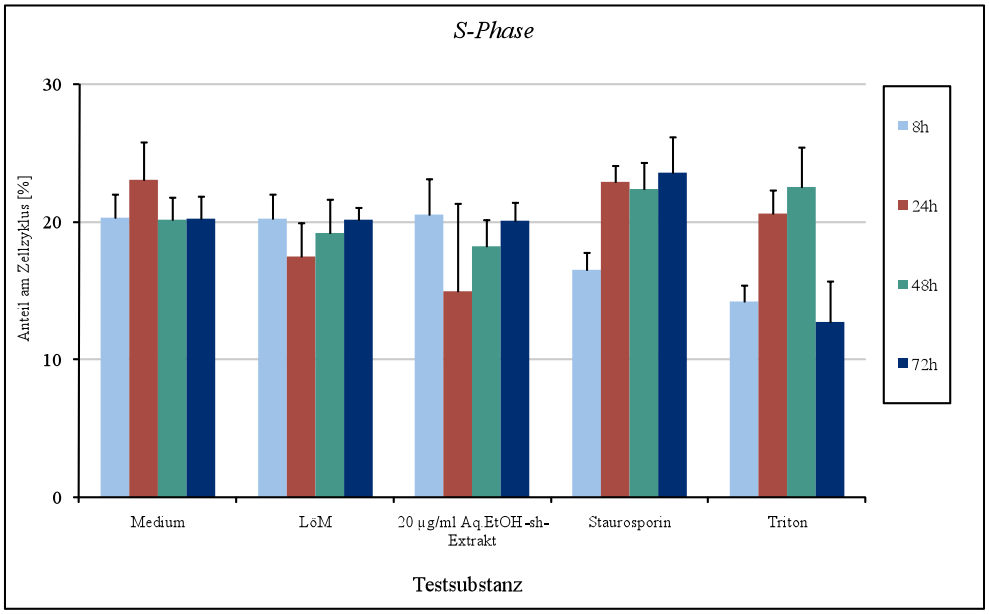


Abbildung 3.43: Zellzyklusdarstellung von U-5637-Zellen nach *Aq.EtOH-sh-Extrakt*-Inkubation, S-Phase in Abhängigkeit von der Zeit.
Die Zellzyklusbetrachtung erfolgte mittels Durchflusszytometer/Propidium-Iodid-Färbung. Referenzsubstanzen: LöM = Lösungsmittelkontrolle: 0,3% EtOH, Staurosporin [8 nM], Triton [1 µg/ml]. Mittelwert (n = 3) ± Standardabweichung.

3.5.2.4 G2/M-Phase

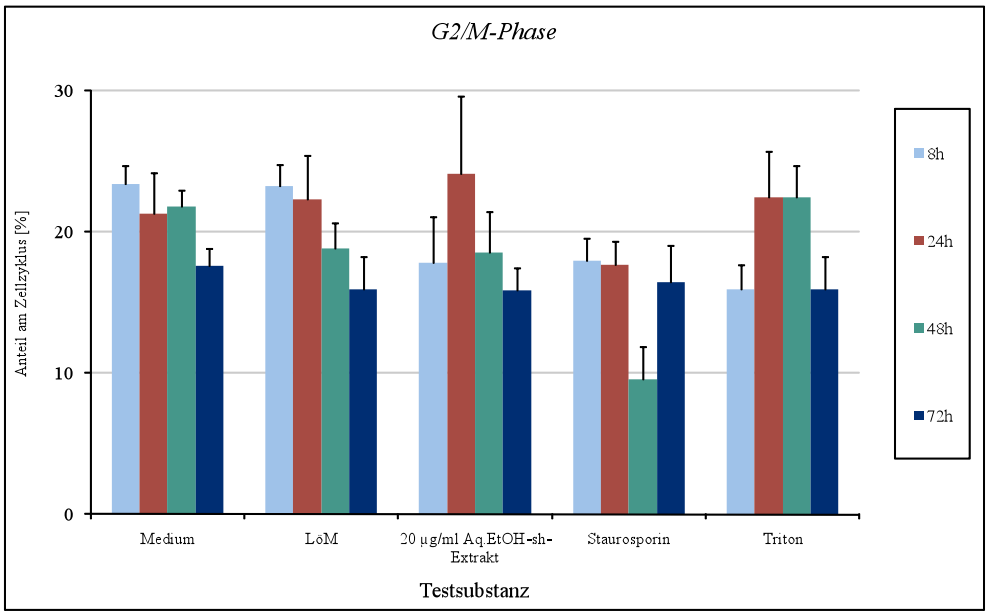


Abbildung 3.44: Zellzyklusdarstellung von U-5637-Zellen nach *Aq.EtOH-sh-Extrakt*-Inkubation, G2/M-Phase in Abhängigkeit von der Zeit.
Die Zellzyklusbetrachtung erfolgte mittels Durchflusszytometer/Propidium-Iodid-Färbung. Referenzsubstanzen: LöM = Lösungsmittelkontrolle: 0,3%EtOH, Staurosporin [8 nM], Triton [1 µg/ml]. Mittelwert (n = 3) ± Standardabweichung.

3.5.3 Referenzsubstanzen

3.5.3.1 Staurosporin

Die Inkubation mit 8 nM Staurosporin führt mit zunehmender Inkubationszeit zu einem deutlichen Zellzahlanstieg in der Sub-G1-Phase, Abb.3.41. Es zeigt sich zu keinem Meßzeitpunkt eine Arretierung einer weiteren Zellzyklusphase, Abb.3.42, Abb.3.43, Abb.3.44. Die Entwicklung der Zellzyklusstadienverteilung unter Staurosporininkubation ähnelt nicht der Entwicklung der Zellzyklusstadienverteilung unter der Inkubation mit 100 µg/ml *Tee-Extrakt* bzw. 20 µg/ml *Aq.EtOH-sh-Extrakt.*

3.5.3.2 Triton

Es zeigen sich Zellzahlerhöhungen in der Sub-G_1-Phase zu den Messzeiten 8, 24 und 72 h. Eine Phasenarretierung durch Tritoninkubation ist nicht ersichtlich (Abb.3.42, Abb.3.43, Abb.3.44). Die Entwicklung der Zellzyklusstadien unter der Inkubation mit Triton ist der Entwicklung der Zellzyklusstadien unter der Inkubation mit 20 µg/ml *Aq.EtOH-Extrakt* und 100 µg/ml *Tee-Extrak*t unähnlich.

3.6 Zytotoxizität der aus *Pittosporum angustifolium* isolierten Reinsubstanzen gegenüber U-5637-Zellen (Neutralrot-Assay)

Fünf polare Extrakte von *Pittosporum angustifolium* zeigten zytotoxische Aktivität gegen U-5637-Zellen. Aus dem *Aq.EtOH-sh-Trockenextrakt* wurden von Crüsemann (2008) acht Substanzen, wahrscheinlich Triterpensaponine, isoliert. In den folgenden Versuchen soll die Zytotoxizität sieben dieser Substanzen gegen U-5637-Zellen ermittelt werden. Es wurde die Färbung mit Neutralrot mit anschließender photometrischer Messung verwendet. Die Substanzen wurden mit den Zahlen 1-4 und 6-8 benannt. Die Ergebnisse zeigen folgendes:

3.6.1 Substanz 1

Abb.3.45 und Abb.3.46 zeigen die Viabilität der U-5637-Zellen nach einer 72stündigen Inkubation mit den *Substanzen 1* und *2* in einer Konzentrationsbreite von 25 bis 0,3 µg/ml. Im Bereich 25 bis 1,56 µg/ml zeigte sich eine Verminderung der Zellviabilität um 5 % nach der Inkubation mit *Substanz 1*. Das Lösungsmittel reduzierte die Viabilität um 12%.

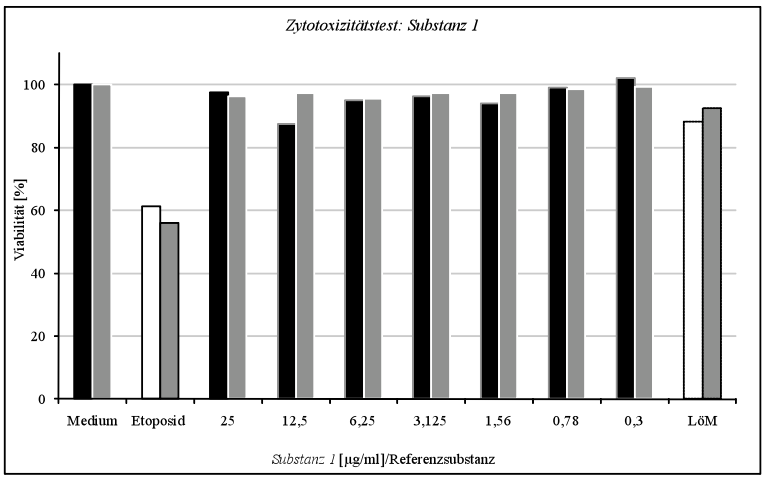


Abbildung 3.45: Darstellung der Viabilität von U-5637-Zellen nach 72stündiger Inkubation mit *Substanz 1*.
Referenzsubstanzen: LöM = Lösungsmittelkontrolle: 0,8% MeOH; 0,5 µM Etoposid. Ergebnisse einer Zweifachbestimmung, Neutralrot-Assay.

3.6.2 Substanz 2

Abb.3.46 zeigt, dass *Substanz 2* in der Konzentrationsspanne von 25-0,3 µg/ml die Viabilität um maximal 5 % reduziert.

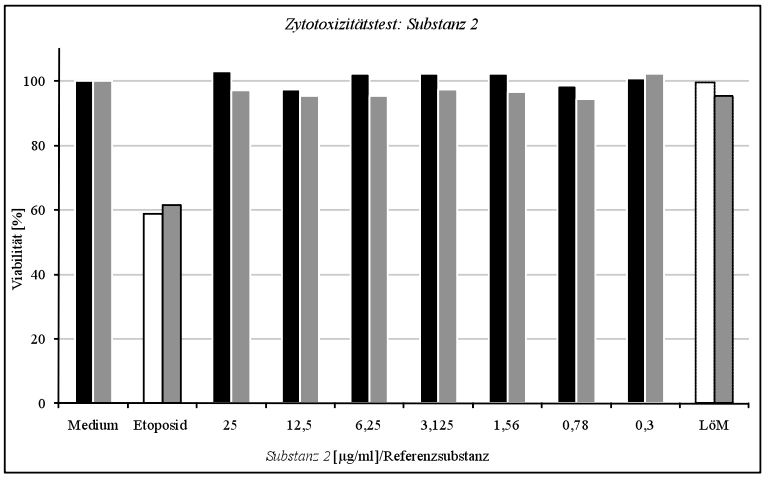


Abbildung 3.46: Darstellung der Viabilität von U-5637-Zellen nach 72stündiger Inkubation mit *Substanz 2.*
Referenzsubstanzen: LöM = Lösungsmittelkontrolle: 0,8%MeOH; 0,5 µM Etoposid. Ergebnisse einer Zweifachbestimmung, Neutralrot-Assay.

3.6.3 Substanz 3

Abb.3.47 zeigt eine deutliche Abnahme der Zellviabilität nach Inkubation mit 25 und 12,5 µg/ml der *Substanz 3*. Ab 6,25 µg/ml liegen die Werte der Viabilität auf gleicher Höhe wie die der Lösungsmittelkontrolle.

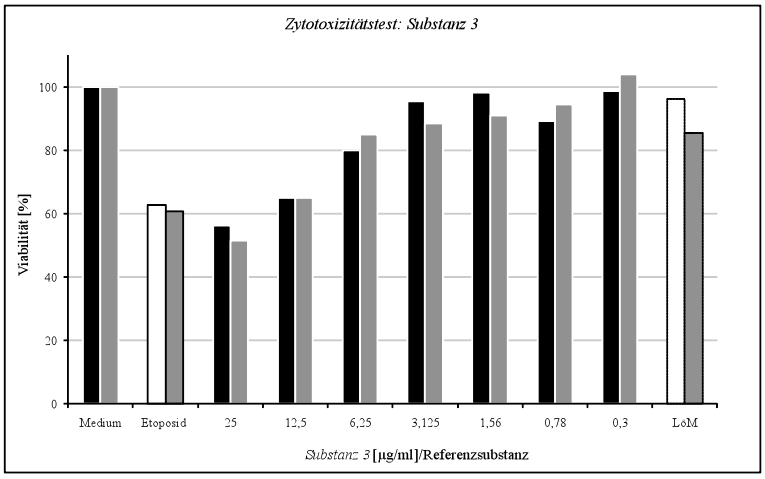


Abbildung 3.47: Darstellung der Viabilität von U- 5637-Zellen nach 72stündiger Inkubation mit *Substanz 3*.
Referenzsubstanzen: LöM = Lösungsmittekontrolle: 0,4% MeOH; 0,5 µM Etoposid. Ergebnisse einer Zweifachbestimmung, Neutralrot-Assay.

3.6.4 Substanz 4

Abb.3.48 zeigt die Ergebnisse der *Substanz-4*-Inkubation. Eine deutliche Abnahme der Zellviabilität lässt sich mit steigender Konzentration beobachten. Die IC_{50} beträgt 4 µg/ml.

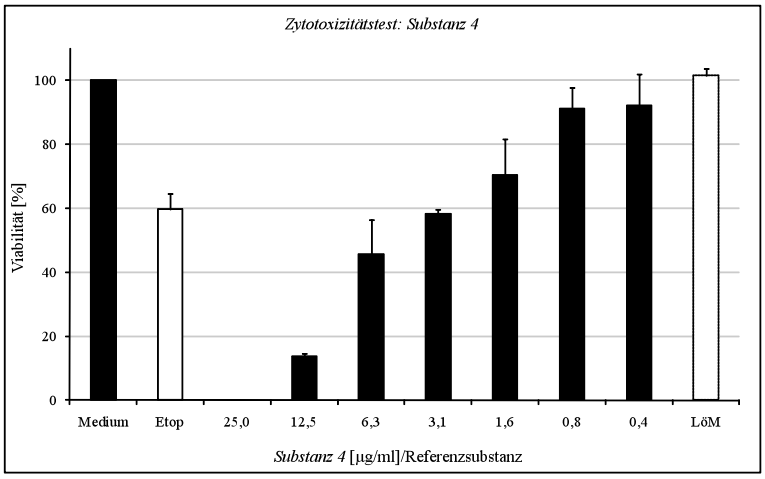


Abbildung 3.48: Darstellung der Viabilität von U-5637-Zellen nach 72stündiger Inkubation mit *Substanz 4*.
Referenzsubstanzen: LöM = Lösungsmittelkontrolle: 0,45 % MeOH; 0,5 µM Etoposid. Neutralrot-Assay, Mittelwert (n = 18) ± Standardabweichung.

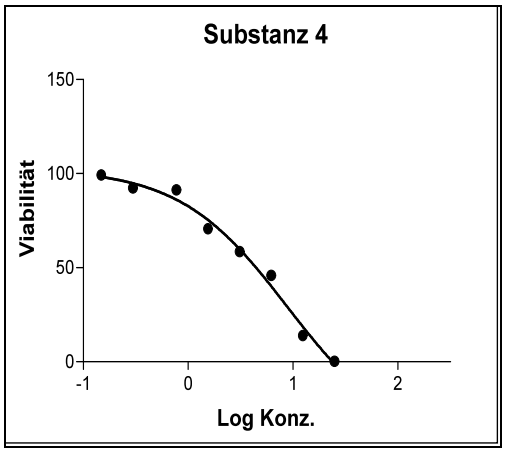


Abbildung 3.49: Dosis-Wirkungs-Kurve, *Substanz 4*.
Darstellung der Dosis-Wirkungs-Beziehung zwischen *Substanz 4* und U-5637-Zellen. Viabilitätsbestimmung mittels Neutralrot-Assay.Die IC_{50} beträgt 4 µg/ml.

3.6.5 Substanz 6

Abb.3.50, Abb.3.51 und Abb.3.52 zeigen die Ergebnisse jeweils eines NRA mit *Substanz 6*. Die Ergebnisse der drei Versuche waren so unterschiedlich, dass eine getrennte Darstellung gewählt wurde. Die *Substanz 6* zeigt in der Konzentrationsspanne von 25-0,4 µg/ml eine konstante Zytotoxizität von ca. 86% im ersten Versuchsdurchlauf (Abb.3.50). Der zweite Durchlauf zeigt eine Abhängigkeit von der Konzentration. Die getestete Konzentrationsspanne lag bei 25-0,0003 µg/ml. Eine Konzentration ab ca. 3,1 µg/ml reduziert die Viabilität um 100% (Abb 3.51). Die Wirkschwelle liegt bei > 0,8 µg/ml.

Abb.3.52 zeigt die Ergebnisse der zeitlich letzten Untersuchung. Die Wirkschwelle liegt bei einer Konzentration > 0,2 µg/ml. Eine Konzentrationsabhängigkeit ist ersichtlich.

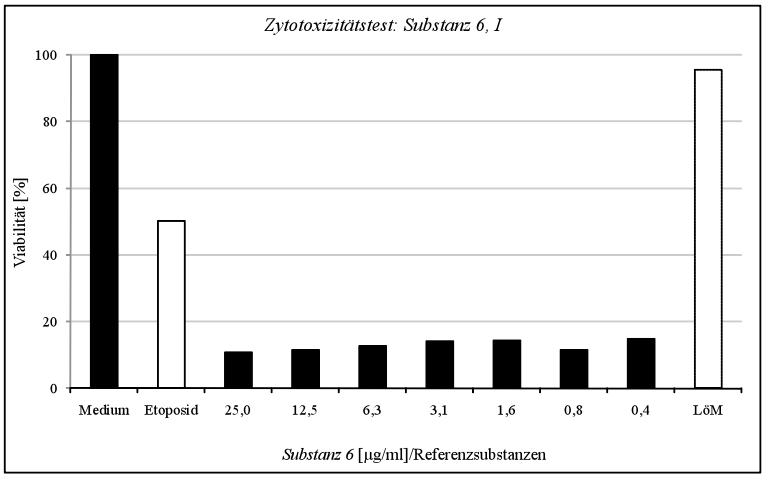


Abbildung 3.50: Darstellung der Viabilität von U-5637-Zellen nach 72stündiger Inkubation mit *Substanz 6.*
Referenzsubstanzen: LöM = Lösungsmittel:1,25% MeoH; 0,5 µM Etoposid. Ergebnis einer Einfachbestimmung, Neutralrot-Assay.

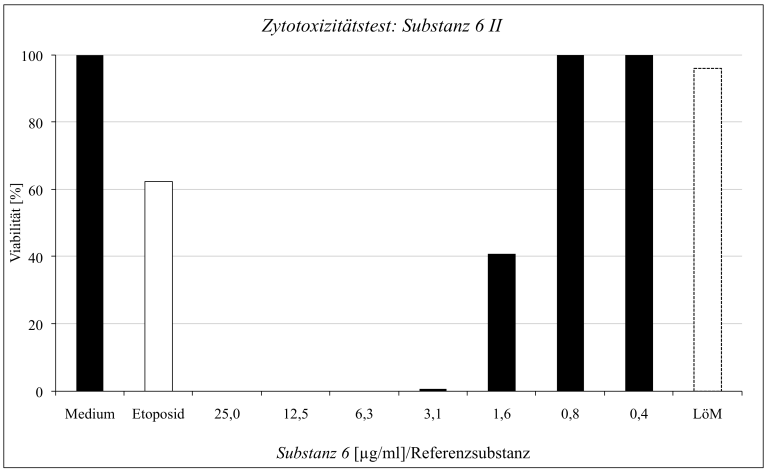


Abbildung 3.51: Darstellung der Viabilität von U-5637-Zellen nach 72stündiger Inkubation mit *Substanz 6.*
Referenzsubstanzen: LöM = Lösungsmittelkontrolle: 1,25% MeoH; 0,5 µM Etoposid. Ergebnis einer Einfachbestimmung, Neutralrot-Assay.

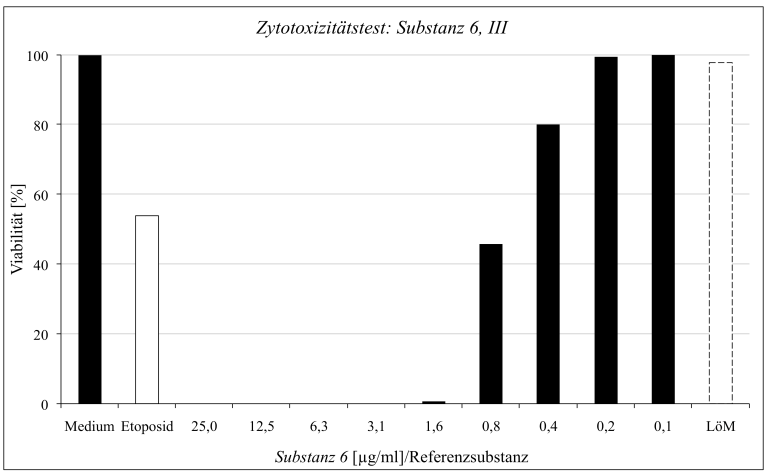


Abbildung 3.52: Darstellung der Viabilität von U-5637-Zellen nach 72stündiger Inkubation mit *Substanz 6.*
Referenzsubstanzen: LöM = Lösungsmittelkontrolle: 1,25% MeOH; 0,5 µM Etoposid. Ergebnis einer Einfachbestimmung, Neutralrot-Assay.

3.6.6 Substanz 7

Abb.3.53 zeigt viabilitätsreduzierende Effekte auf U-5637-Zellen durch die *Substanz 7* nach einer 72stündigen Inkubation. Eine Konzentrationsabhängigkeit ist gegeben.

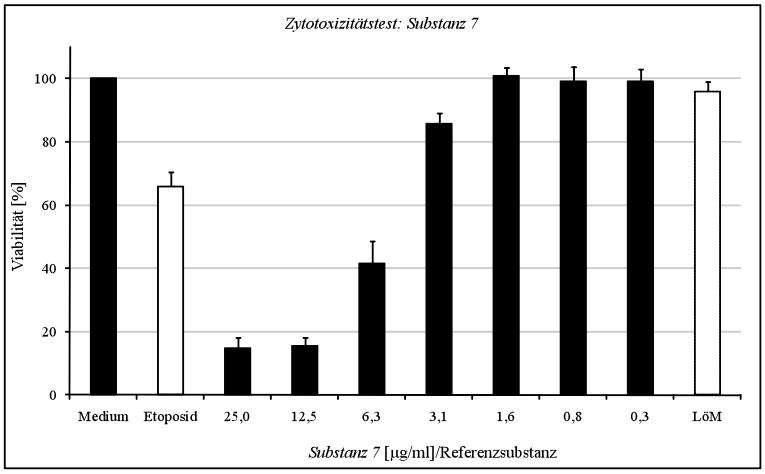


Abbildung 3.53: Darstellung der Viabilität von U-5637-Zellen Nach 72stündiger Inkubation mit *Substanz 7*.
Referenzsubstanzen: LöM = Lösungsmittelkontrolle: 0,45 % MeOH; 0,5 µM Etoposid. Angezeigt ist der Mittelwert (n = 2) ± Standardabweichung.

3.6.7 Substanz 8

Substanz 8 verursacht eine konzentrationsabhängige Zytotoxizität. Die IC_{50} liegt bei (Abb 3.54).

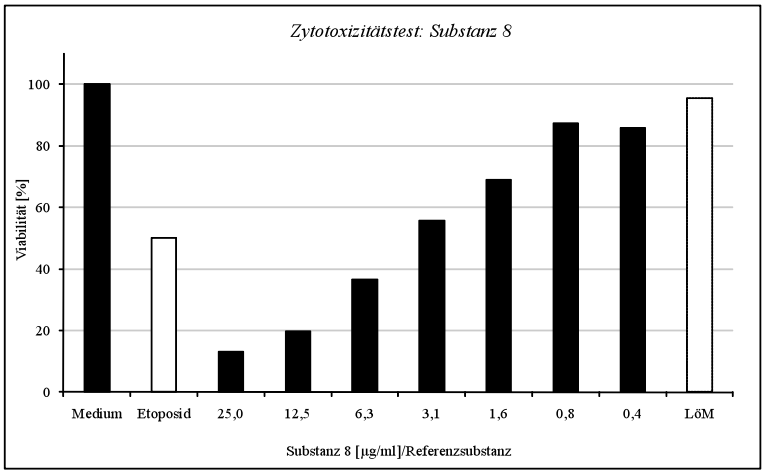


Abbildung 3.54: Darstellung der Viabilität von U-5637-Zellen nach 72stündiger Inkubation mit *Substanz 8*.
Referenzsubstanzen: LöM = Lösungsmittelkontrolle: 0,45%MeOH; 0,5 µM Etoposid. Ergebnis einer Einfachbestimmung, Neutralrot-Assay.

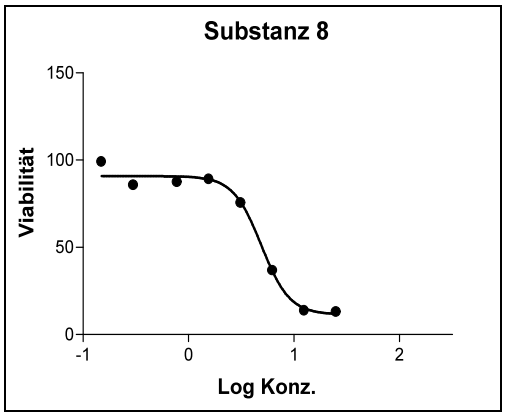


Abbildung 3.55: Dosis-Wirkungs-Kurve, *Substanz 8*.
Darstellung der Dosis-Wirkungs-Beziehung zwischen *Substanz 8* und U-5637-Zellen nach 72stündiger Inkubation. Die IC_{50} = 5,817 µg/ml. Viabilitätsbestimmung mittels Neutralrot-Assay.

3.6.8 Wirkstärken-Rangliste

Abgeleitet aus den Ergebnissen der Zytotoxizitätsuntersuchung ergibt sich geordnet nach abfallender Wirkstärke, folgende Reihung der Wirkstärken:

Substanz 6, 4, 8, 7, 3.

3.7 Bestimmung der Nekrose- und/ oder Apoptoseinduktion durch Extrakte und Substanzen von *Pittosporum angustifolium* mittels Durchflusszytometrie

3.7.1 FITC/Annexin V- und Propidium-Iodidfärbung

Den beobachteten zytotoxischen Effekten von *Pittosporum angustifolium*-Extrakten bzw. aus diesen isolierten Substanzen können neben den apoptotischen auch nekrotische Vorgänge zugrunde liegen.

Um zwischen diesen beiden Prozessen zu differenzieren, wurde eine weitere durchflusszytometrische Methodik gewählt. Das Durchflusszytometer detektierte die Fluoreszenzintensität der verwendeten Fluorchrome FITC (bindet an den Antikörper Annexin V) und Propidium-Iodid (PI). Annexin V bindet an Phosphatidylserin, welches während der frühen Phase der Apoptose an die Außenseite der Zellmembran transloziert wird. Der Nekroseprozess ist durch eine Zellschwellung und Membranpermeabilisierung charakterisiert. Das kleine PI-Molekül dringt in die Zelle ein und interkaliert mit DNA und RNA-Strukturen.

3.7.2 Auswertung

Zur Auswertung wurde im angezeigten *Dot-plot*-Diagramm die Annexin-V Intensität gegen die PI-Intensität aufgetragen. An der unbehandelten Zellkontrolle wurde im *Dot-plot* eine Einteilung in vier Quadranten unternommen. Das Charakteristikum des Quadranten galt als Beschreibung für den Zellzustand (siehe auch Abb.7.7):

Quadrant	***Fluorchrom Signal***	***Zellzustand***
1.	Annexin negativ/ PI negativ (A^-/PI^-)	Intakte Zelle
2.	Annexin positiv / PI negativ (A^+/PI^-)	Frühe Apoptose
3.	Annexin negativ / PI positiv (A^-/PI^+)	Frühe Nekrose
4.	Annexin positiv / PI positiv (A^+/PI^+)	Späte Apoptose- und Nekrosephase

Tabelle 3.3: Darstellung der Auswertungsstrategie der Durchflusszytometrie.
Durch die Einteilung des Annexin-V/PI-*Dot-plots* in vier Quadranten ergibt sich die Zuteilung der gemessenen Zellen zu einem Zellzustand.

3.7.3 Tee-, MeOH- und Aq.EtOH-sh-Extrakt

Abb.3.57 zeigt, dass die drei getesteten Extrakte nach 24stündiger Inkubation sowohl Nekrose- als auch Apoptoseprozesse induzieren. Die Apoptoserate liegt jeweils nach 24 h höher als die Nekroserate, wenn die U-5637-Zellen mit 100 µg/ml *Tee-Extrakt* oder mit 50 µg/ml *MeOH-Extrakt* inkubiert werden.

20 µg/ml *Aq.EtOH-sh-Extrakt* zeigen hohe nekrotische Effekte nach 10stündiger Inkubation (Abb.3.56) und niedrigere nach 24stündiger Inkubation. Nach 24 h zeigt sich ebenfalls Apoptoseinduktion.

3.7.4 Substanz 4

Bei *Substanz 4* ist zu beiden Messzeitpunkten ein Anstieg sowohl der Nekrose- als auch der Apoptoserate zu beobachten (Abb.3.56 und Abb.3.57).
Nach 10stündiger Inkubation sind mehr nekrotische als apoptotische Zellen messbar. 24 µg/ml erzielen stärkere Effekte als 12 µg/ml.
Eine Apoptoseinduktion in den Zellen erreichen 12 µg/ml nach einer Inkubationszeit von 24 h.
24 µg/ml hatten im gleichen Zeitraum die Zellpopulation zu > 90 % zerstört.

3.7.5 Substanz 6

24stündige Inkubation mit *Substanz 6* [1 µg/ml] induziert Apoptoseprozesse in U-5637-Zellen. Die Apoptoserate lag deutlich höher als die Nekroserate (Abb.3.57).

Eine 10stündige *Substanz-6*-Inkubation löst überwiegend Nekrose aus (Abb.3.56).

3.7.6 Staurosporin

Die Staurosporin-Behandlung induziert sowohl Apoptose als auch Nekrose. Der Maximalwert an apoptotischen Zellen liegt nach 24stündiger Inkubation mit 32 nM Staurosporin vor. Die Anzahl an nekrotischen Zellen ist gering (Abb.3.56, Abb.3.57).

3.7.7 Lösungsmittelkontrolle

Abb.3.56 und Abb.3.57 stellen dar, dass durch die Behandlung mit 0,6 % EtOH nach 10 h keine messbaren Apoptose- oder Nekroseprozesse ausgelöst werden. Nach 24stündiger Inkubation werden wenige nekrotische, tote und apoptotische Zellen ermittelt.

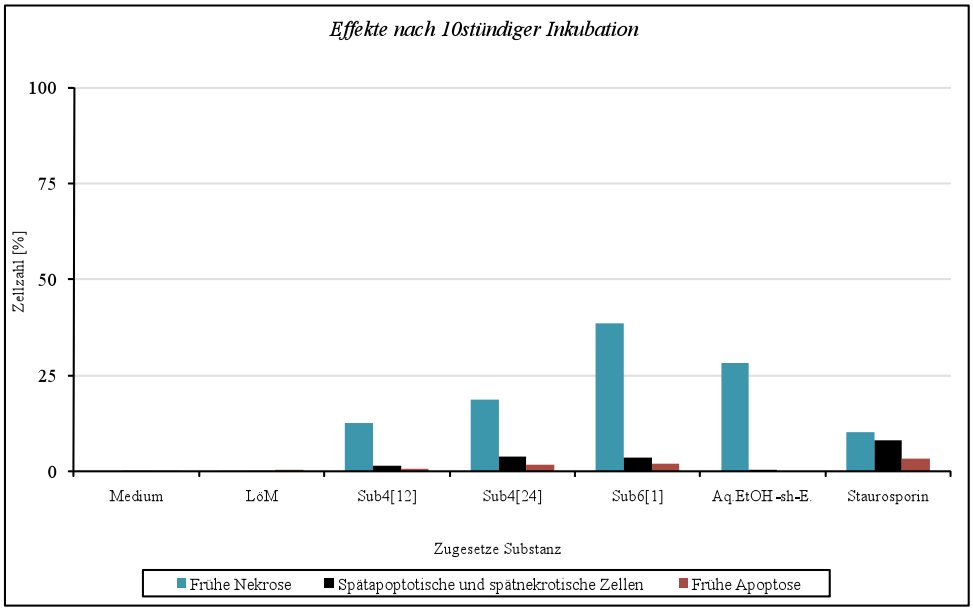


Abbildung 3.56: Durchflusszytometrische Bestimmung der Apoptose und Nekroseinduktion in U-5637 Zellen nach 24stündiger Inkubation.
Zugesetzte Substanzen: LöM = Lösungsmittelkontrolle: 0,8% EtOH, Sub4 = *Substanz 4*, Sub6 = *Substanz 6*, EtOH-sh-E. = *Aq.EtOH-sh-Extrakt* [20 µg/ml], Staurosporin [32 µM] Dargestellt sind die Ergebnisse aus einer Einfachbestimmung.

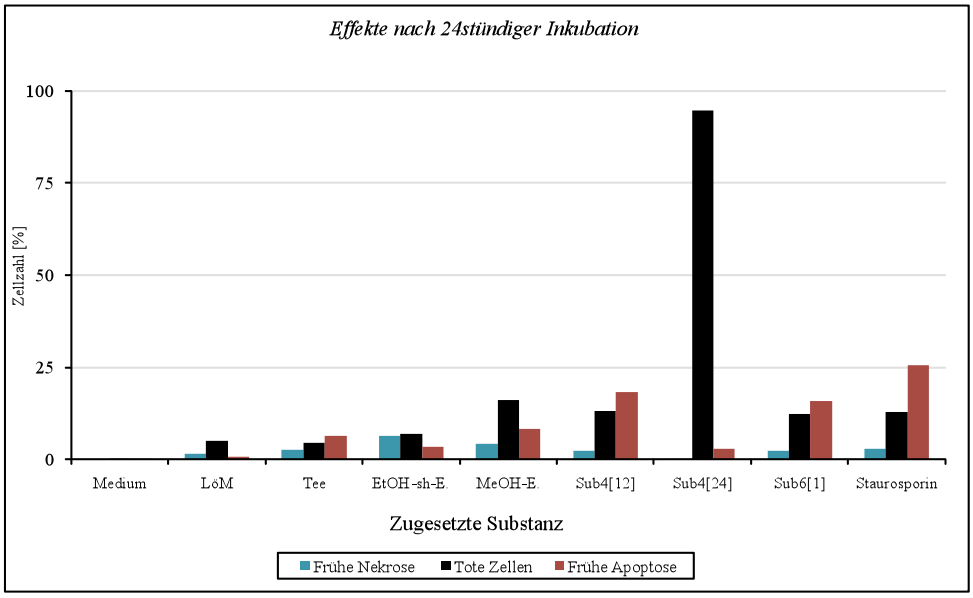


Abbildung 3.57: Durchflusszytometrische Bestimmung der Apoptose- und Nekroseinduktion in U-5637-Zellen nach 24stündiger Inkubation.
Zugesetzte Substanzen: Staurosporin [32 µM]; LöM = Lösungsmittelkontrolle: 0,6% EtOH, Sub4 = *Substanz 4*, Sub6 = *Substanz 6*, Tee = *Tee-Extrakt*: [100 µg/ml], EtOH-sh-E. = *Aq.EtOH-sh-Extrakt* [20 µg/ml], MeOH-E. = *MeOH-Extrakt* [50 µg/ml]. Dargestellt sind Mittelwerte aus einer Zweifachbestimmung. Darstellung der Ergebnisvariabilität siehe Abb.9.3 und Abb.9.4, Anhang.

4 Diskussion

Pittosporum angustifolium wird als Heilpflanze von den Aborigines in einigen Gebieten Australiens seit langem genutzt. Anwendungsbeobachtungen aus jüngerer Zeit geben Hinweise auf Behandlungserfolge bei der Behandlung von Tumorerkrankungen. Publizierte wissenschaftliche und klinische Daten liegen bis jetzt nicht vor. In der - an der Universität Greifswald angefertigten - Diplomarbeit von Hellmund (2007) konnte u.a. Zytotoxizität von Extrakten gegen eine Lungen-Karzinom-Zelllinie (A427) und gegen FL-Zellen (Amnion-Epithel-Zellen) gezeigt werden[5]. Crüsemann (2008) konnte in seiner Diplomarbeit mehrere Substanzen aufreinigen, die für die Wirkung mitverantwortlich sein könnten. Bei ihnen handelt es sich vermutlich um Saponine. Aufgabe der vorliegenden Arbeit war die Fortführung der zellbiologischen Arbeiten, wobei erstmals die isolierten Verbindungen einbezogen und Untersuchungen zum Einfluss auf den Zellzyklus durchgeführt wurden.

4.1 *In vitro* Untersuchung zur Zytotoxizität von *Pittosporum-angustifolium*-Extrakten und isolierten Substanzen mittels Neutralrot-Assay

4.1.1 Extrakte

Die Ergebnisse dieser Arbeit bestätigen das konzentrationsabhängige zytotoxische Potential unterschiedlicher Extrakte der Pflanze gegen eine Tumorzelllinie. In diesen Untersuchungen wurde die Harnblasenkarzinom-Zelllinie 5637 verwendet. Die Inkubation über 72 h ergab IC_{50}-Werte von 10,77 bis 66,55 µg/ml. Die alkoholischen Extrakte wirkten insgesamt stärker als der *Tee-Extrakt* und der *Amylase-Extrakt.* Die Lösungsmittelkontrollen reduzierten die Viabilität nur leicht. Die Zytotoxizität ist demnach den pflanzlichen Wirkstoffen zuzuschreiben.

Die hier ermittelten IC_{50} Werte liegen niedriger als die bei den beiden Zelllinien vorheriger Studien. So betragen die IC_{50}-Werte für den *Tee-Extrakt* für FL-Zellen 84 µg/ml, für A427-Zellen 121 µg/ml und für U-5637-Zellen 52,15 µg/ml. Ursache dafür ist vermutlich die höhere Sensibilität der U-5637-Zellen, auch gegenüber der Referenzsubstanz Etoposid sind diese Zellen am stärksten empfindlich.

[5] Informationen aus dieser Arbeit wurden nicht-autorisiert im Internet veröffentlicht.

Die zytotoxische Wirkung ist durch die Saponine als Inhaltsstoffe erklärbar.

Saponine sind sekundäre Pflanzeninhaltsstoffe. Sie stellen eine vielfältige Gruppe an Glykosiden dar. Ihr Aglykon, an das eine oder mehrere Zuckerketten angehängt sind, ist entweder ein Steroid oder ein Triterpen. Die große Diversität der Saponine ist schließlich das Resultat aus der Variabilität der Aglykonstruktur, der Zuckerseitenketten und deren Anordnung. Saponine sind weitverbreitet im Pflanzenreich und zeigen ein großes Angebot an biologischen Eigenschaften. Dies lässt ihnen eine bedeutende Rolle in traditionell medizinischer Anwendung zukommen (Sparg et al. 2004). Aus der Literatur bekannte Saponine zeigen sich u.a. oberflächenaktiv mit Schaumbildung (lateinisch: sapo = Seife), hämolytisch (Oda et al. 2002), anti-inflammatorisch (Navarro et al. 2001), anti-bakteriell (Killeen et al. 1998) und des Weiteren zytotoxisch und antitumorös (Xiao et al. 1999, Zhou et al. 2000, Man et al. 2010). Zytotoxisch zeigen sich insbesondere Saponine zweier *Pittosporum*-Arten: *Pittosporum tobira* (D'Aquarica et al. 2002) und *Pittosporum viridiforum* (Seo et al. 2002).

Interessanterweise war das Hydrolysat des *Aq.Ethanol-Extraktes* wirksamer als der *Aq.Ethanol-Extrakt*. Auf Grund der Hydrolyse mit HCl ist es denkbar, dass sich das Kulturmilieu durch den Extrakt angesäuert hatte und sich der toxische Effekt auf die Zellen erhöhte. Durch ein „neutrales" pH-Wert-Messergebnis wurde diese Vermutung widerlegt. Es ist dennoch möglich das eventuelle Verunreinigungen der HCl toxisch gewirkt hatten. Wahrscheinlicher ist es anzunehmen, dass die Hydrolyse die Zucker vollständig von den Sapogeninen getrennt hatte. Infolgedessen resultiert die Zytotoxizität bereits aus den Aglyka, den Sapogeninen. Die IC_{50} wird durch die Entfernung der Kohlenhydrate erniedrigt.

Im scheinbaren Widerspruch dazu stehen die Ergebnisse von Quetin et al. (1992), in dessen Untersuchungen monoglykosidische Saponine toxischer auf Tumorzellen wirkten als ihr Aglykon oder bisdesmosidische Saponine. Unter diesem Aspekt ist die Effektivität des *Amylase-Extraktes* von Interesse. Dieser wurde in die Untersuchungen einbezogen, da die Aborigines die Blätter vor der Verwendung mit Speichel vorbehandeln. Die Verwendung von Amylase sollte diese Behandlung imitieren. Durch die Einwirkung von Amylase ist anzunehmen, dass ebenfalls Zuckerseitenketten abgespalten wurden. Denkbar wäre die Umwandlung von bidesmosidischen zu monoglykosidischen Verbindungen oder die vollständige Entfernung der Kohlenhydrate. Auch Untersuchungen von Woldemichael et al.

(2001) berichten, das getestet Saponine mit zwei Seitenkennen eine geringere Wirkung zeigten als Monoglykoside.

Das Fazit der bisherigen Erforschung von Saponinen sagt, dass die zytotoxische Wirkung der Saponine von verschiedenen Faktoren abhängig ist, z.B. von der Art des Aglykons, der Anzahl der Seitenketten *und* der Art der Zellen und ihrer Membranbeschaffenheit (Brachan et al. 2006, Sparg et al. 2004, Francis et al. 2002).

Die Effekte gegen Tumorzellen konnten auf jeweils unterschiedliche Mechanismen zurückgeführt werden (Sparg et al. 2004): Immunstimulation, Hemmung der Tumorangiogenese, Apoptoseinduktion, Hemmung der Metastasierung, Membranpermeabilisierung u.v.m.

Hellmund (2007) fand für den *Amylase-Extrakt* stimulierende Wirkungen auf primäre Leukozyten. Für seine *in vivo* Effektivität können daher auch immunstimulierende Effekte bedeutsam sein.

4.1.2 Isolierte Substanzen

Fünf der sieben isolierten Substanzen zeigten konzentrationsabhängige zytotoxische Effekte gegen U-5637 Zellen. *Substanz 6* und *Substanz 4* zeigten die stärkste Wirkung. Sie waren als Hauptkomponenten im *Aq.EtOH-Extrakt* enthalten (Crüsemann 2008). Dieser Extrakt zeigte jedoch eine leicht schwächere Wirkung als der *MeOH-Extrakt*, der nur *Substanz 4* als Hauptkomponente besaß. So scheinen die beiden Substanzen keinen additiven zytotoxischen Effekt auszuüben. Die *Substanzen 1* und *2* zeigten sich unwirksam bis zu einer Maximalkonzentration von 25 µg/ml. Insgesamt ist zu bedenken, dass auf Grund der geringen Substanzmengen mit der *Substanz 8* nur eine Einfachbestimmung bzw. mit den *Substanzen 1, 2, 3, 7* nur eine Zweifachbestimmung erfolgen konnte. Die Ergebnisse von drei Viabilitätstests nach *Substanz-6*-Inkubation wichen sehr voneinander ab. Zur Verifizierung der Ergebnisse sollten weitere Test durchgeführt werden.

Laut Crüsemann (2008) und den aktuellen Arbeiten zu den Strukturanalysen handelt es sich bei den isolierten Verbindungen um Triterpensaponine. Die zytotoxische Aktivität von pflanzlichen Triterpensaponinen, insbesondere gegen Tumorzellen ist aus der Literatur bekannt (Man et al. 2010, Nakata et al. 1998, Plohmann et al. 1997, Tundis et al. 2009).

Vermutlich besitzt wenigstens eine der Substanzen das für *Pittosporum angustifolium* bekannte R1-Barrigenol als Aglykon. Es ist ein Triterpen vom Oleantyp und wurde bereits aus *Pittosporum angustifolium* isoliert (Errington et al. 1967). Es ist als Aglykon, verknüpft mit unterschiedlichen Zuckerseitenkennen, auch in anderen *Pittosporum*-Arten *(Pittosporum tobira* (D'Aquarica et al. 2002), *Pittosporum undulatum* (Higuchi et al. 2001) und *Pittosporum viridiforum* (Seo et al. 2002) zu finden.

4.2 *In vitro* Untersuchung zur zeitabhängigen Zytotoxizität von *Pittosporum angustifolium*-Extrakten

Die zytotoxische Wirkung wurde zunächst nach einer Einwirkungszeit von 72 h ermittelt. Durch die Verkürzung der Inkubationszeit von 72 auf 48 bzw. 24 h sollte der Zeitpunkt der maximalen zytotoxischen Wirkung ermittelt werden. Untersucht wurden der *Aq.Ethanol-sh-Extrakt,* der *Tee-Extrakt* und der *MeOH-Extrakt*. Die Ergebnisse zeigen, dass mit der Verwendung der IC_{50} die Zellschädigung innerhalb der ersten 24 h erfolgt. Die 2 x IC_{50} wirkt bis zu 48 h wachstumshemmend.

Insgesamt könnte dies bedeuten, dass die Population durch die Inkubation mit den Extrakten in ihrer Proliferation nur reversibel gehemmt wurde. Wahrscheinlicher ist jedoch, dass ein großer Anteil der Zellen zerstört wurde und nur die überlebenden Zellen proliferierten. Die mit den Referenzproben behandelten Zellen zeigten ein ähnliches Verhalten. Des Weiteren ist für diverse Pflanzensaponine bekannt, dass sie Apoptose und Nekrose induzieren (Sparg et al. 2004). Der Zeitpunkt der Schädigung, nämlich innerhalb weniger Stunden, spricht auch eher für Apoptose und Nekroseprozesse. Generell eignet sich der Neutralrot Assay weder zur Unterscheidung von Stoffwechselinhibition noch Apoptose oder Nekrose. Hierzu wurden in der Arbeit durchflusszytometrische Methoden angewendet.

4.3 Untersuchung des Zellzyklus mittels Durchflusszytometer und PI-Färbung

Malignes Tumorwachstum ist u.a. charakterisiert durch eine Deregulation der Apoptose in den Tumorzellen. Chemotherapie und Strahlentherapie wirken über die Induktion von Apoptose in der Tumorzelle. Zytostatika wirken oft über eine DNA-Schädigung in der Tumorzelle. Bei DNA-Schäden leitet die Zelle Reparaturmechanismen ein und arretiert hierfür ihren Zellzyklus an einem der beiden Kontrollpunkte (G1 oder G2). Ein Triterpensaponin aus *Gleditsia sinensis* induzierte einen G2-Zyklusarrest in HL-60-Zellen

(Zhong et al. 2003). Von einem Extrakt einer *Pittosporum* Art (*Pittosporum tobira*) ist bekannt, dass dieser einen G1-Arrest in humanen Tumorzelllinien bewirken kann (D'Aquarica et al. 2002). Hier sollte geklärt werden, inwieweit die Extrakte von *Pittosporum angustifolium* Apoptose induzieren und die DNA schädigen können.

Dazu wurden Untersuchungen mittels Durchflusszytometer und Propidium-Iodid-Färbung durchgeführt.

Da die beiden Referenzsubstanzen die erwarteten Ergebnisse zeigten (Staurosporin: Anstieg der Sub-G1-Phase unter IC_{50}. Etoposid: Anstieg der G2/M-Phase unter IC_{50}), kann die Versuchsdurchführung als geeignet betrachtet werden.

Die Ergebnisse zeigten, dass die 72stündige Inkubation mit den drei Extrakten (*Tee, Aq-EtOH-sh-Extrakt* bzw. *MeOH-Extrakt*) nicht in den Zellzyklus der Tumorzelle eingegriffen hatte. Eine Arretierung an den Kontrollpunkten G1- bzw. G2-Phase war nicht zu beobachten.

Die erhöhten Werte für die Sub-G1-Phase zeigten, dass der *MeOH-Extrakt* und der *Tee-Extrakt* Apoptose in U-5637-Zellen induzieren. Die *MeOH-Extrakt*-Inkubation führte zu einem mäßigen Anstieg der apoptotischen Zellen. Für eine signifikante Erhöhung der Apoptoserate sorgte die 2fache IC_{50} des *Tee-Extraktes*. Die 2fache IC_{50} des *Aq.EtOH-sh-Extraktes* induzierte die Apoptose jedoch nicht. Trotzdem erschien in diesen Proben der Zellrasen im mikroskopischen Bild sehr ausgedünnt und es ließen sich im Zytometer relativ wenig Zellen detektieren. Vermutlich wirkt dieser Extrakt über andere Mechanismen zytotoxisch. So werden nekrotische Prozesse im Durchflusszytometer/PI-Färbung nicht erkannt.

4.3.1 Zellzyklusanalyse zu unterschiedlichen Zeiten

Der Anteil der Zellen in den einzelnen Zellzyklusphasen wurde nach den Inkubationszeitpunkten 8, 24, 48, 72 h bestimmt. Auch in diesen Versuchen konnte keine Arretierung einer Zellzyklusphase durch die Inkubation mit dem *Tee-Extrakt* (2 x IC_{50}) bzw. dem *Aq.EtOH-sh-Extrakt* (2 x IC_{50}) beobachtet werden.

Jedoch erzeugte die Behandlung mit 2fachen IC_{50} einen Maximalwert an apoptotischen Zellen nach 24stündiger Inkubation. Dies bestätigt frühere Beobachtungen. Es war nun möglich das Zeitfenster der maximalen Schädigung weiter einzuengen: es lag zwischen 8 und 24 Inkubationsstunden.

Die zeitabhängigen Veränderungen der Sub-G1-Phase, die sich durch die Staurosporin-Behandlung ergaben, waren unterschiedlich zu denen der Extraktbehandlung, denn die Zellzahlen waren bis zur 72. Inkubationsstunde steigend. Die Triton-Behandlung zeigte wiederum ein anderes Muster der Sub-G1-Phasen-Werte. Daraus lässt sich schließen, dass die Extrakte durch einen andersartigen Mechanismus als die Referenzsubstanzen in das Zellgeschehen eingegriffen hatten.

4.3.2 Differenzierung von Apoptose und Nekroserate nach Inkubation mit Extrakten und den Substanzen 6 und 4

Für Saponine ist bekannt, dass sie mit der Zellmembran interagieren (Bagham et al. 1962). Bei Erythrozyten führen sie zur Hämolyse. Auf Grund ihrer lyobipolaren Eigenschaften können Saponine die Permeabilität der Zellmembran erhöhen. Im Weiteren führt die Störung der Zellintegrität zu einer schnellen Zerstörung der Zelle, zur Nekrose.

Die Frage, ob nekrotische Effekte zur Zytotoxizität der Extrakte und der *Substanzen 4* und *6* beitragen, sollte geklärt werden.

Dazu wurden die Zellen 10 bzw. 24 h mit den Testsubstanzen inkubiert, mit FITC/Annexin V und Propidium-Iodid angefärbt und anschließend durchflusszytometrisch gemessen.

Die Ergebnisse der 10stündigen Inkubation bestätigten, dass durch die Inkubation mit den Substanzen/Extrakten/Staurosporin sowohl Nekrose als auch Apoptose induziert werden. Die Nekroserate war dabei deutlich höher als die Apoptoserate. Das wäre zunächst damit zu erklären, dass die Nekrose schneller geschieht als die Apoptose. Im Vergleich zu den pflanzlichen Substanzen wurde Staurosporin mit einer höheren IC_{50}-Vielfachen eingesetzt. Die Nekroserate zeigte sich dennoch niedriger als bei den *Pittosporum*-Substanzen. Vermutlich besitzen die pflanzlichen Substanzen ein deutlich stärkeres Nekrosepotential als Staurosporin. *Substanz 6* ist dabei stärker wirksam als *Substanz 4*. Die Ergebnisse der 10stündigen Inkubation sind mit Vorbehalt zu betrachten, da sie nur durch eine Messung ermittelt wurden.

Die Ergebnisse der 24stündigen Inkubation bestätigten, dass die zwei getesteten Extrakte sowohl Apoptose als auch Nekrose induzieren. Die Größe der Nekroserate war für alle Extrakte relativ gleich. Der *Aq.Ethanol-sh-Extrakt* zeigte eine niedrigere Anzahl an apoptotischen Zellen als der *Tee-Extrakt* und *MeOH-Extrakt.* Dies bestätigt die Ergebnisse aus der Zellzyklusanalyse. Auch der Apoptoseinduktor Staurosporin zeigte sowohl

apoptotische als auch nekrotische Effekte. Dies lässt sich auf die relativ hohe Konzentration zurückführen (4 x IC_{50}). Die Extrakte waren nur mit einer 2fachen IC_{50} eingesetzt worden. Dementsprechend ist ihr Nekroseinduktionspotenzial als hoch einzuschätzen.

12 µg/ml (entspricht 3 x IC_{50}) von *Substanz 4* zeigten ebenfalls sowohl apoptotische als auch nekrotische Effekte. Die 6 x IC_{50} führte zu einer fast kompletten Zerstörung der Zellen, vermutlich durch Nekrose. Für zukünftige Messungen empfiehlt sich eine niedrigere Konzentration zu wählen. Die 24stündige Inkubation mit der *Substanz 6* (2 x IC_{50}) bewirkt eine höhere Apoptose- als Nekroserate. Wegen der Verwendung von unterschiedlichen IC_{50}-Vielfachen ist ein Vergleich der Substanzen schlecht möglich. Vermutlich lässt eine höhere Konzentration von *Substanz 6* auch die Nekroserate ansteigen. *Substanz 4* sollte man dann ein stärkeres Apoptoseinduktionspotential zuschreiben. Dies würde die Beobachtung bestätigen, dass die beiden Extrakte (*MeOH-Extrakt, Tee-Extrakt*), die ausschließlich *Substanz 4* enthalten in der Zellzyklusanalyse eine deutliche Apoptoseinduktion gezeigt hatten. Der *Aq.Ethanol-sh-Extrakt*, der zusätzlich *Substanz 6* enthält, konnte dies nicht zeigen.

Um zu klären, welche spezifischen Strukturelemente mit den beobachteten Effekten korrelieren (Struktur- Wirkungs- Beziehung), ist im nächsten Schritt die Strukturaufklärung der Substanzen notwendig. Außerdem sind Untersuchungen an weiteren Zelltypen, die Analyse weiterer Substanzen *von Pittosporum angustifolium,* vertiefte Untersuchungen zum Wirkmechanismus und schließlich auch *in vivo* Untersuchungen am Tier notwendig.

In diesen müssen neben der Überprüfung einer Wirksamkeit (*in vivo* Tumormodell notwendig) u.a. Daten zur akuten und chronischen Toxizität, zur Pharmakokinetik und zur Bioverfügbarkeit erhoben werden. Erst nach Vorliegen dieser Daten kann darüber entschieden werden, ob eine Weiterentwicklung entweder einer oder mehrerer isolierter Substanzen oder auch eines Extrakts aus *Pittosporum angustifolium* zum Arzneimittel aussichtsreich sein könnte. Diese Entwicklungsarbeiten wären dann Aufgabe der pharmazeutischen Industrie.

Auch die Überprüfung weiterer potentieller Einsatzmöglichkeiten, z.B. bei proliferierenden Hautkrankheiten, wäre interessant. Der von Hellmund (2007) angerissene Aspekt der Immunmodulation durch die Extrakte und die Reinsubstanzen sollte ebenfalls wieder aufgegriffen und detaillierter untersucht werden. Des Weiteren wäre denkbar, die Fähigkeit der *Pittosporum-angustifolium*-Saponine auf die Eignung als Adjuvans für andere zytotoxische Substanzen zu prüfen und durch die Kombination eine verbesserte Angreifbarkeit von Tumoren bei akzeptablen Nebenwirkungen zu erreichen.

5 Zusammenfassung

Ethnomedizinisch verwendete Pflanzen sind eine wichtige Quelle für neue Arzneistoffe. Die Blätter des Baums *Pittosporum angustifolium* (Trivialname: *Gumby Gumby*) werden von der indigenen Bevölkerung Australiens für verschiedene Indikationen verwendet. In Australien durchgeführte Anwendungsbeobachtungen und erste zellbiologische Untersuchungen mit der Lungen-Karzinomzelllinie A427 geben Hinweise auf den potentiellen Nutzen dieser Pflanze für die Therapie maligner Neoplasien. Wissenschaftliche Publikationen dazu gab es bisher nicht.

Ziele dieser Arbeit waren die Fortsetzung der zellbiologischen Arbeiten an einer anderen Tumorzelllinie (Urothel-Karzinom-Zelllinie U-5637) und die Gewinnung erster Erkenntnisse zu möglichen Wirkungsmechanismen sowie zum zeitlichen Verlauf der Wirkung.

Für die Erfassung der zytotoxischen Wirkungen wurde der Neutralrottest eingesetzt; als weitere Methoden wurden die Durchflusszytometrie, die FITC/AnnexinV-Färbung, die Propidium-Iodid-Färbung und die Mikroskopie verwendet. Testproben waren vier alkoholische, ein wässriger (Tee-) und ein mit Amylase behandelter wässriger Extrakt der Blätter von *Pittosporum angustifolium,* außerdem sieben von Crüsemann (2008) aus den Blättern isolierte Reinsubstanzen, bei welchen es sich vermutlich um Saponine handelt. Folgende wichtige Ergebnisse wurden erzielt:

Im Neutralrottest wurden für die 72stündige Inkubation IC_{50}-Werte zwischen 10 und 66 µg/ml ermittelt. Die stärkste Zytotoxizität zeigte das Hydrolysat, ein reines Sapogeningemisch, des *Aq.EtOH-Extraktes*. Die am schwächsten wirkenden Extrakte waren der *Tee* und der *Amylase-Extrakt.* Die Ergebnisse sprechen dafür, dass die Aglykonstruktur der enthaltenen Saponine wichtig für die Zytotoxizität der Extrakte ist.

Die maximale Zellschädigung tritt bei Applikation von Hydrolysat des *Aq.EtOH-Extraktes*, *MeOh-Extrakt* oder *Tee-Extrakt* in der jeweiligen IC_{50} Konzentration innerhalb der ersten 24 h ein.

Die drei ausgewählten Extrakte, das Hydrolysat des *Aq.EtOH-Extraktes*, der *MeOH-Extrakt* und der *Tee-Extrakt* wurden durchflusszytometrisch hinsichtlich ihres Einflusses auf den Zellzyklus geprüft. Sie bewirkten keine Phasenarretierung des Zellzyklus nach einer Inkubationszeit von 8, 24, 48 bzw. 72 h. Der *MeOH-Extrakt* und der *Tee-Extrakt* bewirkten

jeweils eine Vergrößerung der Sub-G1-Phase und induzierten damit möglicherweise Apoptose.

Mittels Durchflusszytometer und Anfärbung mit FITC/Annexin V und Propidium-Iodid wurde der beobachtete Zelluntergang in Apoptose und Nekrose differenziert.

Der *MeOH-Extrakt* und der *Tee-Extrakt* zeigten eine stärkere Apoptose- als Nekroseinduktion. Das Hydrolysat des *Aq.EtOH-Extraktes* führte dagegen eher zur Nekrose als zur Apoptose der Zellen.

Unter den erstmals getesteten 7 Substanzen, isoliert aus dem *Aq.EtOH-Extrakt*, waren die *Substanzen 4* und *6* mit einer IC_{50} von 4 bzw. 1 µg/ml im Neutralrottest am stärksten zytotoxisch aktiv.

In der Durchflusszytometrie zeigte sich mittels FITC/Annexin V und PI-Färbung eine deutliche Apoptoseinduktion in den Tumorzellen durch die *Substanz 4* [12 µg/ml] und durch die *Substanz 6* [1 µg/ml]. Im Vergleich zur Referenzsubstanz Staurosporin ist diese Aktivität nach 24stündiger Inkubation als hoch einzuschätzen. *Substanz 4* ist die Hauptkomponente des *MeOH-Extraktes* und des *Tee-Extraktes* und kann deren apoptotische Wirkung erklären. Die Nekroseinduktion durch *Substanz 4* und *Substanz 6* ist ebenfalls als relativ hoch einzuschätzen.

Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen, dass die weitere Untersuchund von *Pittosporum angustifolium* und der zytotoxische Wirkungen dieser Pflanze gegenüber Tumorzellen lohnenswert sein kann. In den nächsten Schritten sind weitere Untersuchungen der Reinsubstnazen von *Pittosporum angustifolium in vitro* und die Klärung von Struktur-Wirkungs-Beziehung, die Einbeziehung weiterer Zelllinien und von Primärzellen, die ermittlung von Dosis-Wirkungs-Kurven und von Selektivitätsindices sowie weitere Untersuchungen zum Wirkmechanismus notwendig. Auch *in vivo* Untersuchungen zur wirksamkeit, zur Pharmakokinetik und Bioverfügbarkeit und zur Toxizität in geeigneten Tiermodellen müssen durchgeührt werden. Erst nach Vorligen dieser Daten kann darüber entschieden werden, ob eine Weiterentwicklung entweder einer oder meherer isolierter substanzen oder auch eines Extraktes aus *Pittosporum angustifolium* zum Arzneimittel aussichtsreich sein könnte. Die Entwicklungsarbeiten wären dann Aufgabe der pharmazeutischen Industrie.

6 Ausblick

Notwendig sind weitere Untersuchungen der Reinsubstanzen von *Pittosporum angustifolium in vitro*, die Einbeziehung weiterer Zelllinien und von Primärzellen, die Ermittlung von Dosis-Wirkungs-Kurven und von Selektivitätsindices sowie weitere Untersuchungen zum Wirkmechanismus. Auch *in vivo* Untersuchungen zur Wirksamkeit, zur Bioverfügbarkeit und zur Toxizität in geeigneten Tiermodellen müssen durchgeführt werden. Interessant wäre des Weiteren eine Studie über die Wirkung einer selbsthergestellten Creme aus *Pittosporum angustifolium* bei proliferierenden Hautkrankheiten, da hier die Apoptosederegulation eine entscheidende Rolle spielt.

Der Aspekt der Immunmodulation durch die Extrakte und die Reinsubstanzen sollte anhand der positiven Ergebnisse von Hellmund (2007) wieder aufgegriffen und detaillierter untersucht werden.

7 Material und Methoden

7.1 Material

7.1.1 Geräte

Zellkultur und Neutralrot-Assay

Absaugsystem Vacusafe comfort	Integra Biosciences GmbH, Fernwald, D
Anthos HTII Elisa-Reader	Anthos Labtech Instruments GmbH,Wals, A
Biofuge pico Heraeus Zentrifuge	DJB labcare, Buckinghamshire, UK
Blutzählkammer BÜRKER Feinoptik	Blankenburg, Bad Blankenburg, D
Brutschrank 160K, Mytron	Heilbad Heiligenstadt, D
Canon EOS 20D	Canon, Krefeld, D
Gassicherheitsbrenner *Flammy S*	Schütt, Göttingen, D
Eppendorf Reference Pipetten (1-10 µl, 2-20 µl, 20-200 µl, 100-1000 µl)	Eppendorf, Hamburg, D
Heizplatte Präzitherm	Störk-Tronic, Stuttgart, D
1-Kanalpipetten Eppendorf Reference 20 µl, 100 µl, 1000 µl	Eppendorf, Hamburg, D
8-Kanalpipette Capp Aero	Capp A/S, Odense, DK
Inversionsmikroskop Axio Observer	ZEISS MicroImaging GmbH Göttingen
Mikroskop Olympus CK40	Olympus Deutschland GmbH, Hamburg, D
Pipettus-standard	Hirschmann, Eberstadt, D
Rührgerät IKAMAG REO	IKA Labortechnik, Staufen, D
Sterilbank HERAsafe	Heraeus Instruments, Hanau, D
Vortexer IKA-VIBRA X-VXR	Janke & Kunkel, Staufen, D
Wasserbad	Memmert, Schwabach, D
Waage Analytic AC 120 S	Sartorius, Göttingen, D
Waage Laboratory LC 620 P	Sartorius, Göttingen, D
Zellkultur Flaschen (25 cm², 75 cm²)	Biochrom AG, Berlin, D

Zentrifuge Universal 16	Hettich, Tutlingen, D

Durchflusszytometrie

Durchflusszytometer *FACSaria I* Labor: funktionelle Genomforschung, Universität Greifswald.	Becton Dickinson Biosciences, San Jose, USA
FACS Calibur®, Institut für Pharmakologie, Universität Greifswald	Becton Dickinson Biosciences, Heidelberg

Verbrauchsmaterial

Deckgläser 24 x 50 mm	VWR International, Hannover, D
Zellkultur Schalen (Ø 60 x 15 mm)	Biochrom AG, Berlin, D
Zellschaber (24 cm), steril	Biochrom AG, Berlin, D
Zentrifugenröhrchen 50 ml	Biochrom AG, Berlin, D
Petrischalen, steril	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, D
96Well- Mikrotiterplatten, flach	Biochrom AG, Berlin, D
Pipettenspitzen 1000 µl und 100 µl	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, D
Pipettenspitzen 300 µl	Biohit, Helsinki, F
Reaktionsgefäße, 1,5 ml steril	Eppendorf, Hamburg, D
Zellkulturflaschen T25 und T75, steril	TPP, Trasadingen, CH
Einmalfilter 0,2 µm	Schleicher & Schuell, Dassel, D
Einmalspritzen 10 ml, steril	Braun, Melsungen, D
Glaspipetten mit Wattestopfen, steril (5 ml, 10 ml)	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, D
Eppendorf Gefäße (1,5 ml, 2 ml)	Eppendorf, Hamburg, D
Pipettenspitzen (10 µl, 200 µl, 1000 µl)	Carl Roth, Karlsruhe, D
FACS Röhrchen	Greiner Bio-One, Frickenhausen

Sterile Pipetten, Petrischalen und Zentrifugengläser aus Glas

7.1.2 Chemikalien

Zellkultivierung

RPMI 1640 Medium 8758 (mit L-Glutamin, Phenolrot)	Sigma Aldrich, Taufkirchen, D
Fötales Kälberserum (FCS)	Sigma Aldrich, Taufkirchen, D
Hanks‘ Balanced Salt Solution HBSS (ohne Ca^{2+}/Mg^{2+})	Sigma Aldrich, Taufkirchen, D
Penicillin/ Streptomycin (10000 U/10000 µg/ml)	Biochrom AG, Berlin, D
Phosphate Buffered Saline PBS (ohne Ca^{2+}/Mg^{2+})	Biochrom AG, Berlin, D
Trypsin	Biochrom AG, Berlin, D
EDTA	Sigma Aldrich, Taufkirchen, D

Lösen der Extrakte

Amylase 54,3 U/mg	Sigma Aldrich, Taufkirchen, D
Aqua bidest	UV-filtriert
Ethanol unvergällt 96%	Carl Roth, Karlsruhe, D
Methanol	Carl Roth, Karlsruhe, D
Natriumclorid	Sigma Aldrich, Taufkirchen, D

Neutralrot-Assay

Eisessig	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, D
Etoposid	ALEXIS Biochemicals, Lausen, CH
Neutralrot	Merck, Darmstadt, D

Durchflusszytometrie

Propidium-Iodid	Sigma Aldrich, Taufkirchen, D
RNase Inhibitor	Sigma Aldrich, Taufkirchen, D
Annexin V (human) (recombinant) (APC)	ALEXIS Biochemicals, Lausen, CH
Ethanol (70%), -20°C	Carl Roth GmBH, Karlsruhe
Calciumchlorid	Sigma Aldrich, Taufkirchen, D
HEPES/NaOh (7,4 ph)	Sigma Aldrich, Taufkirchen, D
Staurosporin	Sigma Aldrich, Taufkirchen, D
Etoposid	ALEXIS Biochemicals, Lausen, CH
Triton-X	Sigma Aldrich, Taufkirchen, D

7.1.3 Lösungen und Puffer

Zellkultivierung

1640 RPMI – Medium	mit 1% V/V Penicillin/Streptomycin mit 10%V/V FCS
PBS (ohne Ca^{2+}/Mg^{2+})	9,55 g/l in Aqua bidest. gelöst und autoklaviert
EDTA	0,1 M EDTA werden hergestellt Sterilfiltration (Porengröße 0,22 µm)
PBS/ EDTA	20% EDTA (0,1 M) in PBS
HBSS (ohne Ca^{2+}/Mg^{2+})	9,75 g/l HBSS 0,35 g/l Natriumhydrogencarbonat 7,4 pH Sterilfiltration

Schwellpuffer	in Aqua bidest: 1 mM Magnesiumchlorid 20 mM TRIS-Puffersubstanz 0,5 mM Calciumchlorid 7,4 pH
Lysepuffer	5% Benzalkoniumchlorid in 3% Essigsäure in 10 ml Aqua bidest.

Neutralrot-Assay

HBSS (ohne Ca^{2+}/ Mg^{2+})	9,75 g/l HBSS 0,35 g/l Natriumhydrogencarbonat 7,4 pH Sterilfiltration
Extrakt-Gebrauchslösung	Extrakt-Stammlösung: in RPMI [100 µg/ml]
Etoposid-Gebrauchslösung	in RPMI [1,5 µM]
Neutralrot-Stammlösung	0,33g Neutralrot in 100ml steriles Aqua bidest
Neutralrot/Medium-Gebrauchslösung	Je 96-Mikrotiterplatte: 11,89 ml 1640 RPMI 120µl Neutralrotstammlösung
Extraktionslösung	in Aqua dest 50 Vol.-% EtOH, 1 Vol.-% Eisessig
Lösungsmittelkontrolle, Gebrauchslösung	in RPMI

Extrakt	***Lösungsmittelkonzentration in Spalte 4 (Extrakt [100 µg/ml])***	***Lösungsmittel - Gebrauchslösung***
Tee	0,3 % EtOH	0,9 % EtOH
Amylase	0,3 % MeOH	0,9 % MeOH
Aq EtOH	0,3 % EtOH	0,9 % EtOH
MeOH	0,3 % MeOH	0,9 % MeOH
50%EtOH	0,3 % EtOH	0,9 % EtOH
Aq.EtOH-sh	0,4 % MeOH	1,2 % MeOH

Durchflusszytometrie

Staurosporin-Gebrauchslösung	Staurosporin-Stammlösung (1 mg/ml in DMSO) in RPMI
Extrakt-Gebrauchslösung	Extrakt-Stammlösung [20 µg/ml]: in RPMI
Etoposid-Gebrauchslösung	in RPMI
Binding Buffer (für Annexin-V-Färbung)	Binding Buffer (für Annexin-V-Färbung) 10 mM Hepes/NaOH (pH 7.4) 140 mM NaCl 2.5 mM $CaCl_2$ Sterile Filtration (0,2 µm Porengröße)
RNase Gebrauchslösung	50 µg/ml
Propidium-Iodid-Stammlösung	1 mg/ml in PBS

7.2 Methoden

7.2.1 Verwendete Zelllinie

Bezeichnung	U-5637
Etablierung	1974
Organismus	Human
Ethnizität	Kaukasisch
Alter	68 Jahre
Geschlecht	männlich
Ursprungsgewebe	Primares Harnblasenkarzinom (Grad II)
Morphologie	Epithelial
Wachstumseigenschaften	Monolayer
Tumorgen	in Nacktmäusen
Produkte	IL-1, IL-6, G-CFS, GM-CSF, SCF

7.2.2 Zellkultivierung

Alle Arbeiten mit den Zellkulturen fanden in einer sterilen Werkbank statt. Die verwendeten Glasgeräte waren hitzesterilisiert (180°C). Die übrigen Geräte, Lösungen und Medien wurden autoklaviert. Die Kultivierung der Zellen erfolgte in einem CO_2-Inkubator bei 37°C, 95% Luftfeuchtigkeit und 5% CO_2.

7.2.2.1 Durchführung

Alle verwendeten Lösungen wurden im Wasserbad bei 37° C vorgewärmt; mit Ausnahme des Lysepuffers, der bei Raumtemperatur (RT) erwärmt wurde.

Die Zellen der Linie U-5637 wurden im Rhythmus Montag-Donnerstag-Montag subkultiviert. Bei optimalen Wachstumsbedingungen bildete sich nach einer Inkubationszeit von 72 h ein konfluenter Zellrasen.

Mittels Mikroskop erfolgte vor der Subkultivierung die Kontrolle der Zellmorphologie und der Zellrasenkonfluenz. Die Mengenangaben der Lösungen sind im Text auf eine 25 cm²

Kulturflasche (T25) bezogen. Die Mengenangaben für eine 75 cm² Flasche (T75) sind in ( ) angegeben.

Nach Kontrolle der Zellpopulation, folgten eine Waschung mit 1 ml (3 ml) PBS/EDTA und eine Inkubation im Brutschrank mit 1 ml PBS für 5 min Das PBS/EDTA-Gemisch wurde anschließend durch 1 ml (3 ml) Trypsin ersetzt und für 3 min im Brutschrank inkubiert. Anschließend geschieht das Ablösen der Zellen durch leichtes Klopfen am Flaschenboden. Durch Zugabe von 3 ml (5 ml) Medium wurde die Trypsinaktivität gestoppt. Die Überführung der Zellsuspension in ein Zentrifugengläschen und die Zentrifugation für 3 min mit 150 g (1000U/min) folgt. Resuspendiert wurde mit 3 ml (6 ml) Medium. In den nächsten Arbeitsschritten wurde beim Pippettieren eine Zellvereinzelung angestrebt. Für eine homogene Zellverteilung sorgte 5minütiges Vortexen. Zur Zellzählung wurden 20 µl der Zellsupension in ein 1 ml Eppendorfgefäß, das mit 460 µl Schwellpuffer befüllt ist, überführt. Anschließend folgte eine Inkubation bei RT und Raumlicht für 7 min Die Zählkammer und die neu einzusäenden Objekte wurden zwischenzeitlich vorbereitet. 20 µl Lysepuffer wurden zugeführt. Das Lysat wurde für ca. 5 min auf dem Vortexer durchmischt. 10 µl des Lysats wurden schließlich in der Zählkammer ausgezählt. Die Gesamtzellzahl ergibt sich aus folgender Formel:

Gezählte Zellzahl x 0,5 x 1111,1 x 100 (300)

Die Neueinsaat von 0,5 x 10^6 Zellen wurde in eine T25 (T75) Kulturflasche mit 5 ml (15 ml) RPMI vorgenommen. Eine T25 Reserveflasche wurde zusätzlich bereitet. Des Weiteren erfolgte in der Reserveflasche der letzten Charge ein Mediumwechsel.

7.2.3 Wachstumskurve

Die Wachstumskurve wurde erstellt, um das Teilungsverhalten der verwendeten U-5637-Zelllinie zu ermitteln. Für die zellbiologischen Tests sollten sich die Zellen in der exponentiellen Wachstumsphase befinden.

Die Beobachtung geschah in einem Zeitraum von 9 Tagen. Am Tag 0 werden jeweils 0,4 x 10_6 Zellen in 14 Zellkulturflaschen (T25) eingesät. An den Tagen 1-5, 7 und 9 wurden je 2 Zellkulturflaschen ausgezählt. Ab dem dritten Tag erfolgte in jeder Kulturflasche ein Mediumwechsel (5 ml).

Auswertung

Die Auswertung erfolgte mit Microsoft Excel®. Von den 2 ausgezählten Zellpopulationen des jeweiligen Tages wurde der Mittelwert genommen. Die Mittelwerte wurden anschließend gegen die Tage graphisch aufgetragen.

7.2.4 Lösen der Extrakte

7.2.4.1 Drogenmaterial

Als Material für die Extraktherstellung dienten grob zerkleinerte, getrocknete Pflanzenblätter von *Pittosporum angustifolium*.

Das Pflanzenmaterial war im November 2006 in der Nähe von Rockhampton, Queensland, Australien geerntet worden und wurde von Klaus von Glizscynski als das Material identifiziert, aus dem die Gumby-Gumby-Produkte hergestellt werden. Die Pflanzenblätter wurden sowohl in getrockneter als auch in frischer Form (dicht verschlossener Plastikbehälter) dem Institut für Pharmazie zugesandt. Anhand unversehrter Blätter wurde nochmals eine Verifizierung der Pflanzenart vorgenommen. Die Aufbewahrung erfolgte unter der Chargenbezeichnung *„Gumbi 29.6.07 Grasse*“ bei RT. Sowohl Hellmund (2007) als auch Crüsemann (2008) entnahmen das Material für ihre analytischen Arbeiten an *Pittosporum angustifolium* aus dieser Charge. Ein Belegexemplar befindet sich im Institut für Pharmazie, Abteilung für Pharmazeutische Biologie, Greifswald, Deutschland.

7.2.5 Überblick über die Extrakte und isolierten Verbindungen

Es wurden sechs verschiedene Extrakte der Pflanze *Pittosporum angustifolium* für die Untersuchungen herangezogen. Zusätzlich standen sieben (Misch-)Substanzen zur Verfügung, die aus dem *Aq.EtOH-sh-Extrakt* isoliert worden waren. Es handelt sich bei ihnen höchstwahrscheinlich um Triterpensaponine. Die Strukturaufklärung ist Gegenstand aktueller Forschung.

Die Herstellung der Extrakte und die Isolierung der Substanzen wurden durch Crüsemann (2008) vorgenommen. Er fokussierte sich auf die Gewinnung der Saponinen und verwendete deshalb ein Spektrum an polaren Lösungsmitteln. Details des Herstellungsverfahrens sind

seiner Arbeit zu entnehmen. Zur orientierenden Charakterisierung der Extrakte gilt folgende Übersicht:

Extrakt	***Protokoll-Vorlage***	***Bemerkung***
Tee-Extrakt	*Gumbi Gumbi Natural Therapeutic Products*	Extrakt wird vermarktet. Heilwirkung gegen verschiedene Erkrankungen wird proklamiert.
MeOH-Extrakt	Hellmund, 2007	Extrakt zeigte eine hohe *in vitro* Zytotoxizität.
50%EtOH-Extrakt	Beckwith et al. 1956	1956 wurden aus diesem Extrakt die ersten Triterpensapogenine (nach Hydrolyse) isoliert.
Aq.EtOH-Extrakt	Errington und Jefferies, 1988	1988 wurden aus diesem Extrakt insgesamt 8 Triterpene isoliert.
Aq.EtOH-Extrakt, sauer hydrolysiert (Aq.EtOH-sh-Extrakt)	Mit einem Aliquot des *Aq.EtOH-Extraktes* wurde eine saure Hydrolyse durchgeführt.	Durch die Hydrolyse wurden enthaltene Saponine in Zucker und Sapogenine gespalten.
Amylase-Extrakt	Im Rahmen dieser Arbeit hergestellt. Protokoll nach Hellmund (2007)	Die Arbeitsschritte der Herstellung sollen das Herstellungsritual der Aborigines imitieren.

Tabelle 4: Übersicht über die Herstellung der *Pittosporum angustifolium*-Extrakte

7.2.6 Herstellung des Amylase-Extraktes

Dieser Extrakt wurde im Rahmen dieser Arbeit nach dem Protokoll von Hellmund (2007) hergestellt:

Das verwendete Herstellungsverfahren sollte das traditionelle Herstellungsritual der Aborigines imitieren. Es wurde Amylase - statt Speichel - der Droge zugesetzt. Einstampfen und Rühren kopierten das Kauen:

20 g Droge wurden in einem Becherglas mit 70 ml Wasser, 0,0138 g NaCl und 0,1289 g Amylase (entspricht 100 U/ml) versetzt. Unter wiederholtem Rühren und Stampfen wurde das Gemisch für 1 h bei 37°C im Brutschrank inkubiert. Anschließend erfolgte eine Überführung in einen Stehrundkolben mit Zugabe von 100 ml Aqua bidest. Der Rundkolben wurde für 24

h auf dem Fensterbrett belassen und zwischenzeitlich mehrmals kräftig geschüttelt. Das Gemisch erfuhr schließlich eine Filtration mit anschließender Lyophilisierung.

7.2.7 Herstellung der Extrakt-Stammlösungen

Die Trockenextrakte wurden bei -20°C gelagert. Das Testmaterial für alle Versuche wurde stets aus derselben Charge des Extraktes entnommen.

Für die Herstellung der Stammlösung wurde der gefrorene Trockenextrakt ausgewogen und in einem Alkohol-Wasser-Gemisch gelöst. Da die Extrakte unsteril hergestellt worden waren, wurde zur Keimreduktion der Alkoholanteil (bei *Aq.EtOh-sh-Extrakt* erhitzt) dem Extrakt zuerst zugegeben. Für die weitere Verdünnung wurde RPMI verwendet.

Mit dem *Amylase-Extrakt* wurde eine 10 µg/ml Stammlösung, mit den anderen eine 20 µg/ml Stammlösung hergestellt. Für das Lösen der Trockenextrakte wurde kein Ultraschallverfahren verwendet, um die eventuelle Zerstörung natürlicher Strukturen zu vermeiden.

Nachdem sichergestellt war, dass wiederholt eingefrorene und aufgetaute Aliquots dieselbe Wirkpotenz wie frische Extraktlösungen hatten, wurden von den Extrakt-Stammlösungen Aliquots bei -4° C aufbewahrt und bei Bedarf in Folgeversuchen verwendet.

7.2.7.1 Tee-Extrakt

Das goldfarbene Pulver löste sich bei RT und einem Lösungsmittelverhältnis von EtOH-Aqua bidest. (60 : 40) sehr gut. Beim Vortexen zeigte sich eine deutliche Schaumbildung. Die Lösung färbte sich grün-bräunlich.

7.2.7.2 Amylase-Extrakt

Das gold-gelbliche leichte Pulver zeigte bei der Lösung eine relativ hohe Viskosität. Die vollständige Lösung stellte sich nur bis zu einer Konzentration von 10 µg/ml und Erwärmung im Wasserbad (37°C) ein. Der Extrakt wurde in EtOH-Aqua. Bidest (60 : 40) gelöst und mit Medium weiter verdünnt. Die Lösung zeigte eine starke Schaumentwicklung nach dem Vortexen.

7.2.7.3 MeOH-Extrakt

Der Extrakt hatte eine klebrige, harzige Konsistenz und eine dunkelbraune Färbung. Es wurde eine Lösung in MeOH-Aqua bidest (60 : 40) gewählt. Das Lösen wurde durch ein 3minütiges Wasserbad (37°C) und Vortexen unterstützt. Die Lösung war bräunlich gefärbt.

7.2.7.4 Aq.EtOH-Extrakt

Das war Pulver goldbraunen. Es war bei RT gut löslich in EtOH-Aqua bidest. (60 : 40). Die Lösung war gelb-grünlich gefärbt und zeigte eine mäßige Schaumentwicklung.

7.2.7.5 50%EtOH-Extrakt

Ein hellbraunes, glänzendes, voluminöses Pulver lag vor, welches eine gute Löslichkeit in H_2O, MeOH und EtOH zeigte. Es wurde eine Lösung bei RT in EtOH-Aqua bidest. (60 : 40) gewählt. Nach dem Vortexen schäumte die Lösung mäßig und war gelblich-grün gefärbt.

7.2.7.6 Aq.EtOH-Extrakt nach saurer Hydrolyse (Aq.EtOH-sh-Extrakt)

Der Extrakt lag als ein braunes Pulver vor. Es war gut löslich in MeOH und in EtOH; unlöslich in H_2O. Er wurde in MeOH-Aqua bidest. (80 : 20) bei RT gelöst. Nach der guten Lösung in MeOH erfolgte eine leichte Ausfällung bei Zugabe des Aqua bidest. Es kam außerdem zu einer leichten Ausfällung bei der weiteren Verdünnung in Medium. Die Lösung zeigte sich dunkelbraun. Das ausgefallene Material war dunkelbraun und von klebriger Konsistenz. Die saure Hydrolyse des Extraktes führte zu einem pH-Wert von 7,82 in der Extrakt-Gebrauchslösung.

7.2.8 Isolierte Substanzen

Die *Substanzen 1,2,3,4,6,7* und *8* lagen als weißes Pulver vor. Sie wurden bei –20°C aufbewahrt. Für die zellbiologischen Versuche wurde das jeweilige Pulver in MeOH gelöst und dann weiter in Medium verdünnt.

7.2.9 Zytotoxizitätsuntersuchung mittels Neutralrot-Assay

7.2.9.1 Theorie

Der *Neutralrottest* (englisch: Neutral Red Uptake Assay (NRA)) wurde erstmals von Bohrenfreund & Puerner 1985 beschrieben und etablierte sich als Zytotoxizitätstest, insbesondere bei der Untersuchung toxischer Wirkungen von Chemikalien oder Umweltproben auf die zelluläre und lysosomale Membran. Das Testprinzip beruht auf der aktiven Aufnahme von Neutralrot (3-Methyl-3-amino-7-dimethylaminophenazin) durch die Zellmembran und der Akkumulation dieses Lebendfarbstoffes vor allem in Lysosomen der intakten Zelle. Der Vitalfarbstoff ist wasserlöslich und schwach kationisch. Bei einem pH von 7,4 ist er ungeladen und diffundiert per nicht-ionischer Diffusion durch die Zellmembran. Intrazellulär bindet er an anionische Carboxyl- und Phosphatgruppen. In dem saurem Milieu der Zelllysosomen (pH < 5) findet eine Protonierung statt, die eine Rückdiffusion des Neutralrotmoleküls verhindert (*Ionenfalle*) (Nemez et al. 1979).

Membrangeschädigte Zellen sind unfähig zur Farbstoffakkumulation. Während eines durchgeführten Waschvorganges wird der nicht intrazellulär gehaltene Farbstoff herausgewaschen. Durch eine anschließende Zellwandlyse (EtOH-Eisessig) wird der Farbstoff dann rückgelöst. Die Intensität der Rot Färbung korreliert positiv mit dem Anteil an vitalen Zellen (Abb.7.2).

Mittels ELISA-Reader folgt eine photometrische Messung bei der Absorption von 540 nM. Alle Werte werden als Prozent zur unbelasteten Kontrolle errechnet.

7.2.9.2 Durchführung

Die Testdurchführung erfolgte in Anlehnung an die Methode von Borenfreund (Borenfreund & Puerner 1985).

Die beschriebenen Mengenangaben sind auf jeweils eine Vertiefung der Multiwellplatte bezogen.

Die Zellen, im Stadium im exponentiellen Wachstum, wurden in einer Zellkulturflasche wie bei der herkömmlichen Kultivierung abtrypsiniert und ausgezählt. Es wurden 2500 Zellen pro Vertiefung mit 100 µl Medium in die 96-Mikrotiterplatte eingesät. Die äußeren Reihen blieben jeweils als Messblanks frei von Zellen und wurden nur mit 100 µl Medium befüllt.

Es folgte eine Inkubation von 24 h um eine Adhärierung der Zellen zu erreichen. Die mikroskopische Kontrolle auf Zellvitalität, gleichmäßige Zellverteilung innerhalb der Reihen, Sterilität und erfolgreiche Adhäsion der Zellen geschah 24 h später. Dies gewährleistete die Vergleichbarkeit der Ergebnisse bei der späteren Auswertung.

Das Aufbringen der Testsubstanzen wurde im Anschluss wie folgt durchgeführt (Abb.7.1):

Ein Mediumwechsel wurde mit 100 µl RPMI/well in den Reihen 2, 3 und 11 und mit 150 µl/well in den Reihen 4-10 vorgenommen.

In der Reihe 2 blieben die Zellen unbehandelt. Es wurden 50 µl RPMI zugeführt. Als negative Kontrolle diente das im Extrakt mitgeführte Lösungsmittel (50 µl/well in Reihe 11). Die Konzentration der Lösungsmittelkontrolle entsprach der Lösungsmittelkonzentration in der ersten Extraktverdünnung (Reihe 4). Als Positivkontrolle dienten 0,5 µM Etoposid (50µl/well, Reihe 3). In den Reihen 4-10 erfolgte die Extraktverdünnungsreihe (150 µl/well).

	1	**2**	**3**	**4**	**5**	**6**	**7**	**8**	**9**	**10**	**11**	**12**
A	M	M	Et	100	50	25	12,5	6,25	3,12	1,56	LöM	M
B	M	M	Et	100	50	25	12,5	6,25	3,12	1,56	LöM	M
C	M	M	Et	Extrakt-Verdünnungsreihe [µg/ml]							LöM	M
D	M	M	Et	100	50	25	12,5	6,25	3,12	1,56	LöM	M
E	M	M	Et	100	50	25	12,5	6,25	3,12	1,56	LöM	M
F	M	M	Et	100	50	25	12,5	6,25	3,12	1,56	LöM	M
G	M	M	Et	100	50	25	12,5	6,25	3,12	1,56	LöM	M
H	M	M	Et	100	50	25	12,5	6,25	3,12	1,56	LöM	M

Abbildung 7.1: Einteilung der 96-Mikrotiterplatte für den Neutralrot-Assay.
M = Mediumkontrolle, LöM = Lösungsmittelkontrolle, Et = Etoposid. In den grau unterlegten Kästchen werden keine Zellen eingesät.

Nach Ablauf der Inkubationszeit (8, 48 bzw. 72 h) erfolgte eine mikroskopische Einschätzung des Zellzustandes und ein Ausschluss von Kontamination.

Die Zellen wurden mit 200 µl/well HBSS gewaschen und inkubierten 3 min mit 100 µl/well Neutralrot-Gebrauchslösung. Anschließend erfolgte eine zweimalige Waschung mit 100 µl/well HBSS. Zur Ermöglichung der Extraktion des Farbstoffes durch Zellwandlyse, wurden 100 µl/well Extraktionslösung (EtOH-Eisessig) hinzugegeben und die Platte für 45 min auf dem Vortexer (200 rpm) geschüttelt. Es folgte die photometrische Messung der Extinktion bei 550 nm.

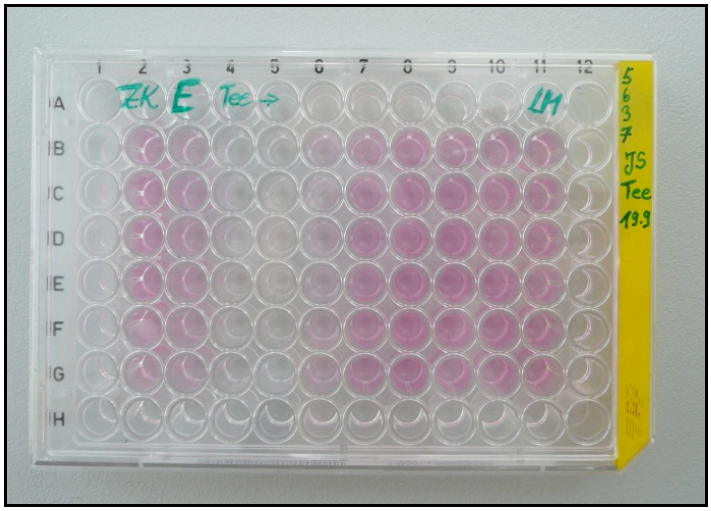


Abbildung 7.2: 96-Mikrotiterplatte nach Neutralrotinkubation.
ZK = Zellkontrolle, E = Etoposid, Tee = *Tee-Extrakt*-Verdünnungsreihe, LM = Lösungsmittelkontrolle.

7.2.9.3 Auswertung

Zunächst wurde die Menge des extrahierten Neutralrots quantitativ bestimmt (Mikrotiterplattenreader, Absorption bei 540 nm gegen Referenzwellenlänge von 690 nm). Zur Ermittlung der prozentualen Überlebensrate der Zellen, wurde zunächst der Mittelwert der Absorption der leer gebliebenen Wells von allen Werten subtrahiert. Von jeder Spalte wurde dann der Mittelwert errechnet und dieser mit dem Wert der Zellkontrolle verglichen. Die Viabilität der unbelasteten Zellen galt als 100 Prozent (in dem Zeit gestaffelten Neutralrot-Assay wurde die Viabilität der unbelasteten Zellen nach 72stündiger Inkubation als 100 Prozent gewertet). Die Berechnungen und die graphischen Darstellungen wurde mit *Microsoft Excel*® und *GraphPad Prism*® durchgeführt.

7.2.10 Zellzyklusuntersuchungen, durchflusszytometrische Methoden

7.2.10.1 Theorie

Die Durchflusszytometrie ist ein Verfahren zur Einzelzellanalyse; innerhalb eines Messschritts können gleichzeitig die Zellgröße, die intazelluläre Granularität, der quantitativen DNA Gehalt (z.B. Analyse des Malignitätgrades von Tumorzellen) und Oberflächenstrukturen (u.a. Antigene, Rezeptoren), sobald letztere durch Fluorochrome markiert sind, bestimmt werden.

Wie der Name sagt, wird zur Zellvermessung die Einzelzelle in einem Hüllstrom durch eine dünne Kapillare (*Flow Cell*) gesogen. Im "Gänsemarsch" passiert jede Einzelzelle den Fokus eines Laserstrahls geeigneter Wellenlänge, der im rechten Winkel zur Flussrichtung auf die Zelle trifft. Die Größe und die Granularität der Zelle erzeugen in jeweils unterschiedliche Richtungen abgelenkte Streulichter (*Light Scatter*). Das im engen Winkel zum Laser gelenkte Streulicht (*Forward Scatter, FSC*) ist proportional der Größe der Zelle. Das im 90° Winkel gestreute Licht (*Sideward Scatter, SSC*) entsteht durch eine komplexe Mehrfachstreuung auf Grund intrazellulärer Kompartimente, sprich Granularität, Binnenstruktur und auch Membranfaltung der Zelle (Abserotec).

Sind Zellstrukturen (DNA oder Oberflächenmoleküle) mit Fluoreszenzfarbstoffen markiert, werden die entsprechenden unterschiedlichen Emissionsspektren durch zusätzliche Laser und Detektoren erfasst. Als Detektoren dienen Photomultiplier, die das Streulicht wahrnehmen, verstärken und in elektrische Signale umwandeln (Abserotec).

In der medizinischen Diagnostik wird die Durchflusszytometrie z.B. zur Differenzierung von weißen Blutkörperchen in die Untergruppen Granulozyten, Monozyten und Lymphozyten auf Grund ihrer unterschiedlichen Größe und Granularität eingesetzt. Im Unterschied zu Blutbild-Analysegeräten ist durch das Durchflusszytometer die weitere Differenzierung in z.B. T- und B- Lymphozyten und Natürliche-Killer-Zellen, eindeutig und in kürzester Zeit möglich (Abserotec).

Zellzyklus

Eine teilungsfähige Zelle, wie es die meisten unserer Körperzellen sind, durchläuft einen Entwicklungszyklus, in dem sie sich auf die kommende Teilung vorbereitet. Unterschieden werden G1-, S-, G2/M-Phase. Im Folgenden werden diese Phasen erläutert (Zum.de):

Eine Zellteilung impliziert nicht nur, dass die Hälfte des Zytoplasmas, sondern auch jeweils ein kompletter DNA-Satz an die Tochterzellen weitergeben wird. So geht eine Verdoppelung der DNA der Zellteilung voraus. Dies erfolgt in der sog. S-Phase des Zellzyklus. In der vorhergehenden G1-Phase ist der Chromosomensatz haploid. Am Ende der S-Phase liegt ein doppelter Chromosomensatz vor. Die Zelle befindet sich dann per definitionem in der G2-Phase (*Gap* = Spalt, zwischen der S- und M-Phase). In dieser Phase kann die Zelle einige Zeit verweilen. Doch schließlich folgt der Schritt der Kernteilung. Er wird als Mitose-Phase bezeichnet (M-Phase). Der DNA-Gehalt wird dabei wieder auf den einfachen Chromosomensatz reduziert. Die Zelle geht anschließend bis zur nächsten Teilung in das Ruhestadium der G1-Phase über.

Das Durchflusszytometer ermöglicht es, die Zellgröße und den DNA-Gehalt jeder durchlaufenden Zelle zu bestimmen.

Propidium-Iodid-Färbung

Zwei Eigenschaften des Propidium-Iodid-Moleküls macht man sich zunutze: Das Molekül interkaliert im stöchiometrisch linearen Verhältnis mit der DNA und kann fluoreszieren. Die detektierte Propidium-Iodid-Menge entspricht also dem DNA Gehalt der gemessenen Zelle. Eine Aussage über die Ploidie und die prozentuale Verteilung der Zellzyklusphasen in einer Zellpopulation kann gegeben werden.

In der klinischen Diagnostik ist die Methode insbesondere für das Ermitteln des Maglinitätsgrades von Tumoren und die Einschätzung des Therapieerfolgs von Bedeutung. So haben niedrig maligne Lymphome weniger als 5% Zellen, die sich in der S-Phase befinden, hoch-maligne dagegen mehr als 10%. In Abhängigkeit von dem Befund kann die optimale Therapie gewählt werden.

Apoptose als Sub-G1-Phase im Durchflusszytometer

Apoptose bezeichnet den sog. „programmierten Zelltod“. Es kommt durch Signaltransduktion zu einem, durch die Zelle selbst kontrollierten Abbau der Zelle. Anschließend folgt die effektive Eliminierung der Zelle bzw. ihrer Bruchstücke durch Phagozytose.

Im Apoptoseprozess wird die DNA intrazellulär fragmentiert, die Zellgröße verringert sich. Im Durchflusszytometer sind die apoptotischen Zellen verkleinert. Der DNA-Gehalt ist kleiner als 2n. Die Propidium-Iodid-Intensität ist entsprechend gering. Apoptotische Zellen zeigen sich in der Histogrammdarstellung mit einer geringen PI-Intensität und verkleinertem Zellvolumen, sie sind in der sog. *Sub-G1-Phase* messbar.

Positivkontrolle Staurosporin

Staurosporin ist ein Alkaloid, das aus dem Bakterium *Streptomyces staurosporeus* isoliert wurde (Omura et al. 1977). Über bisher noch unbekannte Mechanismen aktiviert Staurosporin intrinsische Signalwege und induziert die Apoptose. Bekannt ist, dass Staurosporin die Caspase 3 aktiviert. Des Weiteren inhibiert das Alkaloid durch die kompetetive Bindung an ATP-Bindungsstellen eine Vielzahl von Proteinkinasen (*Breitbandkinaseinhibitor*) (Rüegg & Burgess 1989).

Auf Grund seiner zuverlässigen Apoptoseinduktion *in vitro* wurde die Substanz als Positivkontrolle gewählt.

Positivkontrolle Etoposid

Das Zytostatikum Etoposid bewirkt eine Hemmung der DNA-Topoisomerasen II (Schmoll et al. 1981). DNA-Topoisomerasen haben die Aufgabe den Spiralisierungsgrad intrazellulärer DNA zu kontrollieren und auf diese Weise die Replikation zu ermöglichen. Treten bei der DNA-Replikation oder Transkription topologische Fehler auf (z.B. Überwindung, Verknotung) können diese behoben werden. Die Hemmung der Topoisomerase II resultiert in letalen DNA Doppelstrangbrüchen. Da die Expression der Topoisomerasen II alpha Zellzyklus-abhängig ist (maximale Expression in der G2/M-Phase), beeinflusst Etoposid den

Zellzyklus: die Inkubation verursacht eine Arretierung des Zellzyklus in der G2/M-Phase (Schmoll et al. 1981). Dies ist der Grund warum es für die Positivkontrolle eingesetzt wurde.

7.2.10.2 Durchführung

Mit diesem Assay sollten die einzelnen Zellzyklusphasen von U-5637-Zellen nach der Extrakt-Inkubation quantitativ erfasst werden.

U-5637-Zellen, in der exponentiellen Wachstumsphase, wurden wie bei der herkömmlichen Kultivierung abtrypsiniert und ausgezählt. Es wurden jeweils 1 x 106 Zellen mit 3 ml Nährmedium in jeweils eine Zellkulturschale (T25) gesät. Jede Schale wurde leicht kreuzweise horizontal geschwenkt, um eine homogene Zellverteilung auf dem Substrat zu erreichen.

Für die gewünschte Zelladhäsion erfolgte eine Inkubation über 24 h im Brutschrank.

Der Adhäsionserfolg, Sterilität sowie die Homogenität des Zellrasens wurden 24 h später mittels Mikroskop kontrolliert. 3,4 ml Nährmedium ersetzten im nächsten Schritt das alte Medium und 100 µl der Testsubstanz wurden jeweils zugesetzt. Eine Versuchsschale führte nur mit Nährmedium behandelte Zellen (Kontrollpopulation). Als Positivkontrolle, d.h. zur Darstellung eines G2-Arrestes bzw. der Apoptose, wurde Etoposid [0,5 µM] bzw. Staurosporin [8 nM] gewählt. Als Lösungsmittelkontrolle diente Ethanol [0,3%]. Die verwendeten Konzentrationen für die Extrakte *Tee-Extrakt*, *Aq.EtOH-sh-Extrakt* und *MeOH-Extrakt* entsprachen der IC_{50} und 2 x IC_{50}. Um eine gleiche Behandlung aller Schalen untereinander zu gewährleisten, wurden in einem Versuch maximal 4 Schalen eingesetzt.

Zur Gewinnung abgestorbener und in der Kulturflüssigkeit schwimmender Zellen wurde ein zweimaliger Waschvorgang mit erwärmten HBSS vorgenommen. Sowohl die HBSS als auch das verbrauchte Medium wurden jeweils in ein Falkonröhrchen überführt. Jede mit HBSS gewaschene Schale erhielt 1 ml PBS/EDTA und inkubierte 7 min im Brutschrank. Es folgte ein Austausch durch 1 ml Trypsin und eine 3minütige Inkubation im Brutschrank. Durch achtsames Klopfen der Schale an einer harten Kante sowie durch den Abspülungseffekt bei der Zugabe von 3 ml RPMI, wurden die Zellen vom Boden abgelöst und in das zugehörige (mit dem alten Mediumüberstand gefüllte) Falkonröhrchen überführt.

Es folgte eine Zentrifugation für 3 min bei 150 x g (1000U/min). Das Zellpellet wurde mit 2 ml PBS resuspendiert und erneut für 3 min zentrifugiert. Das PBS wurde vorsichtig aus dem

Falkonröhrchen abgekippt, so dass ein Flüssigkeitsspiegel (ca. 100 µl) über dem Zellpellet erhalten blieb.

Mittels Vortexer wurde das Zellpellet erneut resuspendiert. 1 ml Ethanol (-20°C) wurden schließlich hinzugegeben (die ersten 500 µl tropfenweise). Zur Fixation der Zellen erfolgte eine Lagerung für 24 h bei -4°C.

Propidium-Iodid-Färbung:

Die Proben erhielten eine Zentrifugation für 3 min bei 150 x g (1000 U/min). Das Ethanol wurde durch 2 ml PBS ausgetauscht und es folgte eine weitere Zentrifugation (150 g, 1000 U/min, 3 min). Nach Absaugen des Überstandes wurden 500 µl RNase-Gebrauchslösung (50 µg/ml) hinzugegeben. Die Proben inkubierten dann für 30 min im Brutschrank. Anschließend wurden 500 µl PI-Lösung zugeführt (Endkonzentration 50 µg/ml). Es folgte eine Inkubation bei RT unter Lichtabgeschlossenheit (Ummantelung der Probenröhrchen mit Aluminiumfolie). Die Auswertung und Messung erfolgten während der nächsten 30-60 min am FACS*Calibur*®.

7.2.10.3 Auswertung

Die Auswertung erfolgt in vier Schritten.

1) *Dot-plot-Diagramm* (*FCS* gegen *SSC*)

   Jede gemessene Zelle stellt einen Punkt (*Dot*) in einem sog. *Dot-plot-Diagramm* (Punktwolkendiagramm) dar (Abb.8.3). In diesem werden die Intensitäten zweier Messparameter (z.B. *FSC/SSC*) aufgetragen. Sinn der Anwendung ist das Schaffen einer anschaulichen Plattform für das sog. *Gaten* (Schleusen, siehe unten). Des Weiteren wird erkenntlich, ob die aufgetragenen Parameter in einer Abhängigkeit zueinander stehen. Ist dies der Fall, entsteht im Diagramm die Form einer Diagonale. Korrelieren beide Parameter nicht miteinander, entstehen in der Graphik verteilte Punktwolken, die entweder für das eine oder das andere Signal positiv sind.

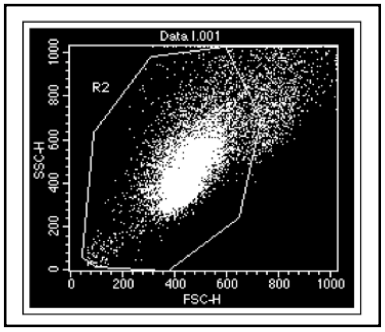


Abbildung 7.3: *Dot-plot-Diagramm.*
FSC-H = Forward Scatter, SSC-H = Sideward Scatter, R2 = Gate „R2“. Ereignisse im Gate „R2“ werden in einem neuen *Dot-plot-Diagramm* dargestellt (Abb.7.4).

2) *Gaten*

Das *Gaten* ist ein Selektierungsschritt, der nach dem Messdurchlauf mit Hilfe der Software durchgeführt wird. Im *Dot-plot-Diagramm* wird eine Region (z.B. Ereigniswolke) festgelegt. Nur Ereignisse dieser Region (= Subpopulation des Zellgemisches) werden in die weitere Betrachtung einbezogen. Nicht zugehörige Zellpopulationsbestandteile, z.B. Zelldebris oder Zelldentritus, werden auf diese Weise herausgefiltert.

Verknüpfungen von mehreren *Gates* mit “UND”, "ODER”, “NICHT” sind möglich.

Dot-plot-Diagramme und Histogramme können so adjustiert werden, dass sie nur Ereignisse eines *Gates* darstellen.

3) *FL-2A-* gegen *FL-2W-Dot-plot*

Zur weiteren Sortierung definiert man im eine neue Region (Abb.7.4, markierte Population). Das erwünschte Histogramm wird auf diese Population *gegated* um G1-Dupletten von der G2/M-Analyse auszuschließen. G1-Dupletten besitzen einen gleich großen DNA-Gehalt wie G2/M-Zellen, morphologisch sind jedoch doppelt so groß. Die Population innerhalb von *Gate R1* lässt sich nun in einem Histogramm anzeigen.

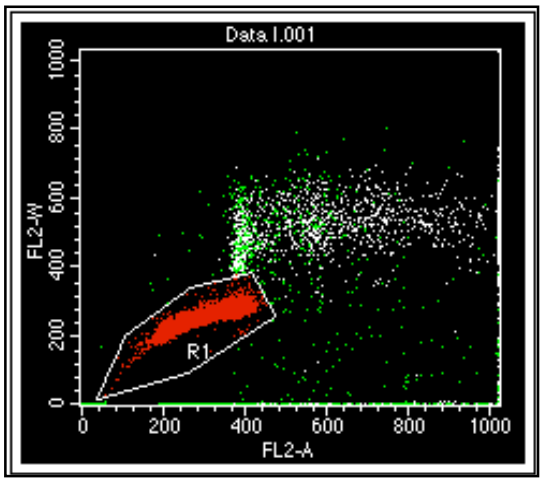


Abbildung 7.4*: Dot-plot-Diagramm.*

FL-2A = Peak-Fläche des Propidium-Iodid-Fluoreszenssignals, FL-2W= Peak-Breite des Propidium-Iodid-Fluoreszenssignals, R1= *Gate R1* Die Peak-Fläche ist proportional zum DNA-Gehalt der Zellen. Die Peak-Fläche hilft Dupletten zu unterscheiden: G1-Dupletten haben den gleichen DNA-Gehalt, wie Zellen in der G2-Phase, brauchen aber länger, um durch den Laserfokus zu kommen: es entsteht ein größeres FL-2W-Signal. Zellen aus dem *Gate R1* werden in ein Histogramm übertragen.

4) *Histogramm*

Das Histogramm ist die einfachste Form der Darstellung. Hier werden den gemessenen Ereignissen unterschiedliche Fluoreszenzintensitäten zugeordnet und diese gegen ihre Häufigkeit aufgetragen. Im unteren Beispiel wird die PI-Intensität gegen die Zellzahl aufgezeichnet. Für jede Zellzyklus-Phase wird ein Marker gesetzt (Abb.7.5, M1-M4).

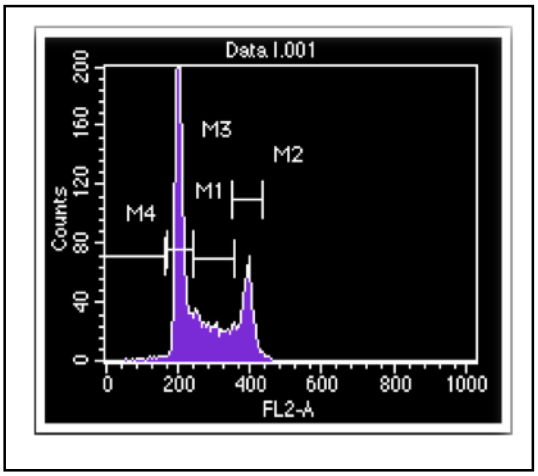


Abbildung 7.5: Zellzyklusdarstellung mittels Histogramm nach Propidium-Iodid-Färbung.

Counts = Zellzahl. FL2-A = Propidium-Iodid-Intensität (korreliert mit dem DNA-Gehalt) Zellzyklusstadien: M1 = S-Phase, M2 = G2-Phase, M3 = G1/G0-Phase, M4 = Sub-G1-Phase

5) *Marker Statistik*

Von der Software wird eine Marker-Statistik angefordert, um schließlich die prozentuale Verteilung der Zellzyklusphasen in der gemessenen Population darzustellen (Abb.7.6). Es folgten eine Verarbeitung der Daten in *Microsoft Excel®* und die Übersetzung in Säulendiagramme.

File: Data 1.001 Acquisition Date: 12-No
Gate: G1 Gated Events: 9213
Total Events: 11905 X Parameter: FL2-A (Lin

Marker	Left, Right	Events	% Gated	% Total
All	0, 1023	9213	100.00	77.39
M1	168, 241	5372	58.31	45.12
M2	349, 433	1839	19.96	15.45
M3	241, 355	2064	22.40	17.34
M4	0, 162	50	0.54	0.42

Abbildung 7.6: Quantitative Zellzyklusdarstellung, Markerstatistik.

Statistische Darstellung des Histogramms. Zellzyklusstadien: M1 = S-Phase, M2 = G2-Phase, M3 = G1/G0-Phase, M4 = Sub-G1 Phase.

7.2.11 Bestimmung der Nekrose- und Apoptoseinduktion mittels Durchflusszytometer und Propidium-Iodid/Annexin-V-Färbung

7.2.11.1 Theorie

Apoptose und Nekrose

Die Zellbiologie unterscheidet verschiedene Formen des Zelltodes. Es lässt sich der „programmierte“, kontrollierte Zelluntergang, Apoptose genannt, von einem unkontrollierten, als Nekrose bezeichneten Zelltod unterschieden (Majno & Joris 1995):

Das Nekrosegeschehen wird u.a. durch starke physikalische oder chemische Noxen, schwere Ischämien oder Infektionen ausgelöst. Es ist im Gegensatz zur Apoptose stets Zeichen eines pathologischen Geschehens. Der Nekroseprozess verläuft sehr schnell und führt in der Regel zu einer Entzündungsreaktion, welche eine Aktivierung des Immunsystems hervorruft und häufig mit Organschädigung und Defektheilung einher geht. Es besteht ein erhöhtes Risiko für das Auslösen von Autoimmunreaktionen. Im Gegensatz zur Apoptose ist die Nekrose kein Prozess, der mit einer Form einer physiologischen Organentwicklung in Zusammenhang steht.

Die Apoptose ist ein physiologischer Prozess, der von der Zelle aktiv durchgeführt wird. Sie beschreibt eine selektive Eliminierungsstrategie, die für die Aufrechterhaltung der Zellhomöostase innerhalb des Organismus bzw. der Embryogenese zwingend erforderlich ist. Sie ist über komplexe intrazelluläre Signalkaskaden aktiv gesteuert und resultiert in der effektiven Beseitigung einzelner Zellen. Apoptotische Zellen bzw. ihre Bruchstücke werden phagozytiert. Eine Entzündungsreaktion des Körpers bleibt aus. Fehlregulationen vermögen hyperproliferative Defekte, wie zum Beispiel unkontrollierte Neoplasien, Autoimmunität und Embryo-Letalität hervorzurufen.

Die Apoptose beginnt mit einer Aktivierung oder *De-novo*-Synthese von Proteinen als Komponenten der Protein-Signalketten. Es werden Signale von Rezeptoren auf der Zellmembran empfangen (z.B. CD95/Fas, TNFR) und über verschiedene Caspasen zum Nukleus weitergeleitet (Hengstenberg 1999).

Für die Detektion apoptotischer Zellen gibt es verschiedene Verfahren. Sie stützen sich auf dem Nachweis von Veränderungen der Zellmorphologie, der Zusammensetzung und

Transportfunktion der Plasmamembran, der DNA-Stabilität gegenüber Denaturierung oder aber der endonukleolytischen DNA-Fragmentierung (Willingham 1999).

Referenzsubstanz Triton

Triton-X diente als Referenzsubstanz zur Nekrosedarstellung. Es ist ein Tensid, dass Proteine aus der Zellmembran herauslöst. Durch die Störung der Membranintegrität wird die Zelle zerstört.

Durchflusszytometrische Differenzierung von Apoptose und Nekrose

Dem Versuch liegt das Prinzip zugrunde, apoptotische und nekrotische Zellen durch Zugabe von Propidium-Iodid (PI) und FITC/Annexin-V unterschiedlich anzufärben.
Das Durchflusszytometer detektiert die Fluoreszensintensität beider verwendeter Fluorchrome: FITC (gebunden an den Antikörper Annexin-V) und PI:
Annexin-V bindet an Phosphatidylserin, welches während der frühen Phase der Apoptose an die Außenseite der Zellmembran transloziert wird.
Der Nekroseprozess dagegen ist durch eine Membranpermeabilisierung und konsekutive Zellschwellung charakterisiert. Das kleinere PI-Molekül dringt dann in die Zelle ein und interkaliert mit DNA- und RNA-Strukturen.
Sowohl in der späten Phase der Nekrose als auch der Apoptose finden beide Prozesse statt. Es kommt dann zu einer doppelt positiven Fluoreszenz.

7.2.11.2 Durchführung

Im Dienste der Vergleichbarkeit wurde ebenso wie unter 7.2.10.7 beschrieben vorgegangen: die U-5637-Zellen wurden in kleine Zellkulturschalen (je 1 x 10^6 Zellen) eingesät und für 24 h inkubiert. Das Medium wurde mit 3,4 ml/Schale ersetzt. Von der zu testenden Substanz wurden 100 µl Gebrauchs-Lösung hinzugegeben:

Getestete Extraktkonzentrationen:

- *Tee-Extrakt* [100 µg/ml]
- *Aq.EtOH-sh-Extrakt* [20 µg/ml]
- *MeOH-Extrakt* [50 µg/ml]
- Staurosporin [24 µg/ml], Positivkontrolle (Apoptoseinduktor):
- 0,3% EtOH, Lösungsmittelkontrolle
- Nur mit Nährmedium behandelte Zellkontrolle

Die Proben inkubierten für 10 h bzw. 24 h. Es folgte das Abnehmen und Überführen des Mediumüberstandes in jeweils ein Falkonröhrchen. Durch einen zweimaligen Waschvorgang mit HBSS (2x1 ml) wurden restliche lose Zellen aufgenommen.

Die Menge HBSS wurde in das zugehörige Falkonröhrchen gegeben. Die Zellen erhielten 1 ml PBS/EDTA und wurden für 7 min unter Standardbedingungen inkubiert. Das PBS/EDTA-Gemisch wurde gegen 1 ml Trypsin ausgetauscht. Anschließend inkubierten die Proben wurden für 3 min im Brutschrank. Durch leichtes Klopfen an der Schalenkante wurde das Ablösen der Zellen unterstützt. Zur Abstoppung der Trypsinaktivität wurden 3 ml RPMI zupipettiert. Durch Abspülen des Schalenbodens sollte effektiv das endgültige Ablösen der Zellen erreicht werden. Die Zellsuspension wurde in ihr zugehöriges Falkonröhrchen überführt. Es folgte eine Zentrifugation der Proben bei 150 x g (1000 U/min) für 5 min. Der Überstand wurde abgesaugt, die Zellen in 1 ml PBS resuspendiert und anschließend 5 min zentrifugiert 150 x g (1000U/min). Der Überstand wurde abgenommen und das Pellet in Binding-Buffer aufgenommen. Eine Zelldichte von 2-5 x 10^5/ml wurde eingestellt. Die Zell- und Lösungsmittelkontrolle wurden deshalb mit 1,5 ml Binding-Buffer, die restlichen Proben mit 1 ml Binding-Buffer behandelt. 195 µl der Zellsupension wurden mit 5 µl Annexin-V-Stammlösung in ein kleines Eppendorfgefäß überführt. Aus dem Röhrchen der unbehandelten Zellen wurde eine zweite Probe entnommen und im folgenden Prozess gleichwertig mitgeführt. Es unterblieb jedoch die Zugabe der Färbesubstanzen. Diese Probe diente der Adjustierung des Durchflusszytometers.

Es erfolgte eine 10minütige Inkubation bei Lichtabgeschlossenheit und RT. Die Zellen wurden mit 500 µl PBS gewaschen, zentrifugiert und in 190 µl Binding Buffer resuspendiert. 10 µl PI-Gebrauchslösung wurden zugefügt. Innerhalb der nächsten 10 bis 30 min erfolgte die Messung am Durchflusszytometer.

Einstellung des Durchflusszytometers:

Die unbelasteten und ungefärbten Zellen dienten der Einstellung des Lasers. Die unbelasteten und gefärbten Zellen bestimmten die Grenzen der *Gates*.

7.2.11.3 Auswertung

Die Datenaquisition und Auswertung erfolgt mit der *BD FACSDiva*™ Software. Zum Ausschluss von Fehlinterpretationen werden die Messwerte im *FSC/SSC-Dot-plot* adjustiert. So werden Zelltrümmer ohne Zellkern und apoptotische Partikel ohne Zellkern heraus selektiert. Weiter wird ein zweites *Dot-plot-Diagramm* erstellt: die Annexin-V-Intensität wird gegen die PI-Intensität aufgetragen. Das *Dot-plot-Diagramm* der Zellkontrolle erhielt eine Einteilung in vier Quadranten. Die Charakteristika des Quadranten galten als Beschreibung für den Zellzustand (Abb.7.7). Diese vorgenommene Quadranteneinteilung wurde wie eine Schablone auf die anderen *Dot-plot-Diagramme* übertragen. Nun erfolgte eine statistische Auswertung der Quadranten. Die Ergebnisse wurden mittels *Microsoft-Excel*® verarbeitet und graphisch dargestellt.

Dot-plot-Diagramm

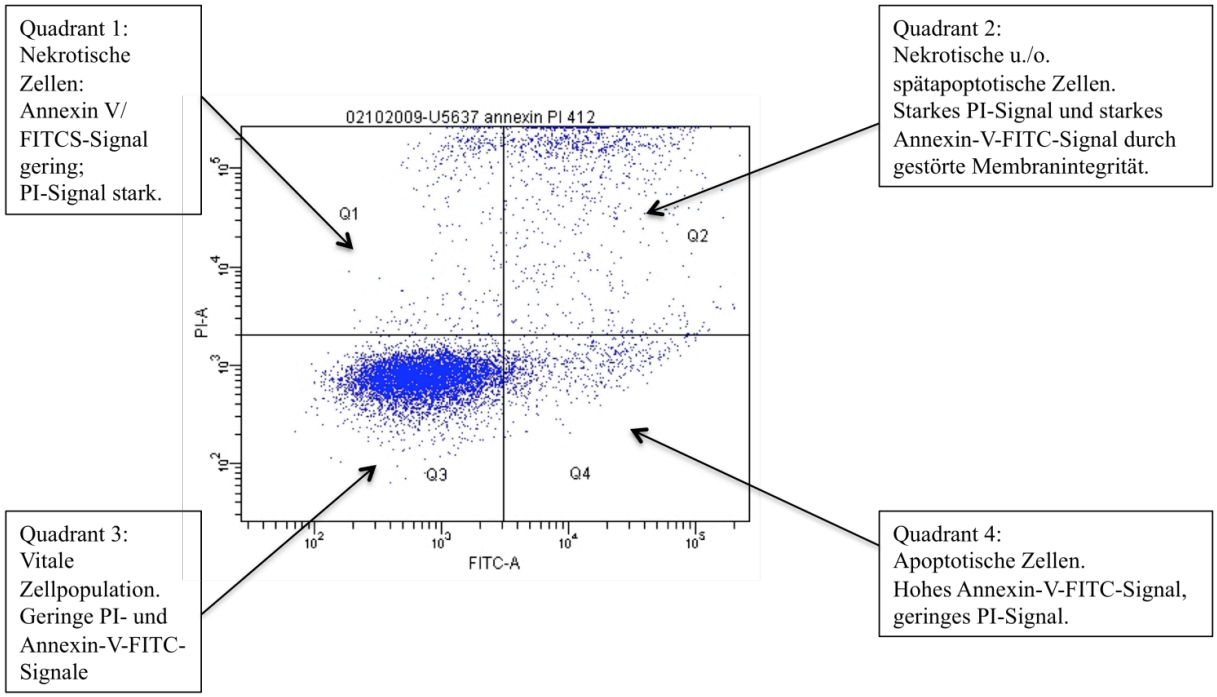


Abbildung 7.7: Darstellung der Auswertungsstrategie der Durchflusszytometrie.
Durch die Einteilung des Annexin-V/PI-*Dot-plots* in vier Quadranten ergibt sich die Zuteilung der gemessenen Zellen zu einem Zellzustand. Graphik nach Riemschneider (2001).

8 Literaturverzeichnis

ABSEROTEC. Erläuterungen zur Durchflusszytometrie.
URL: http://www.abdserotec.com/uploads/Flow-Cytometry.pdf (eingesehen: 30.03.2011)

AUSTRALIENPLANTS. Foto von *Pittosporum angustifolium.*
URL:http://www.australianplants.com/images/photos/Pittosporum_angustifolium_syn_P_phylliraeoides.jpg (eingesehen: 01.04.2011)

BAGHAM AD, HORNE RW,GLAUERT M, DINGLE JT, LUCY JA (1962) *Action of saponin on biological cell membranes*. Nature 196:952-955

BARR A, CHAPMAN J, SMITH N, WIGHTMAN G, KNIGHT T, MILLS L, et al. (1993) *Traditional Aboriginal Medicines in the Northern Territory of Australia,* 1993, Aborinal Communities of Northern Territory. Conservation Commission of the Northern Territory, Darwin, Australia

BARUA AK, MAITI PC, CHAKRABORTI SK (1961) *Triterpenoids XI. New triterpenoids from the fruits of Barringtonia acutangula*. J Pharm Sci 50:937-940

BECKWITH AL, COLE ARH, WATKINS JC, WHITE DE (1956) *Triterpenoid Compounds-III.Phillyrigenin.* Austral J Chem 9:428-431

BEUTH J (2008) *Proteolytic Enzyme Therapy in Evidence-Based Complementary Oncology: Fact or Fiction?* Int Cancer Ther 7:311-316

BORENFREUND E, PUERNER JA (1985) *A simple quantitative procedure using monolayer cultures for cytotoxic assays.* J Tiss Cult Meth 9:7-9

BRACHAN C, SUTHERLAND M, HEISLER I, HEBESTREIT P, MELZIG MF, FUCHS H (2006) *The Saponin enhanced mediated uptake of targeted Saponin-based drugs is strongly dependent on the saponin structure.* Experim Biol and Med 231:412-420

CARSON CF, HAMMER KA, RILEY TV (2006) *Melaleuca alternifolia (Tea Tree) Oil: a Review of Antimicrobial and Other Medicinal Properties.* Clinical Microbiology Reviews 19:50-62

CARSON CF, RILEY TV (1995) *Antimicrobial activity of the major components of the essential oil of Melaleuca alternifolia.* Journal of applied Bacteriology 78:264-269

CAYZER LW, CRISP MD,TELFORD IRH (2000) *Revision of Pittosporum (Pittosporaceae) in Australien.* Austr Syst Bot 13:845-902

CHAE HJ, KANG JS, BYUN JO, et al. (2000*) Molecular mechanism of staurosporine-induced apoptosis in osteoblasts*. Pharmacological Research. 42:373–381

CHANDLER GT, PLUNKETT GM; PINNEY SM; CRAYZER LW; GEMMILL CEC (2007) *Molecular and morphological agreement in Pittosporaceae: phylogenetic analysis with nuclear ITS and plastid trnL-trnF sequence data.* Aust Syst Bot 20:390-401

CHOPRA CS, WHITE DE, MELROSE GJH (1965) *Triterpene Compounds-VIII.The constitution of Phillyrigenin.* Tetrahedron 21:2585-2592

CONCHA JM, MOORE LS, HOLLOWAY W (1998) *Antifungal activity of Melaleuca alternifolia (tea-tree) oil against various pathogenic organism.* Journal of the American Podiatric Medical Association 88:489-492

CRONQUIST (1981) *An integrated system of classification of flowering Plants*. Columbia University Press, New York.

CRÜSEMANN M (2008) *Isolierung und Charakterisierung bioaktiver Inhaltsstoffe von Pittosporum angustifolium.*Diplomarbeit, Institut Pharmazeutische Biologie, E.M.A.-Universität, Greifswald

D'AQUARICA I, DIGIOVANNI MC, GASPARRINI F, MISITI D, D`ARRIGO C, et al. (2002) *Isolation and structure elucidation of four new estersaponins from fruits of Pittosporum tobira.* Tetrahedron 58:10127-10136

E-FLORA. Electronic flora of South Australia.
URL: http://www.flora.sa.gov.au/cgi-bin/speciesfacts_display.cgi?form=speciesfacts&name=Pittosporum_phylliraeoides (eingesehen: 06.04.2011)

ERRINGTON SG, JEFFERIES PR (1988) *Triterpenoid sapogenins of Pittosporum phillyraeoides*. Phytochemistry 27:543-545

ERRINGTON SG, WHITE DE, FULLER MW (1967) *The structures of A1-Barrigenol*. Tetrahedron Letters 3:100-104

FARM4. Foto von *Pittosporum angustifolium* (2009).
URL:http://farm4.static.flickr.com/3466/3355942530_6eab406e3c.jpg (eingesehen: 05.04.2011)

FLORABANK. *Pittosporum angustifolium*.
URL:http://www.florabank.org.au/lucid/key/Species%20Navigator/Media/Html/Pittosporum_angustifolium.htm (eingesehen: 31.03.2011)

FRANCIS G, KEREM Z, MAKKAR HP,BECKER K. (2002) *The biological action of saponins in animal systems: a review* British Journal of Nutrition 88:587-605

FUCHS HE, BACHRAN D, PANJIDEH H, SCHELLMANN N, WENG A, MELZIG M, SUTHERLAND M, BACHRAN C (2009) *Sponins as tool for improved targeted tumor therapies.* Current Drug Targets 10:140-151

GODDARD C, KALOTAS A (1988) *Punu- Yankunytjatjara plant Use*. Angus and Robertson Publishers, North Ryde

GRATUS C, WILSON S, GREEFIELD SM, et al. (2009) *The use of herbal medicines by people with cancer: a qualitative study.* BMC Compl and Alt Med 9:14

GRUND C, JENSEN U (1981) *Systematic relationships of the Saxifragales Revealed by serological characteristics of seed proteins*. Plant Systematics and Evolution 137:1–22

GUMBI-GUMBI.COM.Gumbi Gumbi Natural Pty. Ltd. Internetvertrieb von Gumby-Gumby-Pärparaten.
URL: http://www.gumbigumbi.com/index.html (eingesehen am: 05.04.2011)

HAYDEN B (1979) *Paleolithic Refelections, Lithic Technology and ethnographic Excavations among Australien Aborigines*. Australien Institute of Aboriginal Studies, Canberra ACT

HELLMUND S (2007) *Biologische und chemische Untersuchungen von Pittosporum phillyraeoides* Diplomarbeit, Institut für Pharmazie, E.M.A.-Universität, Greifswald

HENGSTENBERG K (1999) *Untersuchung von Proteinen des Cytoskeletts während der Apoptose,* Dissertation. Fakultät für Biologie, Ruhr-Universität Bochum

HIGUCHI R, KOMORI T, KAWASAKI T, LASSAK EV (1983) *Triterpenoid saponins from leaves of Pittosporum undulatum.* Phytochemistry 22:2565-2569

HOBERT I (2007) *Die Medizin der Aborogines.* 2. Auflage.Oesch Verlag, Zürich.

ITO S, OGINO T, SUGIYAMA H, KODAMA M (1967) *Structures of A_1-Barrigenol and R_1-Barrigenol.* Tetrahedron Letters 24:2289-2294

ITOKAWA H, SAWADA N, MURAKAMI T (1967) *Structure of Camelliagenin A, B and C obtained from Camellia japonica*. Tetrahedron Letters 27:597-601

JAIN GK, PAL R, KHANNA NM (1980) *Spermicidal Saponins from nilghirense Wight et Arnott*. Ind J Pharm Sci 42:12-13

KILLEEN GF, MADIGAN CA, CONNOLLY CR, WALSH GA, CLARK C, HYNES MJ, TIMMINS BF, JAMES P, HEADON DR, POWER RF (1998) *Antimicrobial saponins of Yucca schidigera and the implications of their in vitro properties for their in vivo impact*. J of Agric and Food Chem 46:3178-3186

LASSAK EV, MCCARTHY T (1983) *Australien Medical Plants.* 1 Auflage. North Ryde: Methuen, Australia

LATZ P, GREEN J (1995) *Bushfire and Trucker: Aboriginal Plant Use in central Australia.* IAD Press, Alice Springs

MAJNO G, JORIS I (1995) *Apoptosis, oncosis, and necrosis. An overview of cell death.* American Journal of Pathology 146:3-15

MAN SL, GAO MY, ZHANG YJ, et al. (2010) *Chemical study and medical application of saponins as anti-cancer agents* Fitoterapia 81:703-714

NAKATA H, KIKUCHI Y, TODE T, HIRATA J, KITA T, ISHII K, KUDOH K, NAGATA I, SHINOMIYA N (1998) *Inhibitory effects of ginsenoside Rh2 on tumor growth in nude mice bearing human ovarian cancer cells.* Jpn J Cancer Res19:65-71

NATURALMED. Medical herbs & natural herbs.
URL: http://www.naturalmedicinalherbs.net/herbs/p/pittosporum-phillyreoides=weeping-pittosporum.php (eingesehen: 06.04.2011)

NAVARRO P, GINER RM, RECIO MC, et al. (2001) *In vivo inflammatory activity of Saponins from Bupleurum rotundifolium*. Life Science 68:1199-1206

NEMEZ Z, et al. (1979) *The phramacological relevance of vital staining with neutral red*. Experentia 35:1475-1476

NEWMAN DJ, CRAGG GM (2007) *Natural products as Sources of new drugs over the last 25 years.* Journal of Natural Products 70:461-477

ODA K, MATSUDA H, MURAKAMI T, KATAYAMA S, OHGITANI T, YOSHIKAWA M (2002) *Adjuvant and haemolytic activities of 47 saponins derived from medical and food plants*.The Journal of Biological Chemistry 381:67-74

OMURA S, IWAI Y, HIRANO A, NAKAGAWA A, AWAYA J, TSUCHIYA H, TAKAHASHI Y, MASUMA R (1977) *A new alkaloid AM-2282 of Streptomyces origin taxonomy, fermentation, isolation and preliminary characterization*". *J. Antibiot* 30: 275–282

PATENT.DE. Patentschrift (2009)
URL: http://www.patent-de.com/20090402/DE102007044094A1.html (eingesehen: 31.3.2011)

PLANTASYSTEMATICS. *Pittosporum angustifolium-Baum*. Foto 2008.
URL:http://www.plantsystematics.org/imgs/meredith/r/Pittosporaceae_Pittosporum_angustifolium_27320.html (eingesehen: 31.03.2011)

PLOHMAN B, BADER G, HILLER K, FRANZ G (1997) *Immunomodulatory and antitumoral effects of triterenoid saponins.* Pharmazie 52:953-957

QUETIN-LECLERCQ J, ELIAS R, BALANSARD G, BASSLEER R, ANGENOT L (1992) *Cytotoxic Activity of Some Triterpenoid Saponins*. Planta Med 58: 279-281

RIEMSCHNEIDER S (2001) *Zur Rolle reaktiver Sauerstoffspezies bei UV-vermittelten Veränderungen an Keratinozyten unter besonderer Berücksichtigung von Wachstum, Apoptose und DNS-Modifikationen*. Dissertation, Math Nat Tech Fakultät, Universität Halle

RÜEGG UT, BURGESS GM (1989) *Staurosporine, K-252 and UCN-01: potent but nonspecific inhibitors of protein kinases.* Trends in Pharmac Sc 10: 218-220

SCHMOLL, NIEDERLE N, ACHTERRATH, W (1981) *Etoposid, eine antineoplastische Substanz aus der Reihe der Podophyllotoxine.* Klin Wochenz 59:11-1188 Springer-Verlag

SEGAL R, SHATKOVSKY P, MILO-GOLDZWEIG I (1974) *On the mechanism of saponin hemolyses-I.Hydrolyses of the glycosidic bond*. Biochem Pharm 23:973-981

SEMPLE S, Reynolds GD, O'Leary MC, Flower RL (1998) *Screenig of Australian medical plants for antiviral activity.* J of Ethno-Pharm 60:163-72

SEO Y, BERGER JM, HOCH J, et al. (2002) *Biodiversity conservation and drug discovery in Madagascar. Part 1. A new triterpene saponin from Pittosporum viridiflorum from the Madagascar rainforest*. J of Nat Prod 65:65-68

SPARG SG, LIGHT ME, VAN STADEN J (2004) *Biological actvities and distribution of plant saponins.* J of Ethno Pharm 94:219-243

STUHLFAUTH T, FOCK H, HUBER H KLUG K (1985) *The distribution of fatty acids including petroselinic and tatitic acid in the fruit and seed oils of the Pittosporaceae, Araliaceae, Umbelliferae, Simarubaceae und Rutaceae*. Biochemical Syst and Ecol 13:447-453

TUNDIS R, BONESI M, DEGUIN B, LOIZZO M, MENICHINI F, CONFORTI F, TILLEQUIN F, MEICHINI F (2009) *Cytotoxic activity and inhibitory effect on nitric oxide production of triterpene saponins from the roots of Physospermum verticillatum (Waldst&Kit)(Apiaceae).* Bioorganic & Medicinal Chemistry 17:4542-4547

WEBB L (1969) *The use of plant medicines and poisons by Australian Aborigines*. Mankind 7:137-146

WILLINGHAM M *(1999) Cytochemical Methods for the Detection of Apoptosis.* Histochem Cytochem 47:1101

WOLDMICHAEL GM, WINK M (2001) *Identification and biological activities of triterpenoid saponins from Chenopodium quinoa*. J Agric Food Chem 49:2327-2332

XIAO, YI YH, WANG ZZ, et al. (1999) *A cytotoxic triterpene saponin from the root bark of Aralia dasyphylla.* J Of Nat Prod 62:1030-1032

YOSIOKO I, IMAI K, KITAGAWA I (1967) *On genuine sapogenins of horse chestnut saponins by means of soil bacterial hydrolysis and a new minor sapogenin: 16-desoxy-Barringtogenol C.* Tetrahedron Letters 27:2577-2580

ZHAO P, DAI M, CHEN WQ, et al. (2010) *Cancer Trends in China.* Jap J of Clin Onco 40:281-285

ZHOU XY, FU FH, LI Z, DONG QJ, WANG CH (2000) *Escin, a Natural Mixture of Triterpene Saponins, Exhibits Antitumor Activity Against Hepatocellular Carcinoma.* Pharmazie 55:72-74

ZUM.DE. Inhalte zur modernen Biologie. Der Zellzyklus. URL:http://www.zum.de/Faecher/Materialien/hupfeld/index.htm?/Faecher/Materialien/hupfeld/Cytologie/zell-zyklus/zell-zyklus.html (eingesehen: 01.04.2011)

ZHONG L, GUIQING Q, PING L, JIAN H, DEAN G (2003*) Induction of Apoptosis and G2/M cell cycle arrest by Gleditsioside E from Gleditsia sinensis in HL-60 cells.* Planta Med 69:561-563

Bemerkung: Die angegebenen Internetseiten sind in PDF-Format bei mir erhältlich.

9 Anhang

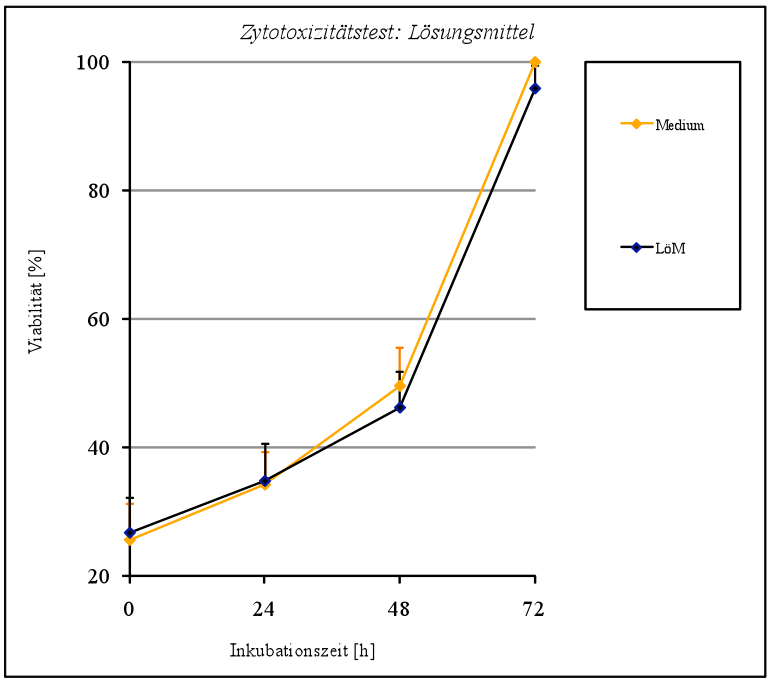


Abbildung 9.1: Darstellung der Viabilität von U-5637-Zellen in Abhängigkeit von der Zeit, Lösungsmittelkontrolle.
LöM = EtOH [0,3%]. Viabilität der mit Medium behandelten Zellen (72 h inkubiert) = 100 Prozent. Neutralrot-Assay. Mittelwert (n = 18) ± Standardabweichung.

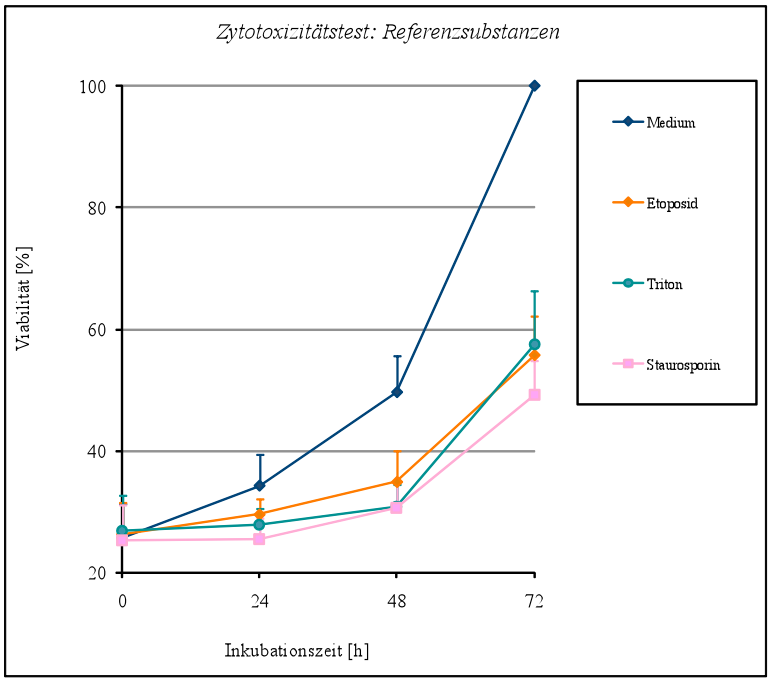


Abbildung 9.2: Darstellung der Viabilität von U-5637-Zellen in Abhängigkeit von der Zeit, Referenzsubstanzen.
Etoposid [0,5 µM] ; Triton 1 nM ; Staurosporin [8 nM].. Viabilität der Zellkontrolle (72 h inkubiert) = 100 Prozent. Neutralrot-Assay Mittelwert (n = 18) ± Standardabweichung.

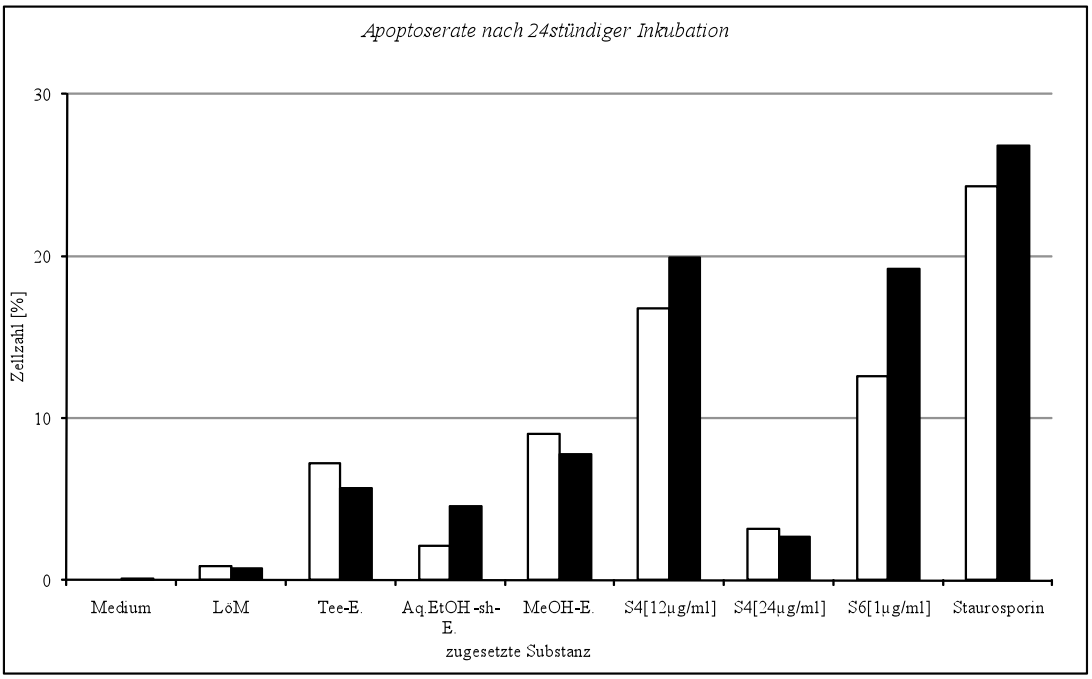


Abbildung 9.3: Durchflusszytometrische Bestimmung der Apoptoserate von U-5637 Zellen nach 24stündiger Inkubation.
Zugesetzte Substanzen: Staurosporin [32 µM], LöM = Lösungsmittelkontrolle: 0,6% EtOH, Sub4 = *Substanz 4*, Sub6 = *Substanz 6*, Tee = *Tee-Extrakt*: [100 µg/ml], EtOH-sh-E. = *Aq.EtOH-sh-Extrakt* [20 µg/ml], MeOH-E. = *MeOH-Extrakt* [50 µg/ml]. Ergebnisse einer Zweifachbestimmung.

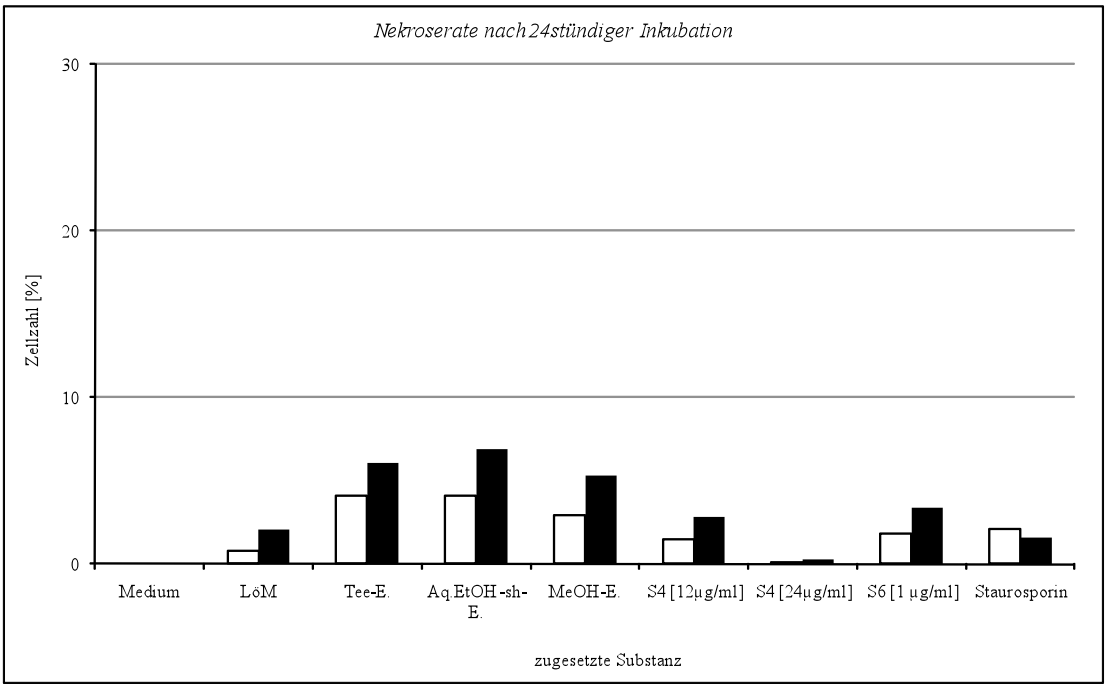


Abbildung 9.4: Durchflusszytometrische Bestimmung der Nekroserate von U-5637 Zellen nach 24stündiger Inkubation.
Zugesetzte Substanzen: Staurosporin [32 µM], LöM = Lösungsmittelkontrolle: 0,6% EtOH, Sub4 = *Substanz 4*, Sub6 = *Substanz 6*, Tee = *Tee-Extrakt*: [100 µg/ml], EtOH-sh-E. = *Aq.EtOH-sh-Extrakt* [20 µg/ml], MeOH-E. = *MeOH-Extrakt* [50 µg/ml]. Ergebnisse einer Zweifachbestimmung.