



universität
wien

DIPLOMARBEIT

Titel der Diplomarbeit

Isolierung apolarer Komponenten aus *Caesalpinia sappan* und
Untersuchung ihrer Bioaktivität und Stabilität

verfasst von

Constanze Victoria Richter

angestrebter akademischer Grad

Magistra der Pharmazie (Mag.pharm.)

Wien, 2015

Studienkennzahl lt. Studienblatt:

A 449

Studienrichtung lt. Studienblatt:

Diplomstudium Pharmazie

Betreut von:

o. Univ.-Prof. Mag. Dr. Helmut Viernstein

Danksagung

Als Erstes möchte ich mich sehr herzlich bei Herrn o. Univ.-Prof. Mag. Dr. Helmut Viernstein bedanken, da mir durch Ihn diese Diplomarbeit am Department für Pharmazeutische Technologie und Biopharmazie ermöglicht wurde.

Ein ganz besonderer Dank gilt Frau MMag. DI Dr. Monika Müller, die mir bei jeder fachlichen Frage immer wieder beratend zur Seite gestanden hat, sei es persönlich, per Email oder auch über das Handy. Vielen Dank für die umfassende Betreuung.

Danke möchte ich auch Frau Mag. Roswitha Schuster sagen, mit der die lehrreiche Zeit bei der „Zellenpflege“ immer wie im Flug verging. Vielen Dank für Deine Unterstützung in allen Bereichen.

Der gesamten Arbeitsgruppe gilt mein Dank für die herzliche Aufnahme und den im Rahmen meiner Arbeit, wenn benötigten, Hilfestellungen.

Bei meiner Familie, meinen Freunden und Studienkollegen möchte ich mich bedanken, dass ihr mir die teilweise sehr graue Zeit des Studiums stets erheitert habt, mich gefordert und gefördert habt und immer ein offenes Ohr für mich und meine Sorgen hattet.

Nicht zuletzt gilt der größte Dank meiner Mutter Johanna Richter und Tobias Papst. Vielen Dank für Eure Unterstützung, die Aufmunterungen, und dass ihr stets an mich geglaubt habt.

Vielen Dank!

Abstract (Deutsch)

Caesalpinia sappan, eine strauchartige Pflanze, ist in weiten Teilen Südostasiens verbreitet. Dort wird sie häufig traditionell zur Behandlung von verschiedenen Erkrankungen eingesetzt. Um zu eruieren welche Inhaltsstoffe die heilende Wirkung auslösen, wurde die Pflanze eingehender untersucht. Die polarerer Komponenten wurden in vorangegangenen Arbeiten untersucht. Zur Gewinnung apolarerer Komponenten wurde die Auftrennung des ethanolischen Extrakts mittels Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (High Performance Liquid Chromatography, HPLC) optimiert. Es konnten fünf Fraktionen isoliert werden, die die Ausgangsbasis für weitere Untersuchungen bildeten.

Im Anschluss wurden die isolierten Fraktionen auf ihre antiinflammatorische Wirksamkeit untersucht. Eine diesbezügliche Wirkung konnte bei allen gewonnenen apolareren Fraktionen festgestellt werden. Die untersuchte Interleukin-6 Reduktion der Fraktionen, bei einer Konzentration von 100 µg/ml, reichte von 40 bis 75 %. Zwei Fraktionen (F 10 und F 11) wiesen im Zuge der Untersuchung auf antiinflammatorische Wirksamkeit zytotoxische Wirkungen auf. Aufgrund dieses Befunds wurden beide Fraktionen auf eine antikanzerogene Wirksamkeit an drei verschiedenen Krebszelllinien getestet. Beide Fraktionen zeigten (in einer Konzentration von 100 µg/ml) eine antikanzerogene Wirksamkeit auf alle untersuchten Krebszelllinien. Die höchste Wirksamkeit bei den Versuchen wurde an einer HeLa-Zelllinie (F 10 – 36 % überlebende Krebszellen, F 11 – 24 % überlebende Krebszellen), die schwächste Wirksamkeit auf eine Caco-2 Zelllinie (F 10 – 56 % überlebende Krebszellen, F 11 – 40 % überlebende Krebszellen) ermittelt.

Abschließend wurde die Lagerungsbeständigkeit der isolierten Fraktionen getestet. Dabei wurde eine hohe Stabilität im trockenen Zustand, aber nur eine eingeschränkte Lagerungsstabilität im gelösten Zustand festgestellt.

Abstract (Englisch)

Caesalpinia sappan is a shrub-like plant that is common in Southeast Asia. There it is frequently used as a traditional treatment of various diseases. The aim of this thesis is to identify which ingredients of the plant exert bioactivity. The more polar components have already been investigated in previous theses. To obtain the more nonpolar components, the fractionation of the ethanolic extract was optimized. Five fractions were isolated, which formed the basis for the following analysis.

Subsequently, the isolated fractions were examined for their anti-inflammatory activity. A relevant efficacy has been observed for all of the more nonpolar fractions. The examined interleukin-6 reduction ranged from 40 to 75 %. Two fractions (F 10 and F 11) showed a cytotoxic effect during the investigation for anti-inflammatory efficacy. Due to this finding, the two fractions were tested for anti-cancer activity in three different cancer cell lines. Both fractions showed anticarcinogenic potencies at a concentration of 100 µg/ml in all tested cancer cell lines. The highest efficacy was measured in the experiments with a HeLa cell line (F 10 – 36 % surviving cancer cells, F 11 – 24 % surviving cancer cells), the weakest efficacy with a Caco-2 cell line (F 10 – 56 % surviving cancer cells, F 11 – 40 % of surviving cancer cells).

Finally, the storage stability of the isolated fractions was tested. A high stability in the dry state, but only limited storage stability in a dissolved state were detected.

Inhaltsverzeichnis

Seite

1	Einleitung.....	1
1.1	<i>Caesalpinia sappan</i> – Vorstellung der Pflanze	2
1.2	Entstehung der Entzündung.....	3
1.3	Makrophagen RAW 264,7.....	4
1.4	Krebszelllinien.....	6
1.4.1	Kolorektalkarzinomzelllinie (Caco-2).....	6
1.4.2	Mammakarzinomzelllinie (MCF-7)	7
1.4.3	Zervixkarzinomzelllinie (HeLa).....	8
1.5	Zellviabilitätstest (MTT – Test)	10
1.6	Enzyme-linked Immunosorbent Assay (ELISA).....	10
2	Material und Methoden.....	11
2.1	Extraktion	11
2.2	Hochleistungsflüssigchromatographie (HPLC).....	12
2.2.1	Analytische HPLC.....	12
2.2.1.1	Analytische HPLC von <i>Caesalpinia sappan</i>	13
2.2.1.2	Gradientenoptimierung.....	13
2.2.2	Präparative HPLC	15
2.2.2.1	Präparative HPLC von <i>Caesalpinia sappan</i>	16
2.2.2.2	Aufarbeitung der Fraktionen	17
2.2.3	HPLC Methode zur Überprüfung der Reinheit	17
2.2.4	HPLC Methode zur Bestimmung der Stabilität der Fraktionen.....	18
2.2.4.1	Stabilität der Fraktionen bei Lagerung in gelöstem Zustand (mit TFA)	18
2.2.4.2	Stabilität der Fraktionen bei Lagerung in gelöstem Zustand (ohne TFA).....	19
2.2.4.3	Stabilität der Fraktionen bei trockener Lagerung	19
2.3	Zellkultur	20
2.3.1	Verwendete Zelllinien	20
2.3.1.1	Kultivierung von RAW 264,7	20

	Seite
2.3.1.2 Kultivierung von Caco-2	20
2.3.1.3 Kultivierung von MCF-7	20
2.3.1.4 Kultivierung von HeLa	20
2.3.2 Grundlegende Arbeitstechniken	21
2.3.2.1 Wechsel des Mediums	21
2.3.2.2 Subkultivierung der Zellen	21
2.3.3 Untersuchung der antiinflammatorischen Wirkung mithilfe von Makrophagen	22
2.3.4 Durchführung des Zellviabilitätstest (MTT – Test)	23
2.3.5 Optimierung der Zellzahl	24
2.4 Enzyme-linked Immunosorbent Assay (ELISA).....	24
3 Ergebnisse und Diskussion	27
3.1 Auftrennung von <i>Caesalpinia sappan</i> Extrakt mittels präparativer HPLC.....	27
3.2 Reinheit der aufgetrennten Fraktionen von <i>Caesalpinia sappan</i>	30
3.3 Antiinflammatorische Wirkung von <i>Caesalpinia sappan</i>	34
3.4 Zytotoxizität der Fraktionen 10 und 11 von <i>Caesalpinia sappan</i> auf Krebszelllinien....	36
3.4.1 Zytotoxizität der Fraktionen 10 und 11 auf die Caco-2 Zelllinie.....	37
3.4.2 Zytotoxizität der Fraktionen 10 und 11 auf die MCF-7 Zelllinie.....	37
3.4.3 Zytotoxizität der Fraktionen 10 und 11 auf die HeLa Zelllinie	38
3.5 Stabilität von <i>Caesalpinia sappan</i> Fraktionen.....	39
3.5.1 Stabilität der Fraktionen in Lösung	39
3.5.2 Stabilität der Fraktionen als Festsubstanz	48
4 Zusammenfassung.....	50
5 Tabellen und Abbildungsverzeichnis.....	52
5.1 Tabellenverzeichnis	52
5.2 Abbildungsverzeichnis	52
6 Quellenverzeichnis.....	54

1 Einleitung

Alternativ zur Wirkstoffentwicklung im Labor spielt die Gewinnung wirksamer Substanzen aus der Natur eine wichtige Rolle. Diesen natürlichen Wirkstoffen kommt rund um die Welt seit Jahrtausenden in der Behandlung von Erkrankungen eine große Bedeutung zu. Eine solche tradierte Wirkung hat in Fernost zum Beispiel das Sappanholz.

Caesalpinia sappan ist eine strauchartige Pflanze, die in weiten Teilen Südostasiens verbreitet ist. In ihren Heimatregionen wird sie seit langem zur Behandlung von verschiedenen Krankheiten und Symptomen eingesetzt. Neben dem vielfältigen traditionellen Einsatz, wurden in verschiedenen Untersuchungen unter anderem antiinflammatorische [1], antikonvulsive [2] und antibakterielle [3] Wirkungen aufgezeigt. Um genauer festzustellen welche Inhaltsstoffe der Pflanze pharmazeutische Wirkungen haben, ist die Isolierung und Untersuchung einzelner Komponenten vonnöten.

Verschiedene polarere Komponenten der Pflanze wurden bereits gewonnen und bezüglich ihrer antiinflammatorischen Wirkung erfolgreich untersucht.

Im Rahmen dieser Arbeit werden apolarere Komponenten der Pflanze aus einem ethanolischen Auszug isoliert und gezielt auf antiinflammatorische und antikanzerogene Wirkung getestet.

Um eventuelle Instabilitäten der Pflanzenauszüge bei einem Einsatz als Medikament vorab bewerten zu können, werden Stabilitätsuntersuchungen in verschiedenen Lösungen und als Trockensubstanz durchgeführt.

1.1 *Caesalpinia sappan* – Vorstellung der Pflanze

Caesalpinia sappan ist eine immergrüne [2] strauch- oder baumartige bis zu 6 m hohe Pflanze, die zur Familie der Caesalpiniaceae gehört. Die Pflanze ist flaumig behaart, bis auf die alten Äste, diese tragen auffällige und dichte Lentizellen [4].



Abbildung 1 Illustration von *Caesalpinia sappan* [5]

Sie stammt aus Asien, der genaue Ursprungsort ist allerdings unbekannt, in der Literatur werden verschiedene Orte genannt. Kultiviert wird sie heute in Indien, Thailand, Indonesien, China, Myanmar, aber auch in Peru [6].

Das hauptsächlich verwendete Kernholz ist orange rot und sehr hart. Im asiatischen Raum wird es volksmedizinisch als Teegetränk unter anderem zur Behandlung von Schmerzen eingesetzt. Ebenso wird die Pflanze häufig in der Ayurveda verwendet [6]. Besonders durch ihren volksmedizinischen Einsatz trägt sie nicht nur den botanischen Namen *Caesalpinia sappan*, sondern ist auch unter dem Namen „Su Mu“ [7] in China oder „Phang“ [8] in Thailand bekannt.

Wissenschaftliche Untersuchungen, die aufgrund ihres verbreiteten volksmedizinischen Einsatzes durchgeführt wurden, zeigten folgende Wirkungen der Pflanze:

- Antioxidativ [6]
- Antiinflammatorisch [1, 9, 10]
- Antibakteriell [3, 11]
- Antikonvulsiv [2]
- Antiallergisch [8]
- Antioxidativ [12]

- Antikancerogen [13]

Es wurden bereits einige Komponenten aus dem Sappanholz isoliert und identifiziert. Viele Berichte haben gezeigt, dass die meisten bekannten Komponenten phenolisch sind und sich strukturell in vier Gruppen unterteilen lassen. Diese vier sind:

Brazilin, Chalkone, Protosappanin und Homoisoflavonoide [14]

Brazilin ist ein sauerstoffhaltiger, phenolischer Heterozyklus, der als Hauptkomponente des Holzes angenommen wird[6]. Es konnten dieser Komponente bereits mehrere Wirkungen in verschiedenen Studien nachgewiesen werden, wie zum Beispiel antiinflammatorische [1] und antibakterielle Wirkung. In seiner reinsten Form ist Brazilin eine farblose Substanz, die sich bei Kontakt mit Sauerstoff oder milden alkalischen Oxidationsmitteln rot verfärbt [3].

Traditionell wird das Holz in erster Linie als wässrige Zubereitung eingesetzt. Es hat sich aber in Studien gezeigt, dass ein alkoholischer Extrakt eine etwas größere Aktivität aufweist (zumindest in Zusammenhang mit der antibakteriellen Wirkung) [3].

1.2 Entstehung der Entzündung

Eine Entzündung ist ein Abwehrmechanismus des Körpers, als Reaktion auf schädigende Einflüsse, die verschiedenste Ursachen haben können. Es wird dabei unterschieden zwischen mechanischen, chemischen und physikalischen Einflüssen. Weitere Ursachen einer Entzündungsreaktion können Mikroorganismen oder Fremdkörper sein [15].

Bei einer Entzündung wird zwischen der akuten und der chronischen Entzündung unterschieden. Im weiteren Verlauf wird nur die akute Entzündung detaillierter vorgestellt.

Die akute Entzündung ist eine meist lokal begrenzte Reaktion, die sich mit den seit dem Altertum bekannten Symptomen zeigt [16]:

- Rubor (Rötung)
- Calor (Wärme)
- Tumor (Schwellung)
- Dolor (Schmerz)

Als Reaktion auf einen der oben genannten schädigenden Einflüsse, werden im Gewebe Mastzellen und im Blut basophile Granulozyten aktiviert. In der Folge degranulieren die Mastzellen, und die in den Granula gespeicherten Entzündungsmediatoren werden freigesetzt. Im weiteren Verlauf werden durch ein Zusammenspiel verschiedener Mediatoren eine erhöhte Vasodilatation, eine erhöhte Permeabilität des Endothels und eine Reizung der Nozizeptoren verursacht, die das Auftreten der Symptome erklären. Dabei bewirkt die Erhöhung der Vasodilatation eine Rötung und Erwärmung des Gewebes. Durch eine Erhöhung der Zellwanddurchlässigkeit erfolgt ein Ausströmen proteinhaltiger Flüssigkeit, wodurch das Gewebe anschwillt. Die Reizung der Nozizeptoren führt zur Empfindung des Schmerzes [15].

Am Entzündungsort entstehen aus Monozyten Makrophagen, deren Hauptaufgabe es ist, an dieser Stelle die Auslöser der Entzündung zu phagozytieren und enzymatisch abzubauen. Währenddessen schütten Makrophagen weitere Entzündungsmediatoren aus, wie zum Beispiel Interleukin-6 und $\text{TNF}\alpha$ [17].

Sobald die schädigende Ursache beseitigt ist, kann das entzündete Gewebe abheilen [15].

Interleukin-6

Interleukin-6 (IL-6) kann den proinflammatorischen Zytokinen zugerechnet werden [18]. Verschiedene Zellen, unter anderem Endothelzellen, T-Zellen und Monozyten bzw. Makrophagen, produzieren IL-6 [19]. Studien zeigen, dass es eine große Rolle bei der Entwicklung von Akutphase Proteinen spielt, wie sie zur Abwehrreaktion des Körpers benötigt werden [20]. Bei einer akuten Entzündung fördert es die Expansion und die Aktivierung von T-Zellen und die Differenzierung von B-Zellen [21].

Es zeigen sich Hinweise, dass IL-6 auch eine zentrale Rolle bei der Entwicklung von chronischen Entzündungen spielt [22].

1.3 Makrophagen RAW 264,7

Die Makrophagen RAW 264,7 sind aufgrund von empirisch festgestellten Ergebnissen eine sehr geeignete, zuverlässige und oft genutzte Zelllinie, insbesondere in Bezug auf die

Stimulation mit Lipopolysaccharid (LPS) [23]. Daher wurden sie auch in den, dieser Arbeit zugrunde liegenden, Versuchen verwendet.

Die RAW 264,7 (ATCC® TIB-71™) Zellen sind eine Makrophagen Zelllinie, die aus einer männlichen erwachsenen Maus (BAB/14) extrahiert wurden [24]. Die Zellen wurde anschließend mit dem Abelson Maus Leukämie Virus infiziert. Es erfolgte eine Tumorbildung, aus dem diese Zelllinie entnommen wurde [25]. Die Zellen sind in Abbildung 2 bei niedriger und hoher Konfluenz abgebildet.

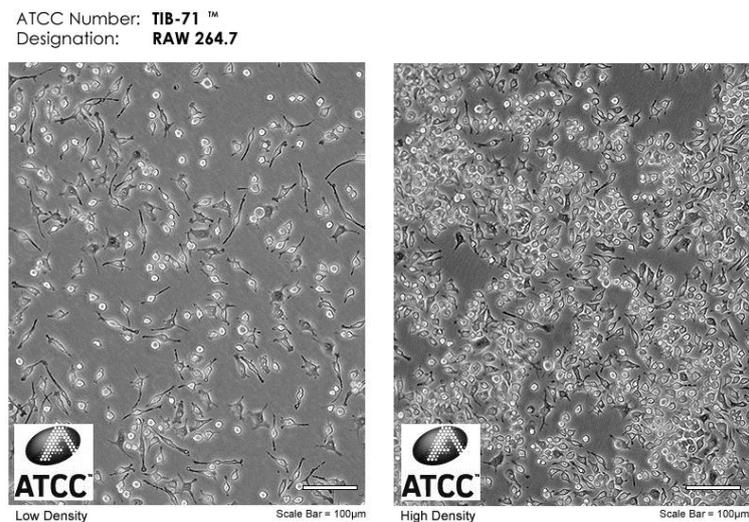


Abbildung 2 RAW 264,7 Zelllinie, dargestellt bei niedriger und bei hoher Zelldichte (ATCC Collection, 2014) [26]

Morphologisch sind die Makrophagen als adhären wachsende Zelllinie zu betrachten. Allerdings kann sich während des Wachstums eine Mischung aus anhaftenden und suspensionsartig verteilten Zellen ausbilden. In sehr dicht bewachsenen Zellkulturen können sich einzelne Zellen ablösen und in das Medium übergehen [24].

1.4 Krebszelllinien

In den folgenden Abschnitten werden die für diese Arbeit verwendeten Krebszelllinien vorgestellt.

1.4.1 Kolorektalkarzinomzelllinie (Caco-2)

Das Kolorektalkarzinom gehörte 2012 bei Männern zu den fünf am häufigsten diagnostizierten Krebsarten [27]. Die Entstehung eines solchen Karzinoms erfolgt meist aus anfangs gutartigen Darmpolypen, die im weiteren Verlauf entarten. Die Therapie erfolgt in erster Linie als radikale Tumorentfernung, wobei der nächstgelegene Lymphknoten ebenfalls entfernt wird. Wird der Tumor sehr frühzeitig erkannt, liegt die 5 – Jahresüberlebensrate bei über 90 % [28].

Caco-2 Zellen (stammen aus einem Kolorektalkarzinom) sind eine, in der Forschung häufig verwendete Zelllinie, die unter anderem genutzt wird, um eine Vorhersage der problemlosen Absorption von Arzneistoffen im Intestinum zu treffen [29].

Die Zellen Caco-2 [Caco2] (ATCC® HTB-37™), die einem Adenomkarzinom entnommen wurden, stammen von einem 72 jährigen männlichen Kaukasier [30, 31].

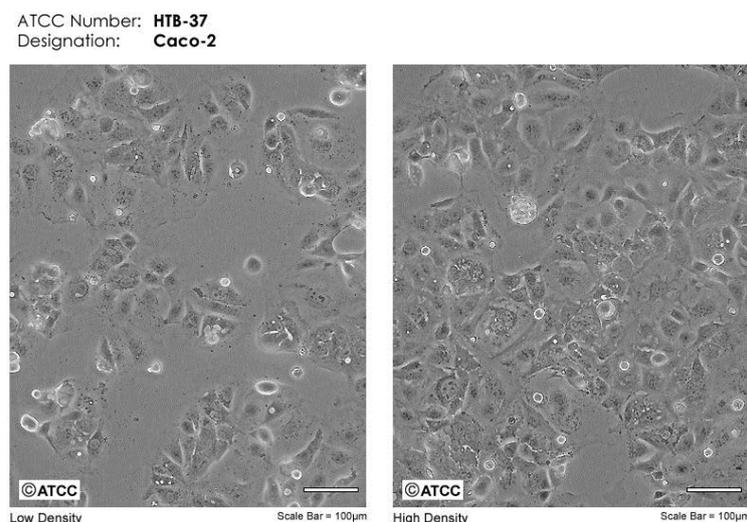


Abbildung 3 Caco-2 Zellen bei geringer Zelldichte (links) und bei hoher Zelldichte (rechts) (ATCC Collection, 2014) [32]

Morphologisch haben Caco-2 Zellen keine einheitliche Struktur. Es treten verschiedene Zelltypen in der Kultur in Erscheinung (vgl. Abbildung 3). Die meisten sind kubisch oder

ähneln in ihrem Aussehen Epithelzellen; es treten auch einige Riesenzellen auf. Des Weiteren ist es nicht unüblich, dass die Zellen Vakuolen ausbilden. Sobald die Zellen konfluent sind, scheinen sie eine klare Grenze zu haben, d.h. die Zelle ist zur nächsten durch einen kleinen Zwischenraum abgegrenzt [31].

1.4.2 Mammakarzinomzelllinie (MCF-7)

Brustkrebs gehörte laut dem WHO World Cancer Report zu den häufigsten bei Frauen festgestellten Krebsarten im Jahr 2012 [27]. Für die Entstehung eines Mammakarzinoms können unter anderem Hormone verantwortlich gemacht werden, aber auch Umwelteinflüsse und die Ernährung. Die Wahrscheinlichkeit an Brustkrebs zu erkranken ist in westlichen Industrienationen um den Faktor sechs höher, als in asiatischen Ländern. Bei den hormonellen Einflussfaktoren sind es sowohl endogene, als auch exogene Hormone. Ein endogener Faktor, der einen Schutz darzustellen scheint, ist eine frühe Schwangerschaft (die werdende Mutter ist jünger als 18 Jahre), wohingegen eine späte Menopause das Risiko an Brustkrebs zu erkranken, erhöht. Zu den exogenen Faktoren gehören orale Kontrazeptiva und Hormonersatztherapien in der Menopause [28].

Die Mammakarzinomzelllinie MCF-7 stellt die erste erfolgreiche Extraktion einer Brustkrebszelllinie dar, bei der es gelang die freischwimmenden Zellen in eine stabile Zelllinie zu überführen [33]. Da dieser Durchbruch der Michigan Cancer Foundation gelang, wurde diese Zelllinie MCF genannt [34].

Die Zelllinie MCF-7 (ATCC[®] HTB-22[™]) ist einem metastasierenden Brustkrebs einer 69-jährigen Kaukasierin entnommen worden. MCF-7 Zellen sind eine langsam wachsende Zelllinie, die als lose anhaftende dreidimensionale Cluster mit einigen losen, aber lebenden Zellen erscheint [33, 35]. Abbildung 4 ist eine Darstellung der Zellen bei niedriger und hoher Zelldichte.

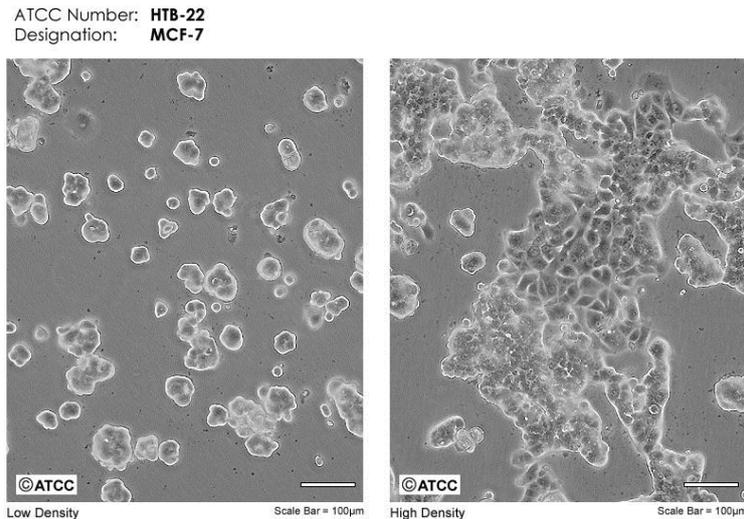


Abbildung 4 MCF-7 Zellen bei niedriger Zelldichte (links) und bei hoher Zelldichte (rechts) (ATCC Collection, 2014) [36]

1.4.3 Zervixkarzinomzelllinie (HeLa)

Ein Zervixkarzinom - es wird der Gebärmutterhals befallen - gehört ebenfalls zu den fünf am häufigsten bei Frauen diagnostizierten Tumoren [27]. Die Ursache für den Tumor ist in fast allen Fällen eine Infektion mit Humanen Papilloma Viren, besonders 15 Subtypen sind als tumorinduzierend eingestuft worden [37]. Die meisten Karzinome am Gebärmutterhals werden durch regelmäßige Vorsorgeuntersuchungen bereits im Frühstadium erkannt. Dabei ist die Heilungschance als sehr hoch einzustufen [28].

HeLa Zellen (dem Zervixkarzinom entnommen) waren die erste menschliche Zelllinie, die in Kultur genommen werden konnte. Seitdem hat sie sich zu einer der meist genutzten menschlichen Zelllinien in der Forschung entwickelt. Entnommen wurden diese Zellen 1951 der Patientin Henrietta Lacks. Durch die durchgeführte Anonymisierung erhielten die Zellen daher die Kurzbezeichnung HeLa [38]. Durch HeLa Zellen gelang es, einen Impfstoff für Kinderlähmung zu etablieren, da sich der Poliovirus in HeLa Zellen stark vermehren kann und die Zellen durch die Infektion mit diesem Virus zugrunde gehen [39].

HeLa Zellen zeigen eine epithelähnliche Struktur (siehe Abbildung 5). In geringer Zelldichte haben sie eine etwas länglichere Form. Sobald die Kultur jedoch annähernd Konfluenz erreicht, werden die Zellen eher länglich kubisch. Bei steigender Konfluenz erscheinen mehr runde und abgelöste lebende Zellen [40-42].

ATCC Number: **CCL-2**
Designation: **HeLa**

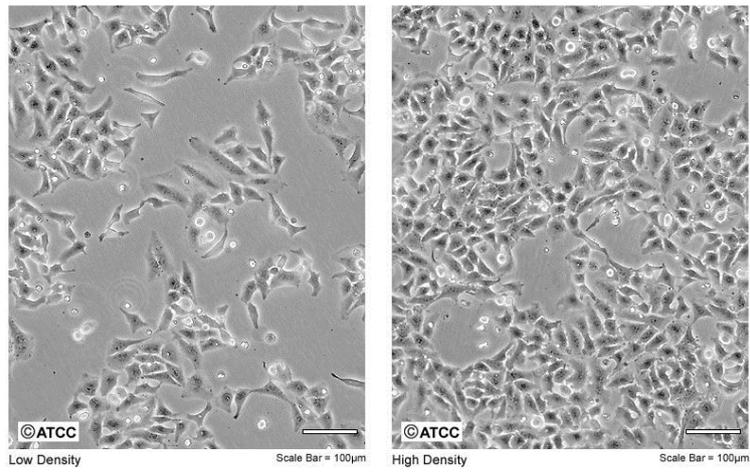


Abbildung 5 HeLa Zellen bei niedriger Zelldichte (links) und bei hoher Zelldichte (rechts) (ATCC Collection, 2014) [43]

1.5 Zellviabilitätstest (MTT – Test)

Um eine Einschätzung darüber abgeben zu können, ob die getesteten Substanzen eine zytotoxische Wirkung haben und um die Zellzahl abschätzen zu können, wird ein Zellviabilitätstest durchgeführt. Für die Durchführung wird das Tetrazoliumsalz MTT, 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazoliumbromid, verwendet. Es wird nur in aktive Mitochondrien, also von lebenden Zellen, aufgenommen, wobei das zu Anfang schwach gelbe Salz zum dunkelblauen Formazan umgesetzt wird. Über diese Farbreaktion lässt sich ein quantitativer Rückschluss auf die Menge der lebenden Zellen ziehen, indem eine photometrische Vermessung durchgeführt wird [44].

1.6 Enzyme-linked Immunosorbent Assay (ELISA)

Der in dieser Diplomarbeit verwendete ELISA ist ein sogenannter Sandwich ELISA.

Hierfür wird die Platte mit einem spezifischen Antikörper beschichtet, dessen Antigen quantifiziert werden soll. So ist es möglich den Test auf ein bestimmtes Antigen durchzuführen, ohne dass das Probengemisch vorher aufgetrennt werden muss. Im ersten Schritt bindet der Analyt (in diesem Fall die Zytokine) spezifisch an den für ihn vorgesehenen Antikörper. Im nächsten Schritt werden nicht gebundene Proteine abgewaschen und ein zweiter spezifischer Antikörper wird zum Reaktionsgemisch zugegeben. Dies ist der Detektionsantikörper, der für das Zytokin spezifisch ist und hieran bindet [45]. Im nächsten Schritt bindet das mit einer Meerrettichperoxidase (Horseradishperoxidase, HRP) verbundene Avidin an das Biotin des Detektionsantikörpers. Im letzten Schritt wird durch das HRP eine Farbreaktion katalysiert [46, 47]. Die Intensität der entstehenden Farbe kann photometrisch vermessen werden. Zur Durchführung des ELISAs siehe Kapitel 2.4.

2 Material und Methoden

2.1 Extraktion

Der Extrakt wurde als Mazerat des zerkleinerten *Caesalpinia sappan* Holzes mit Ethanol 100 % (Merck, Deutschland) hergestellt. Die Konzentration des Mazeratansatzes lag bei 100 g/l. Das Kernholz von *Caesalpinia sappan* wurde in der Chiang Mai Provinz in Thailand gesammelt und durch einen Vergleich mit dem Musterbeleg (No. 87-1631) in der Herbarien Fachgruppe der Pharmazie der Chiang Mai Universität identifiziert. Als Kurzbezeichnung des *Caesalpinia sappan* Extrakts wird in der weiteren Arbeit CSE verwendet.

Das Sappanholz wurde mit der entsprechenden Menge Ethanol versetzt und unter stetigem Durchmischen mittels eines Magnetrührstäbchens für 24 Stunden bei Raumtemperatur mazeriert. Um ein zu starkes Verdunsten des Ethanols zu verhindern, wurde das Gefäß abgedeckt.

Nach Ablauf von 24 Stunden wurde der Extrakt in einen tarierten Kolben filtriert und am Rotavapor zur Trockene eingedampft. Für die Durchführung der Versuche wurde die benötigte Menge des so gewonnenen Extrakts mit Lösungsmittel versetzt und unter Einsatz des Vortex in Lösung gebracht.

2.2 Hochleistungsflüssigchromatographie (HPLC)

Zur Analyse und Auftrennung des Sappanholzextrakts kam eine Reversed Phase HPLC zur Anwendung.

2.2.1 Analytische HPLC

Die analytische HPLC setzt sich aus folgenden Komponenten zusammen (Tabelle 1):

System	UltiMate 3000 RS (Thermo Scientific)
Stationäre Phase	Kinetex™ C - 18, 5 µm Partikelgröße, 100 Å, 150 x 4,6 mm (Phenomenex)
Mobile Phase	Eluent A: 0,1 % Trifluoressigsäure (TFA, Reagent Plus, Sigma Aldrich) 5 % Acetonitril (Chem-Lab NV) Wasser (HPLC Reinheit) Eluent B: 0,1 % Trifluoressigsäure (TFA, Reagent Plus, Sigma Aldrich) Acetonitril (Chem-Lab NV)
Säulentemperatur	40 °C
Detektionswellenlänge	280 nm
Flussrate	0,5 ml/min
Injektionsvolumen	20 µl

Tabelle 1 Komponenten und Bedingungen der analytischen HPLC

2.2.1.1 Analytische HPLC von *Caesalpinia sappan*

Zur Herstellung der Untersuchungslösung wurde so viel Extrakt gelöst, dass sich eine Konzentration von 1 mg/ml ergab. Um die Auflösung zu beschleunigen wurden ein Vortex bzw. das Ultraschallbad zu Hilfe genommen. Vor der Injektion in die HPLC wurde die so gewonnene Lösung zentrifugiert, um eine größtmögliche Partikelfreiheit zu gewährleisten.

2.2.1.2 Gradientenoptimierung

Die vorangegangenen Arbeiten zeigten eine entzündungshemmende Aktivität der apolareren Gesamtfraktion von *Caesalpinia sappan*. Um die Aktivität der isolierten Komponenten eingehender untersuchen zu können, wurde im Rahmen dieser Arbeit zunächst eine Optimierung des HPLC Gradienten für den apolaren Bereich durchgeführt.

Die Optimierung erfolgte auf Grundlage des bereits verwendeten Gradienten für die Analyse der polarerer Komponenten von *Caesalpinia sappan*. Insgesamt waren 12 Optimierungsschritte nötig, um eine ausreichend gute Trennung der apolareren Komponenten zu ermöglichen.

Der bisher für die polarerer Komponenten verwendete Gradient ist in Tabelle 2 abgebildet. Bei dem hier verwendeten Laufmittel (LM) handelt es sich um eine Eluentenmischung aus einem polaren Eluenten (A) und einem apolaren Eluenten (B). Die Zusammensetzung der Eluenten A und B ist in Kapitel 2.2.1 dargelegt. Der in Tabelle 2 angegebene Verlauf zeigt die Konzentrationsveränderung des apolaren Eluenten, angegeben in Prozent, in Abhängigkeit von der Zeit.

Gradient (polarere Komponenten)	Verlauf (% Anteil Laufmittel B in Abhängigkeit von der Zeit)
	0 % B (0 min), 17,5 % B (30 min), 100 % B (50 min), 0 % B (52 min), 0 % B (54 min)

Tabelle 2 Ausgangsgradient – Gradient der polarerer Komponenten angegeben als Konzentrationsverlauf

Der Ausgangsgradient hat zu Anfang einen sehr flachen Verlauf, da hierbei der Anteil des apolaren Laufmittels B bis zu Minute 30 langsam auf ein Anteil von 17,5 % steigt. Danach erfolgt innerhalb von 20 Minuten ein Anstieg auf 100 % der Komponente B. Danach fällt der Anteil des apolaren Eluenten innerhalb von zwei Minuten auf 0 %, um die Säule für die nächste Probe zu äquilibrieren.

In Tabelle 3 ist der für den apolaren Bereich des *Caesalpinia sappan* Gesamtextrakts optimierte Gradient gezeigt. Dieser ist zeitlich gesehen verkürzt und besonders der Anteil des apolaren Laufmittels ist deutlich schneller erhöht worden.

Gradient (apolarere Komponenten)	Verlauf (% Anteil Laufmittel B in Abhängigkeit von der Zeit)
	0 % B (0 min), 17,5 % B (5 min), 20 % B (10 min), 30 % B (20 min), 35 % B (25 min), 100 % B (26 min), 0 % B (28 min), 0 % B (31 min)

Tabelle 3 Optimierter Gradient – Gradient der apolareren Komponenten angegeben als Konzentrationsverlauf

Der für den apolaren Bereich optimierte Gradient zeigt einen innerhalb von fünf Minuten und damit raschen Anstieg von Eluent B auf 17,5 %. Die Steigerung auf 35 % Anteil B verläuft ab diesem Zeitpunkt langsamer, 35 % B sind nach 25 Minuten erreicht. Durch den langsamen Anstieg der apolaren Komponente ist eine Auftrennung der apolareren Komponenten möglich. Im Anschluss, an die langsame Steigerung, steigt der Anteil von B innerhalb von einer Minute auf 100 %, um alle zurückgebliebenen apolaren Rückstände von der Säule zu entfernen.

In Abbildung 6 ist der Verlauf der Gradienten vor und nach der Optimierung schematisch gegenübergestellt.

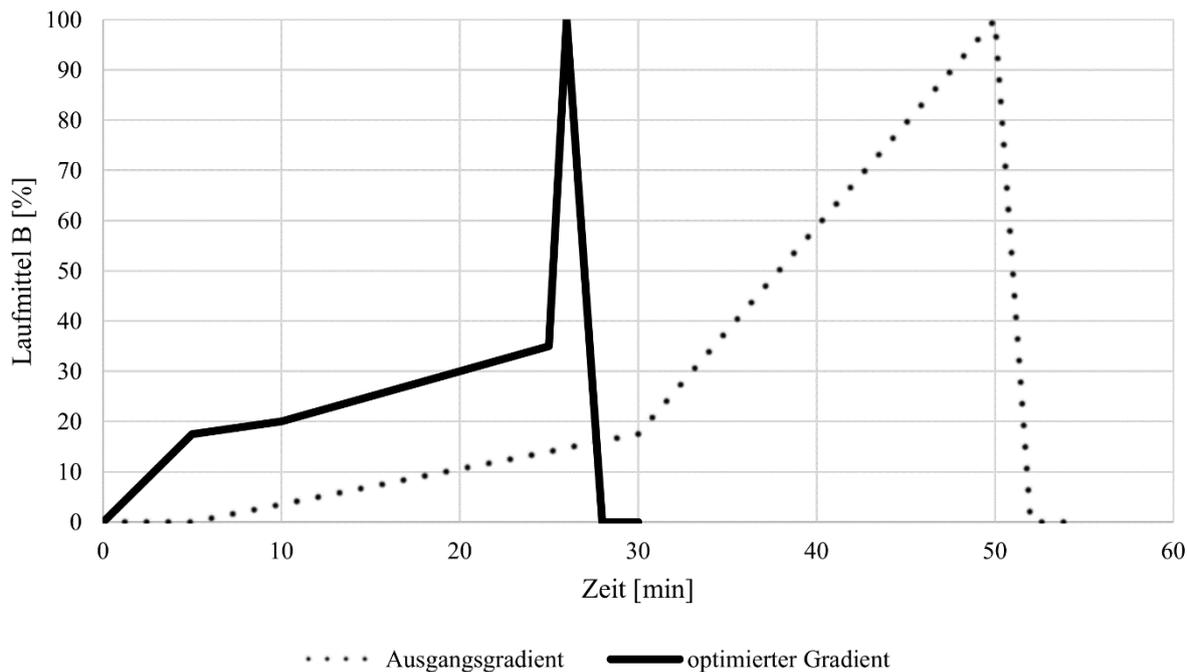


Abbildung 6 Schematische Darstellung der HPLC-Gradienten vor und nach der Optimierung

2.2.2 Präparative HPLC

Für die präparative Auftrennung des Extrakts wurde für die Gewinnung der Fraktionen folgendes System verwendet (Tabelle 4):

System	UltiMate 3000
Stationäre Phase	Hypersil GOLD™, 5 µm Partikelgröße, 250 x 21,2 mm (Thermo Scientific)
Mobile Phase	Eluent A: 0,1 % TFA, 5 % Acetonitril, Wasser Eluent B: 0,1 % TFA, Acetonitril
Säulentemperatur	Raumtemperatur
Detektionswellenlänge	280 nm
Flussrate	20 ml/min
Injektionsvolumina	250 µl bis 1500 µl

Tabelle 4 Komponenten und Bedingungen der präparativen HPLC

2.2.2.1 Präparative HPLC von *Caesalpinia sappan*

Zur Herstellung des aufzutrennenden Extrakts wurde der getrocknete Rückstand im entsprechenden Lösungsmittel (vgl. 2.2.2.2) durch Vortexen gelöst und durch einen Spritzenvorsatz filtriert, um Kleinstpartikel abzutrennen. Die Endkonzentration des gelösten Trockenextrakts von *Caesalpinia sappan* waren 100 mg/ml oder 200 mg/ml.

Da die präparative Säule einen größeren Durchmesser als die analytische aufweist, muss der optimierte Gradient an diese Bedürfnisse angepasst werden. Es wird einerseits eine höhere Durchflussrate benötigt, andererseits muss der Bereich des 100 % Anteils des Eluenten B verlängert werden, da sonst die Gefahr besteht, dass Reste des Extrakts auf der Säule zurückbleiben. Der für die präparative HPLC verwendete Gradient ist in Tabelle 5 dargelegt und in Abbildung 7 schematisch abgebildet.

Gradient (apolarere Komponenten)	Verlauf (% Anteil Laufmittel B in Abhängigkeit von der Zeit)
	0,5 % B (0 min), 17,5 % B (5 min), 20 % B (10 min), 30 % B (20 min), 35 % B (25 min), 100 % B (26 min), 100% (30 min), 0,5 % B (31 min), 0,5 % (37 min)

Tabelle 5 Gradient der präparativen HPLC für die apolareren Komponenten, angegeben als Konzentrationsverlauf

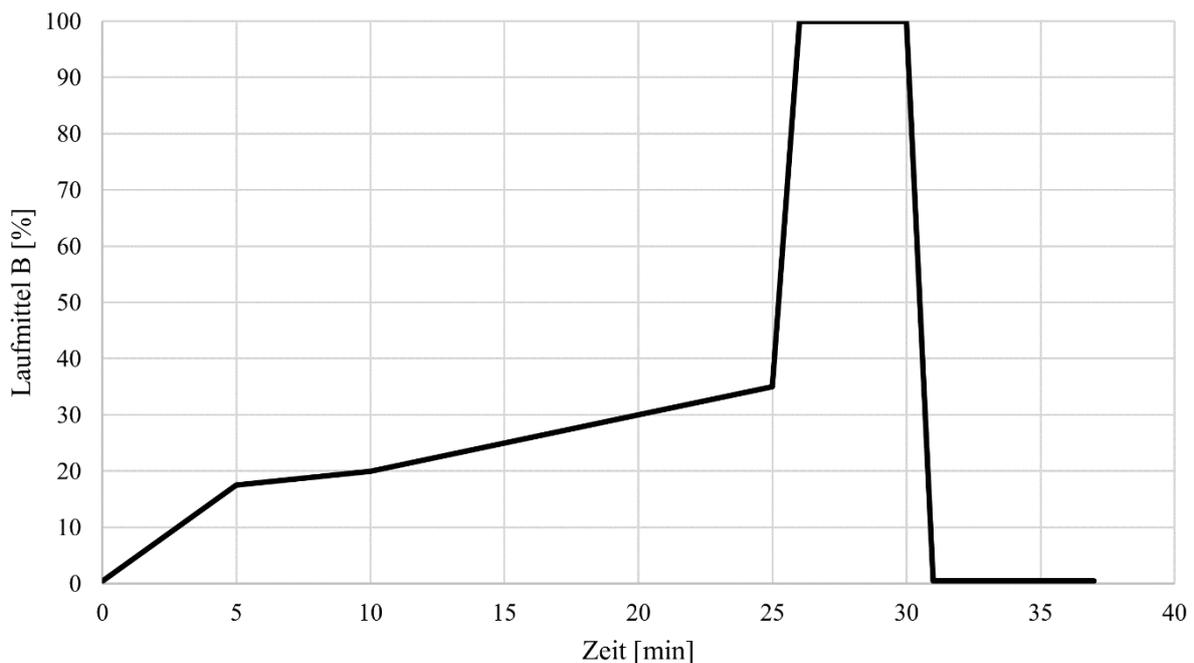


Abbildung 7 Schematische Darstellung des Gradienten für die Auftrennung mittels präparativer HPLC

Sobald eine Substanz mit Hilfe des Dioden Array Detektors erkannt wird, in dem das vom Detektor ausgesandte Licht absorbiert wird, wird auf dem angeschlossenen Computermonitor ein Peak sichtbar. Bei Auftreten eines Peaks wurde das in diesem Moment aus der Säule ausfließende Gemisch aus Laufmittel und Probe, jeweils getrennt voneinander, in Eprövetten gesammelt. Die Aufarbeitung der so gewonnenen Fraktionen (F) wird in Kapitel 2.2.2.2 gezeigt.

2.2.2.2 Aufarbeitung der Fraktionen

Nach erfolgreicher Gewinnung der Einzelfraktionen mittels präparativer HPLC wurden diese zunächst am Rotavapor eingeengt, um den Anteil des nicht wässrigen Lösungsmittels zu verringern. Im nächsten Schritt wurden die eingeengten Fraktionen, nachdem die Eprövetten mit Parafilm abgedeckt wurden, bei -20 °C tiefgefroren.

Nach 24 – stündiger Lagerung im Gefrierschrank wurde der Parafilm mit kleinen Löchern versehen, damit die Flüssigkeit entweichen konnte. Die Eprövetten wurden in einen Kolben gegeben und an den Lyophilisator (Heto PowerDry LL3000) gehangen, um die Fraktionen zu lyophilisieren. Die lyophilisierten Fraktionen wurden gewogen und in Eppendorfgefäßen gelagert.

2.2.3 HPLC Methode zur Überprüfung der Reinheit

Die Untersuchung der Reinheit wurde mit Hilfe der analytischen HPLC und dem in 2.2.1.2 beschriebenen optimierten Gradienten durchgeführt. Dazu wurden die Fraktionen in DMSO (Sigma Aldrich) oder Acetonitril 25 % gelöst und in die HPLC mittels Autosampler (Ultimate 3000) injiziert.

Zur Bestimmung der Reinheit wurden die Einzelpeakflächen der jeweils auftretenden Fraktionen ins Verhältnis zur Gesamtpeakfläche gesetzt, wobei die Fläche aller Peaks als 100 % angenommen wurde. Je größer der Anteil der gewünschten Fraktion ist, desto reiner ist sie.

2.2.4 HPLC Methode zur Bestimmung der Stabilität der Fraktionen

Da sich die polareren Fraktionen von *Caesalpinia sappan* in vorausgegangenen Arbeiten als instabil erwiesen, wurden im Zuge dieser Arbeit Stabilitätsuntersuchungen durchgeführt.

Hierfür wurden zwei Ansätze untersucht. Erstens die Lagerung der Fraktionen in Lösung und zweitens die Lagerung im trockenen Zustand. Die Lagerung der Fraktionen in Lösung wurde in verschiedenen Lösungsmitteln durchgeführt. Eine Lösung wurde so hergestellt, dass das Lösungsmittel TFA enthält (vgl. Kapitel 2.2.4.1) und bei der zweiten Lösung wurde auf TFA im Lösungsmittel verzichtet (vgl. Kapitel 2.2.4.2). Es wurde untersucht, ob sich ein signifikanter Unterschied in der Stabilität feststellen lässt, wenn das Lösungsmittel TFA enthält oder nicht.

Um die Stabilität der apolareren Fraktionen in Lösung zu untersuchen, wurden zwei zu lagernde Vorräte der Lösung hergestellt, die im Abstand von sieben Tagen mittels HPLC vermessen wurden. Vor der Probennahme, für die wöchentliche Untersuchung, wurden die gelagerten Lösungen gevortext, um eine homogene Durchmischung zu gewährleisten. Der für die Messung verwendete Gradient war der in 2.2.1.2 beschriebene. Die Lagerung erfolgte unter Lichtausschluss.

Für die Untersuchung der trockenen Lagerung wurden die Fraktionen unter Lichtausschluss, getrennt voneinander gelagert und für jede Untersuchung frisch gelöst (vgl Kapitel 2.2.4.3).

Zur Bestimmung der Anteile der jeweiligen Fraktionen wurden die Einzelpeakflächen der auftretenden Substanzen ins Verhältnis zur Gesamtpeakfläche gesetzt, wobei die Fläche aller Peaks als 100 % angenommen wurde.

2.2.4.1 Stabilität der Fraktionen bei Lagerung in gelöstem Zustand (mit TFA)

Zur Herstellung des zu lagernden Vorrats wurde von der zu untersuchenden Fraktion die Menge eingewogen, gevortext und gelöst, so dass eine Endkonzentration von 1 mg/ml erreicht wurde. Das Lösungsmittel hierfür war 0,1 % TFA, 5 % Acetonitril und Wasser.

2.2.4.2 Stabilität der Fraktionen bei Lagerung in gelöstem Zustand (ohne TFA)

In diesem Teil der Untersuchung wurde ebenfalls eine Konzentration von 1 mg/ml erzielt. Das hierbei verwendete Lösungsmittel war 5 % Acetonitril und Wasser.

2.2.4.3 Stabilität der Fraktionen bei trockener Lagerung

Um eine Aussage darüber treffen zu können, ob sich die Auflösung der Fraktionen auf die Stabilität auswirkt, wurde jede Woche eine, ebenfalls unter Lichtausschluss gelagerte, Probe in der Lösungsmittelmischung 5 % Acetonitril, Wasser frisch gelöst und vermessen. Die verwendete Konzentration war 1 mg/ml.

2.3 Zellkultur

2.3.1 Verwendete Zelllinien

2.3.1.1 Kultivierung von RAW 264,7

Die Züchtung der Zellen wurde in Zellkulturflaschen bewerkstelligt. Das verwendete Medium war Dulbecco's Modifed Eagles Medium (DMEM, Gibco, USA). Für eine optimale Versorgung der Zellen waren verschiedene Zusätze erforderlich. Neben den bereits enthaltenen Inhaltsstoffen Glucose (4,5 g/L), Natriumpyruvat (0,11g/L) und Glutamin wurden dem Medium Fetales Kälber Serum (10 % v/v, FBS; Gibco, USA) und Glutamin (2 %, Gibco, USA) zugefügt. Um einen Bakterienbefall zu verhindern wurden Penicillin/Streptomycin (0,1 %, Gibco, USA) zugesetzt.

2.3.1.2 Kultivierung von Caco-2

Die Kultivierung der Kolorektalkarzinomzelllinie erfolgte ebenfalls in DMEM, das bereits im vorstehenden Abschnitt vorgestellt wurde. Eine morphologische Beschreibung erfolgte bereits in Kapitel 1.4.1.

2.3.1.3 Kultivierung von MCF-7

Die Mammakarzinomzelllinie wurde im angepassten DMEM kultiviert. Die morphologische Beschreibung ist in Kapitel 1.4.2 beschrieben.

2.3.1.4 Kultivierung von HeLa

Die Kultivierung der Zervixkarzinomzelllinie erfolgte auch hierbei im angepassten DMEM. Morphologisch wurden die Zellen in Kapitel 1.4.3 dargestellt.

2.3.2 Grundlegende Arbeitstechniken

Für ein optimales Wachstum der Zellen wurden sie bei 37 °C, 5 % CO₂ und 95 % Luftfeuchtigkeit inkubiert.

2.3.2.1 Wechsel des Mediums

Da dem Medium Phenolrot als Indikator zugesetzt wurde, konnte anhand des sinkenden pH Werts erkannt werden, dass die Nährstoffkonzentration abnahm und die Stoffwechselprodukte in der Zellkulturflasche überhandnahmen. Die Farbe des Mediums veränderte sich von einem intensiven Rot zu einem dunkleren Gelb. Dies zeigt einen benötigten Wechsel des Mediums an.

Mithilfe einer sterilen Pasteurpipette wurde das verbrauchte Medium abgesaugt und verworfen. Eventuell lose und abgestorbene Zellen, wurden im nächsten Schritt entfernt, indem die Zellen mit PBS (Phosphate Buffered Saline, pH 7,2, Gibco, USA) gewaschen wurden. Dazu wurden ungefähr 10 ml PBS in die Zellkulturflasche gegeben, die Flasche waagrecht vorsichtig geschwenkt und das PBS wieder abgesaugt. Der Medienwechsel wurde durch die Zugabe von 10 ml frischem Medium mittels Pipette vollendet.

2.3.2.2 Subkultivierung der Zellen

Wenn die Konfluenz der Zellen einen gewissen Prozentsatz erreicht hatte - dies wurde durch eine mikroskopische Betrachtung beurteilt - wurde die Subkultivierung der Zellen nötig. Es besteht sonst die Gefahr, dass der Toleranzwert der Populationsdichte erreicht wird und die Zellen absterben.

Zu diesem Zweck wurde das verbrauchte Medium mittels steriler Pasteurpipette abgesaugt. Wie bereits beim Wechsel des Mediums (vgl. 2.3.2.1) beschrieben, wurden die Zellen gewaschen. Bei der Subkultivierung ist dies ein besonders wichtiger Schritt, damit keine abgestorbenen Zellen in die neue Kulturflasche verschleppt werden. Als nächstes wurde 1 ml Trypsin – EDTA (0,25 %, Gibco, USA) in die Flasche gegeben und gleichmäßig durch leichtes Schwenken

verteilt. Für die Makrophagen genügte es, sie bei Raumtemperatur für einige Minuten zu inkubieren. Die Zervixkarzinomzell-, die Mammakarzinomzell- und Kolorektalkarzinomzelllinie benötigten für diesen Vorgang mehrere Minuten im Brutschrank, um eine genügende Ablösung zu erreichen.

Nach der jeweils erforderlichen Zeit wurden die Zellen durch leichtes Klopfen von der Wand gelöst. Nun wurden in die bereits genutzte Flasche 9 ml Medium gegeben, um wieder ein Gesamtvolumen von 10 ml zu erreichen. Um eine größtmögliche Durchmischung zu erreichen wurde die Lösung mehrfach mit der bereits verwendeten Pipette angesaugt und ausgelassen.

Je nach Zelllinie wurden unterschiedliche Verdünnungsstufen verwendet. Die Makrophagen und die Zervixkarzinomzellen wurden 1:100 verdünnt; dazu wurden einige Tropfen der frisch hergestellten Zellsuspension in eine mit 10 ml frischem Medium gefüllte Zellkulturflasche gegeben. Die Kolorektalkarzinom- und die Mammakarzinomzelllinien wurden jeweils 1:20 verdünnt, was bedeutet, dass 9,5 ml Medium in der neuen Kulturflasche mit 0,5 ml der Zellsuspension versetzt wurden.

2.3.3 Untersuchung der antiinflammatorischen Wirkung mithilfe von Makrophagen

Um die entzündungshemmende Wirkung zu testen wurde ein Versuch mit der Makrophagenzelllinie durchgeführt.

Zu diesem Zweck wurde unter dem Mikroskop mithilfe einer Neubauer Zählkammer die Zellzahl der Zellsuspension in der Kulturflasche bestimmt. Die zu erreichende Zielkonzentration für den Versuch war $2 \cdot 10^6$ Zellen pro Well. Damit diese Konzentration erreicht werden konnte, wurde die Zellsuspension entsprechend mit Medium DMEM verdünnt. Die hergestellte Menge wurde gleichmäßig auf die einzelnen Wells aufgeteilt.

Nach Inkubation der Platte für 24 Stunden im Brutschrank wurde die Konfluenz der Zellen unter dem Mikroskop untersucht. Diese soll bei mindestens 40 % liegen. Im nächsten Schritt wurde die Probe in der zu untersuchenden Konzentration zugegeben. Lediglich dem Well, das zur Kontrolle diente, wurde DMSO zugesetzt, um zu untersuchen, ob dies allein schon einen Effekt hat. Für weitere drei Stunden wurde die Platte im Inkubator gelagert. Zur Stimulation der Interleukin Ausschüttung wurde den Zellen Lipopolysaccharid (LPS aus *Escherichia coli* 0111:B4, Sigma Aldrich) in der Konzentration 1 µg/ml zugesetzt. Um die Möglichkeit einer

ausreichenden Wirkung des LPS zu erzielen, wurde die Platte für weitere 24 Stunden inkubiert [48]. Nach neuerlicher Konfluenzüberprüfung unter dem Mikroskop, hierbei sollte die Zelldichte ungefähr 100 % betragen, wurde der Überstand in Eppendorfgefäße überführt und im Tiefkühler bei – 20 °C bis zur Durchführung des ELISAs gelagert.

2.3.4 Durchführung des Zellviabilitätstest (MTT – Test)

Der MTT – Test ist ein Zellviabilitätstest, mit dem die Anzahl an lebenden Zellen im untersuchten Medium bestimmt wird. Hierfür wird Tetrazoliumsalz MTT, 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazoliumbromid, verwendet. Das zu Anfang gelbe Salz wird durch die lebenden Mitochondrien zu einem dunkelblauen Salz (Formazan) umgesetzt. Über diese quantitativ vermessbare Farbreaktion sind Rückschlüsse auf die Anzahl der lebenden Zellen möglich, sobald es einen Referenzwert gibt [44].

Für die Versuche wurde eine Lösung von Tetrazoliumsalz in einer Konzentration von 5 mg/ml hergestellt.

Der der Wellplatte entnommene Überstand wurde für den ELISA verwendet. Nun wurde in jedes Well MTT Stammlösung (5 mg/ml) pipettiert und die Platte bei 37 °C für zwei Stunden im Brutschrank inkubiert. Im nächsten Schritt wurde die Lösung vollständig abgesaugt und der Lysis Puffer zugesetzt. Der Lysis Puffer ist aus 10 % Natrium Dodecylsulfat (SDS, Merck, Deutschland) gelöst in 0,01 – molarer Salzsäure zusammengesetzt. Die vorsichtige Bewegung der Platte sorgte für eine gleichmäßige Benetzung der Zellen mit Lysis Puffer und sorgte damit für eine beschleunigte Ablösung vom Untergrund. Die so entstandene Suspension an lysierten Zellen wurde im letzten Arbeitsschritt bei 570 nm Absorptions- und 690 nm Referenzwellenlänge mithilfe des Microtiterlesegeräts (Infinite M 200, Tecan Schweiz) vermessen.

Zur Auswertung der Messergebnisse wird jeweils die Differenz der beiden gemessenen Wellenlängen ermittelt. Jeder so gewonnene Messwert wird auf den Mittelwert der Messwerte der Kontrollen bezogen, wobei dieser als 100 % festgelegt wird.

Der Vergleich der lebenden Zellen (angegeben in %) lässt einen Rückschluss auf eine eventuelle zytotoxische Aktivität der Testsubstanz zu.

2.3.5 Optimierung der Zellzahl

Um eine optimale Zellzahl für die Untersuchung an Krebszellen zu finden, wurden verschiedene Konzentrationen der einzelnen Krebszelllinien in eine 96 Wellplatte aufgebracht und inkubiert. Mit Hilfe von Brazilin in der Konzentration 100 µg/ml, bei der bekannt ist, dass es in dieser Konzentration zytotoxisch wirkt, wurde die Zellviabilität mittels MTT – Test (vgl. 2.3.4) überprüft.

Wie in 2.3.3 beschrieben wurden die Zellen ausgezählt und mit Medium auf die gewünschte Konzentration verdünnt. Getestet wurden die Konzentration $2 \cdot 10^6$, $5 \cdot 10^6$, und $1 \cdot 10^7$ Zellen pro Well.

Da es sich um eine erste experimentelle Annäherung handelte, wurden verschiedene Inkubationszeiträume mit und ohne Probe untersucht:

1. Die Zellen wurden eingesät und für 24 Stunden inkubiert. Anschließend wurde die Probe zugefügt und die Wellplatte für weitere 24 Stunden inkubiert.
2. Die Zellen wurden für 24 Stunden inkubiert, die Proben hinzugefügt und die Platte für weitere 48 Stunden inkubiert.
3. Die Zellen wurden für 48 Stunden inkubiert, die Proben hinzugefügt und die Platte für weitere 24 Stunden inkubiert.
4. Die Zellen und die nach 24 Stunden hinzugefügten Proben wurden für weitere 24 Stunden inkubiert.

Die Versuche 1 bis 3 wurden jeweils in einer 96 Wellplatte durchgeführt, der vierte Versuch in einer 24 Wellplatte.

2.4 Enzyme-linked Immunosorbent Assay (ELISA)

Mittels ELISA kann die Menge des ausgeschütteten Interleukin-6 quantifiziert werden, da am Ende der Durchführung eine Farbreaktion abläuft, die photometrisch vermessen werden kann.

Das verwendete Set ist das ELISA „Ready-Set-Go!“ von der Firma eBioscience (Affymetrix Company, USA). Die für den ELISA verwendeten Lösungen und die Durchführung erfolgten nach den Angaben des Herstellers.

Im ersten Schritt wurde eine 96 Wellplatte mit dem Beschichtungsantikörper (capture antibody) beschichtet. Dazu wurden nach den Herstellerangaben der erste Antikörper und der Beschichtungspuffer so gemischt, dass 100 µl im richtigen Verhältnis in jedes Well gegeben werden konnten. Über Nacht wurde die Platte bei 4 °C im Kühlschrank gelagert.

Am nächsten Morgen wurde der Überstand vorsichtig abgesaugt. Danach wurde die Platte dreimal mit 200 µl Waschlösung, bestehend aus 0,05 % Tween 20 (Merck, Deutschland) in PBS gelöst, gewaschen, indem die zugegebene Lösung jeweils eine Minute einwirken gelassen wurde und dann entsorgt wurde. Nach dem dritten Waschschrift wurde die Platte trockengeklopft. Dies erfolgte durch kurze vorsichtige Schläge der Platte auf eine aufsaugende Unterlage. Im Folgenden wird dieser Schritt nur noch als Waschschrift bezeichnet.

Mit 200 µl Verdünnungslösung des Sets für jedes Well, die für 1 Stunde bei Raumtemperatur reagieren konnten, wurden ungewünschte Reaktionen abgeblockt, die während des ELISAs auftreten könnten. Im Anschluss erfolgte ein Waschschrift.

Nach dem Trockenklopfen wurde in jedes Well 100 µl Probelösung pipettiert. Die Probelösung wurde vorher aus dem, dem Versuch entnommenen, Überstand gewonnen. Der Überstand wurde zuvor 1:100 mit 1xPBS verdünnt. Die Platte wurde für 2 Stunden bei Raumtemperatur inkubiert.

Hieran schloss sich ein erneuter Waschschrift an. Nach erfolgter Trocknung wurde der Detektionsantikörper, an den Biotin gebunden ist, für eine Stunde bei Raumtemperatur zugesetzt. Anschließend wurde ein weiterer Waschschrift durchgeführt.

Im nächsten Schritt wurde das Reporterenzym Avidin HRP, (Horseradish peroxidase, Meerrettichperoxidase) dem Untersuchungswell zugesetzt. Avidin bindet in den folgenden 30 Minuten bei Raumtemperatur mit hoher Affinität an Biotin.

Erneut wird die überschüssige Untersuchungslösung abgewaschen. Es wurden nun 100 µl Substratlösung, diese enthält Tetramethylbenzidin (TMB), hinzugefügt. Die Meerrettichperoxidase, die an das Avidin gebunden ist, bewirkt nun, dass die hinzugefügte Substratlösung sich farblich verändert. Je mehr Avidin HRP und somit Zytokin gebunden ist, desto mehr Substratlösung kann umgesetzt werden, desto intensiver ist die Farbe. Die farbliche Umsetzung erfolgt innerhalb von 15 bis maximal 30 Minuten.

Um die Reaktion zu beenden wurden 50 µl Stopplösung zugegeben. Diese enthält einmolare Phosphorsäure. Für die Auswertung wurde die Platte photometrisch bei 450 nm und 570 nm

vermessen. Wobei die erste Wellenlänge die Messwellenlänge und die zweite die Referenzwellenlänge darstellt.

Zur Auswertung wird die Differenz der beiden Wellenlängen gebildet. Der Mittelwert der Messwerte der positiven Kontrolle, der nur LPS zugegeben wurde, wurde dabei als 100 % definiert. Alle weiteren Messwerte wurden auf den Mittelwert der Kontrolle bezogen und konnten so in ein prozentuelles Verhältnis überführt werden.

Im letzten Auswertungsschritt wurde die zuvor im MTT – Test ermittelte Zelldichte ebenfalls berücksichtigt, um Schwankungen der Zelldichte bzw. eine eventuelle Zytotoxizität miteinbeziehen zu können. Hierfür wurde der, mithilfe der Absorption, berechnete Prozentwert der entzündungshemmenden Wirkung durch den Prozentwert der Zellanzahl berechnet.

3 Ergebnisse und Diskussion

3.1 Auftrennung von *Caesalpinia sappan* Extrakt mittels präparativer HPLC

Nach erfolgreicher Gradientenoptimierung in der analytischen HPLC wurde der erhaltene Gradient auf die präparative HPLC übertragen (vgl. 2.2.2.1). Es erfolgte die Auftrennung des Extrakts mittels der präparativen HPLC, bei der die Einzelfractionen gewonnen wurden. Die Einzelfractionen sind in der folgenden Abbildung im Chromatogramm eingezeichnet:

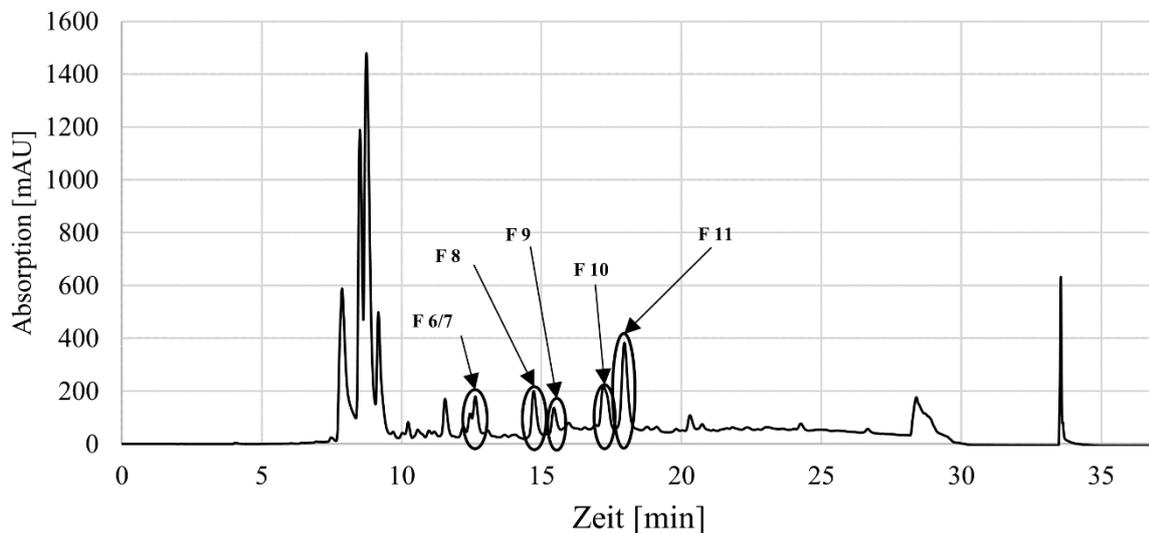


Abbildung 8 Chromatogramm der präparativen Auftrennung des *C.sappan* Extrakts (100 mg/ml gelöst in 25 % Acetonitril, Injektionsvolumen 1000 μ l, Trennung erfolgte ohne TFA)

Zu Anfang wurde der hergestellte Extrakt, wie in Kap 2.1 beschrieben, in 50 % Ethanol gelöst und mittels präparativer HPLC aufgetrennt. Im weiteren Verlauf der Diplomarbeit stellte sich heraus, dass durch Einsatz einer mit 25 % AcCN hergestellten Lösung bessere Ergebnisse bezüglich Ausbeute und Trennbarkeit erzielt werden können.

Die folgenden zwei Abbildungen zeigen die Chromatogramme der Trennungsvorgänge unter Verwendung der Extrakte, die in EtOH 50 % (Abbildung 9) und in AcCN 25 % gelöst wurden (Abbildung 10). In beiden Fällen handelt es sich um die Konzentration von 100 mg/ml.

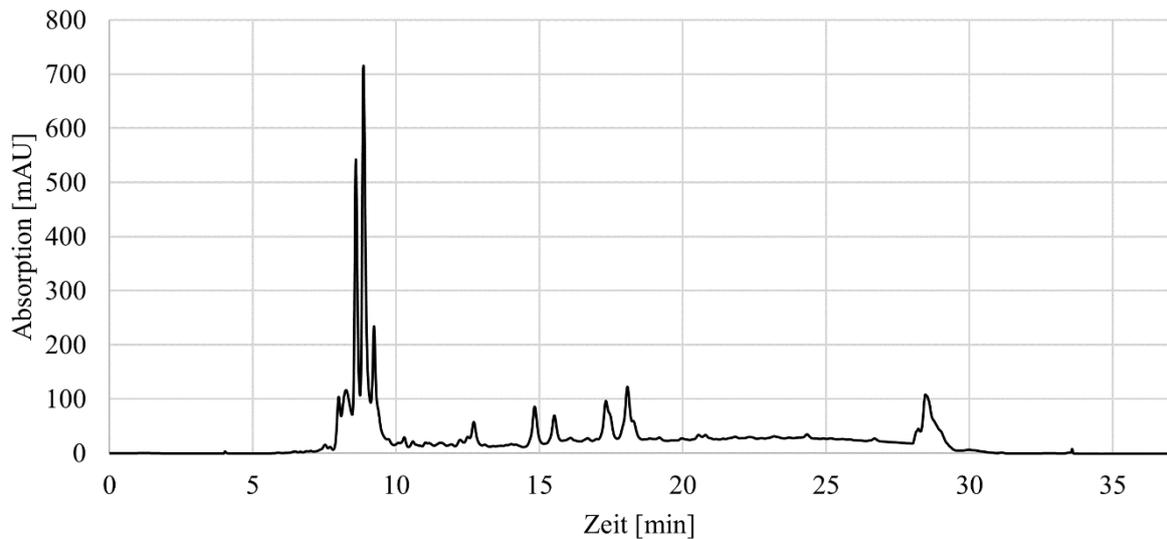


Abbildung 9 Chromatogramm der präparativen Auftrennung des *C.sappan* Extrakts (100 mg/ml gelöst in 50% Ethanol, Injektionsvolumen 1000 μ l)

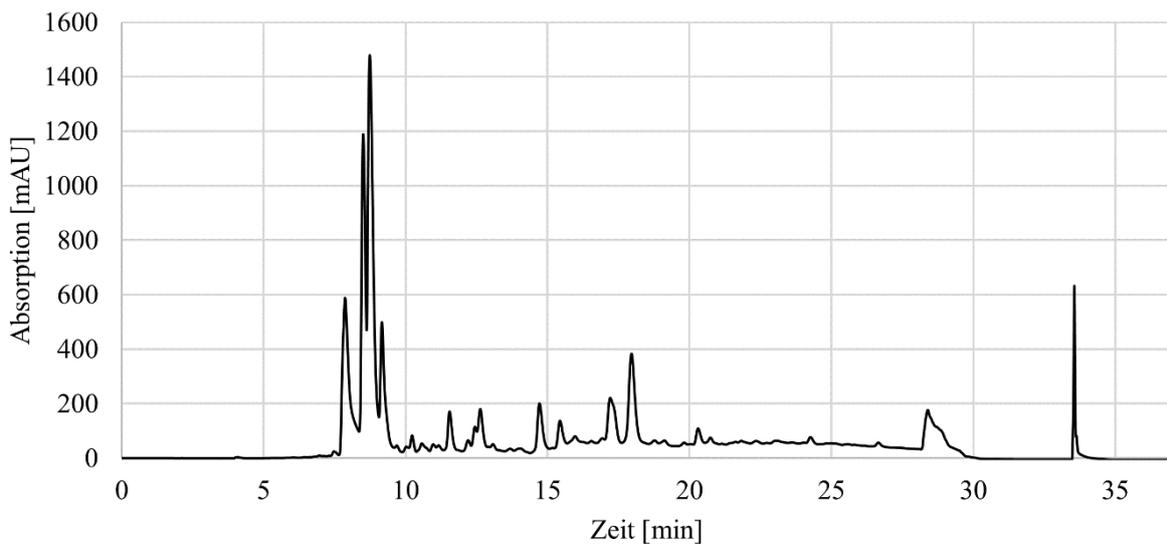


Abbildung 10 Chromatogramm der präparativen Auftrennung des *C.sappan* Extrakts (100 mg/ml gelöst in 25 % Acetonitril, Injektionsvolumen 1000 μ l, Trennung erfolgte ohne TFA)

Hierbei ist besonders der Unterschied in der Peakhöhe der einzelnen Peaks ersichtlich. In Abbildung 9 zeigt sich von den apolareren Komponenten F 11 als höchster Peak, es wird aber nur eine Absorption von ca 120 mAU erreicht. Im Chromatogramm in Abbildung 10 ist auch hier F 11 als höchster Peak zu erkennen, dieser hat eine Absorption von ca 400 mAU. Auch alle anderen Peaks sind deutlicher zu identifizieren. Durch diesen Umstand verbesserte sich die Auftrennbarkeit der Fraktionen, da die Peaks im Chromatogramm wesentlich leichter zu erkennen waren.

Systematisch wurden verschiedene Injektionsvolumina untersucht. Dabei konnte festgestellt werden, dass ein Volumen von 1500 μl (siehe Abbildung 11) zu einer Überladung der Säule führt, wodurch keine gute Auftrennung mehr möglich war.

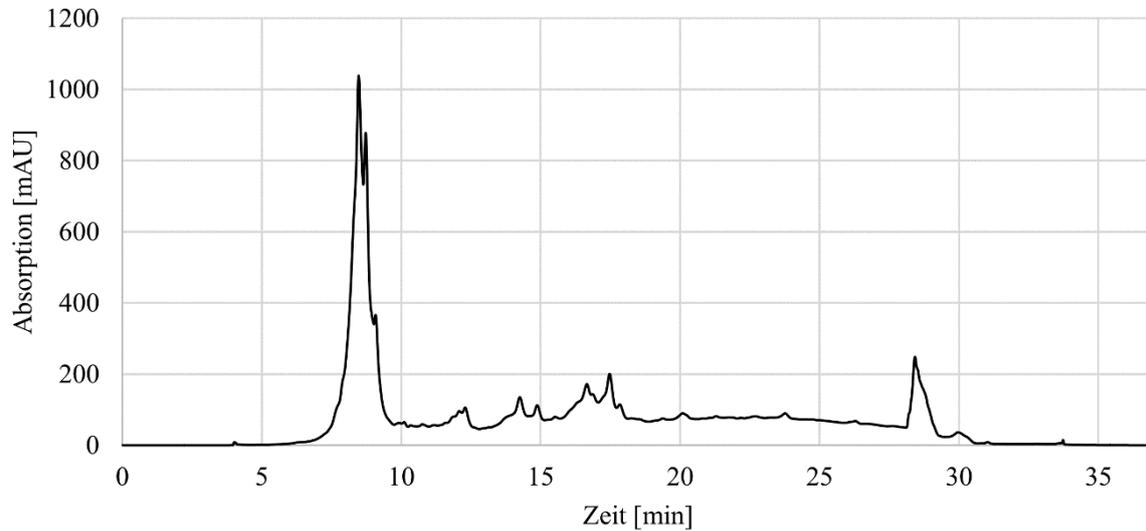


Abbildung 11 Chromatogramm der präparativen HPLC bei einem Injektionsvolumen von 1500 μl

Schlussendlich stellten sich ein Injektionsvolumen von 1000 μl mit einer Konzentration von 200 mg/ml gelöst in AcCN 25 % als ideale Mischung bei einer Flussrate von 20 ml/min heraus.

3.2 Reinheit der aufgetrennten Fraktionen von *Caesalpinia sappan*

Die in der Auftrennung gewonnenen Einzelfraktionen wurden auf ihre Reinheit untersucht. Hierfür wurden die Fraktionen in der Konzentration 1 mg/ml hergestellt und mittels analytischer HPLC und dem optimierten Gradienten (vgl. 2.2.1.2) vermessen.

Fraktion 6/7

Fraktion 6/7 ist kein Reinstoff, sondern eine Mischung zweier sehr schwer trennbarer Peaks. In der ersten Auftrennung gelang diese Trennung, daher die Doppelbezeichnung dieser Fraktion. In späteren Trennungen wurde diese Fraktion gemeinsam gesammelt, da die Ausbeute der Einzelpeaks äußerst gering war, ebenso deren Reinheit.

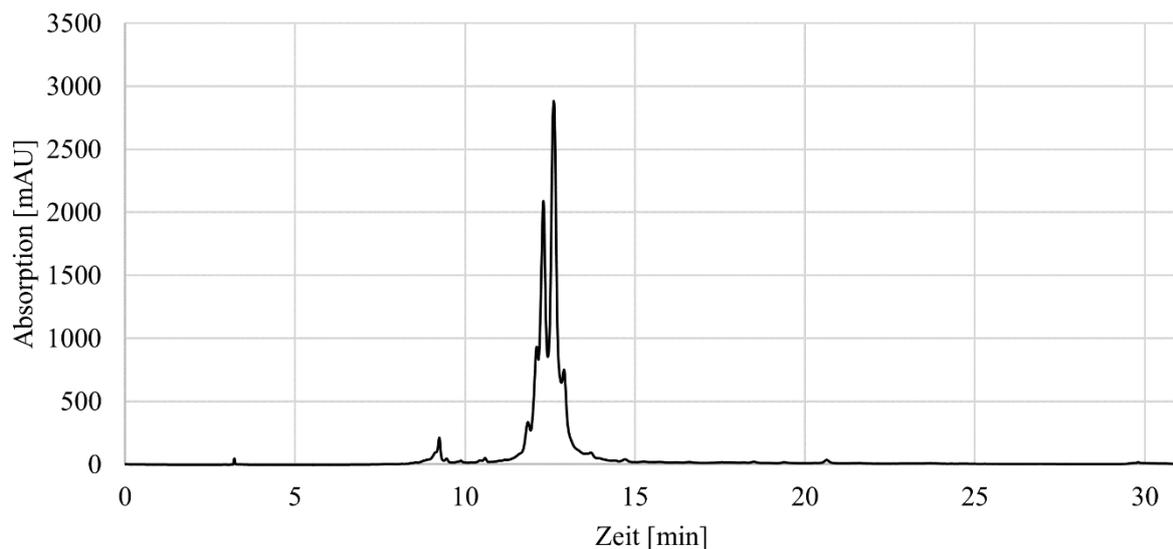


Abbildung 12 Chromatogramm (analytische HPLC) der Fraktion 6/7, 1 mg/ml

In Abbildung 12 ist das Chromatogramm für Fraktion 6/7, bei gemeinsamer Sammlung, abgebildet. Da hierbei nur Fraktion 6 (Retentionszeit 12,3 min) und 7 (Retentionszeit 12,6 min) ersichtlich sind, zeigt dieses Chromatogramm eine hohe Reinheit in Bezug auf weitere Fraktionen.

Fraktion 8

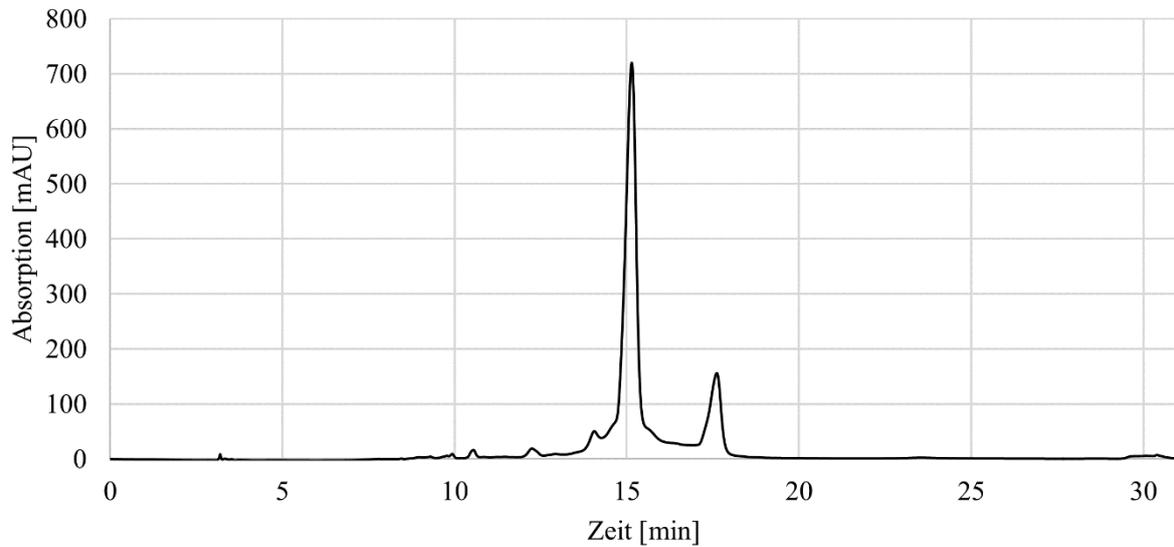


Abbildung 13 Chromatogramm (analytische HPLC) der Fraktion 8, 1 mg/ml

Der neben dem Hauptpeak F 8 (Retentionszeit 15,1 min, Anteil 78 %) entstandene Peak ist als Fraktion 10 (Retentionszeit 17,6 min, Anteil 22 %) identifiziert worden (siehe Abbildung 13). Um die Entstehung von F 10 zu verhindern, wurde der Einsatz eines im Bereich der polareren Komponenten erprobten Lösungsansatzes untersucht. Eine Trennung, bei der das Laufmittel kein TFA enthält, war dort häufig wirkungsvoll, um die Entstehung unerwünschter Fraktionen zu vermeiden. Die Bildung von Fraktion 10 konnte durch diesen Ansatz nicht verhindert werden. Alle Varianten wiesen einen bestimmten Anteil von Fraktion 10 auf, was den Schluss nahelegt, dass F 10 während der Trennung oder der Lyophilisation entsteht.

Fraktion 9

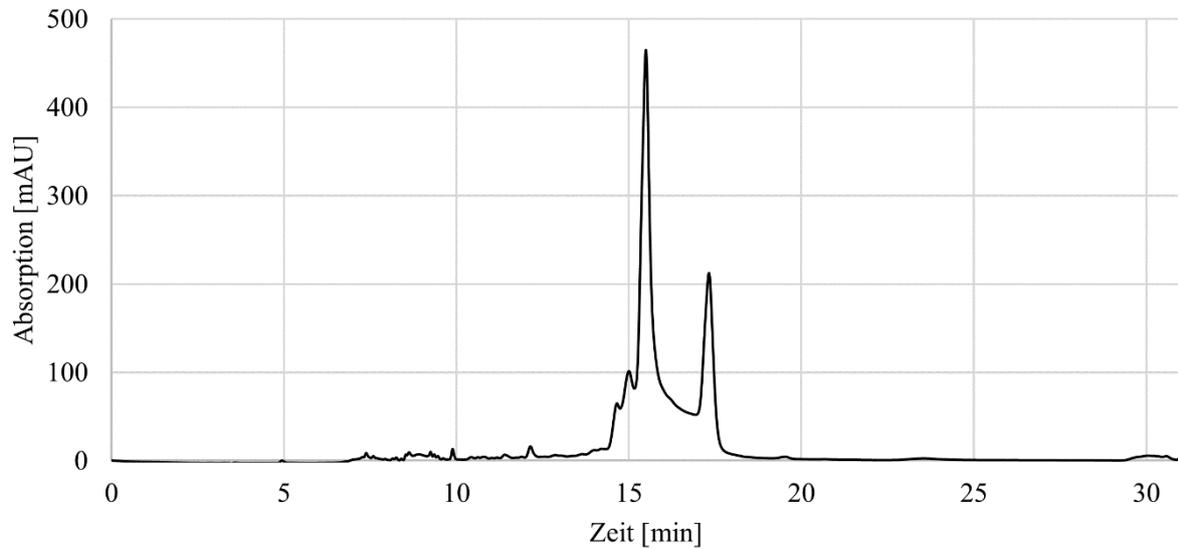


Abbildung 14 Chromatogramm (analytische HPLC) der Fraktion 9, 1 mg/ml

Für Fraktion 9 (Abbildung 14) stellte sich die Sachlage ähnlich dar. In jeder Untersuchung war neben Fraktion 9 als Hauptkomponente, ein gewisser Prozentsatz der Fraktionen 8 (Retentionszeit 15,1 min) und 10 (Retentionszeit 17,1 min) enthalten (Anteil F 9 – 55 %; F 8 – 8 %; F 10 – 28 %). Die für Fraktion 8 angesprochenen Lösungsansätze wurden hier ebenfalls untersucht, zeigten aber im Ergebnis keinen signifikanten Unterschied.

Fraktion 10

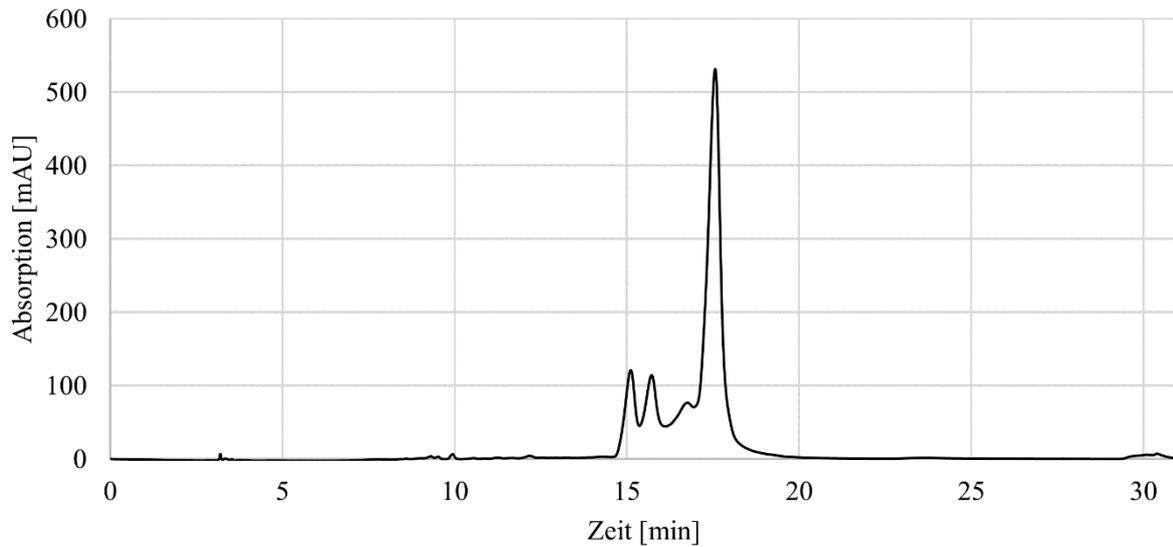


Abbildung 15 Chromatogramm (analytische HPLC) der Fraktion 10, 1 mg/ml

Wie bei den vorher genannten Fraktionen zeigte sich auch bei Fraktion 10, dass es sich um eine Mischung aus mehreren Komponenten handelt (siehe Abbildung 15). Dabei stellt Fraktion 10 die Hauptkomponente dar, mit geringen Anteilen von F 8 und F 9 (F 10 – 70 %, F 8 – 9 %, F 9 – 10 %). Ebenso wurden hier die bereits erwähnten Laufmittel zum Einsatz gebracht, um eine eventuelle Spontanumlagerung auszuschließen. Es zeigte sich auch hier kein Erfolg.

Fraktion 11

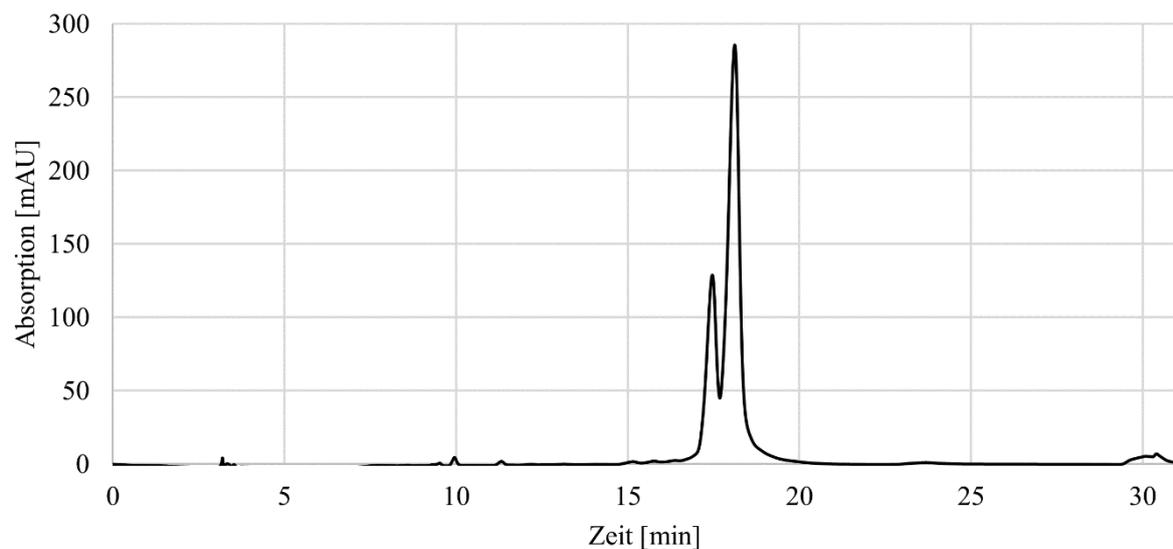


Abbildung 16 Chromatogramm (analytische HPLC) der Fraktion 11, 1 mg/ml

Abbildung 16 zeigt das Chromatogramm für Fraktion 11. Neben dem Hauptpeak Fraktion 11 (Retentionszeit 18,1 min, Anteil 65 %) ist ein Nebenpeak ersichtlich, der Fraktion 10 (Retentionszeit 17,4 min, Anteil von 27 %) zugeordnet werden kann. Die Methode zur Verhinderung der Entstehung des Nebenpeaks wurde in diesem Fall ohne ersichtlichen Erfolg durchgeführt. Somit ist die Gewinnung von Fraktion 11 nicht ohne einen bestimmten Anteil von Fraktion 10 möglich.

3.3 Antiinflammatorische Wirkung von *Caesalpinia sappan*

Die entzündungshemmende Wirkung des Sappanholzes wurde anhand der Lipopolysaccharid induzierten Interleukin-6 Ausschüttung bewertet. Hierfür wurden Makrophagen durch LPS zur Zytokinausschüttung angeregt. Die – durch die Fraktionen – gehemmte IL-6 Ausschüttung wurde mittels ELISA quantitativ vermessen.

Jede Fraktion wurde in DMSO gelöst und eine Endkonzentration von 100 µg/ml hergestellt. Fraktion 10 stellte sich für Makrophagen in geringem Maße zytotoxisch und F 11 als zytotoxisch heraus. Sie wurden daher auch in verminderter Konzentration getestet, da ansonsten eine Abtötung der zu untersuchenden Zellen erfolgt wäre und somit keine Bewertung der antiinflammatorischen Wirkung möglich gewesen wäre.

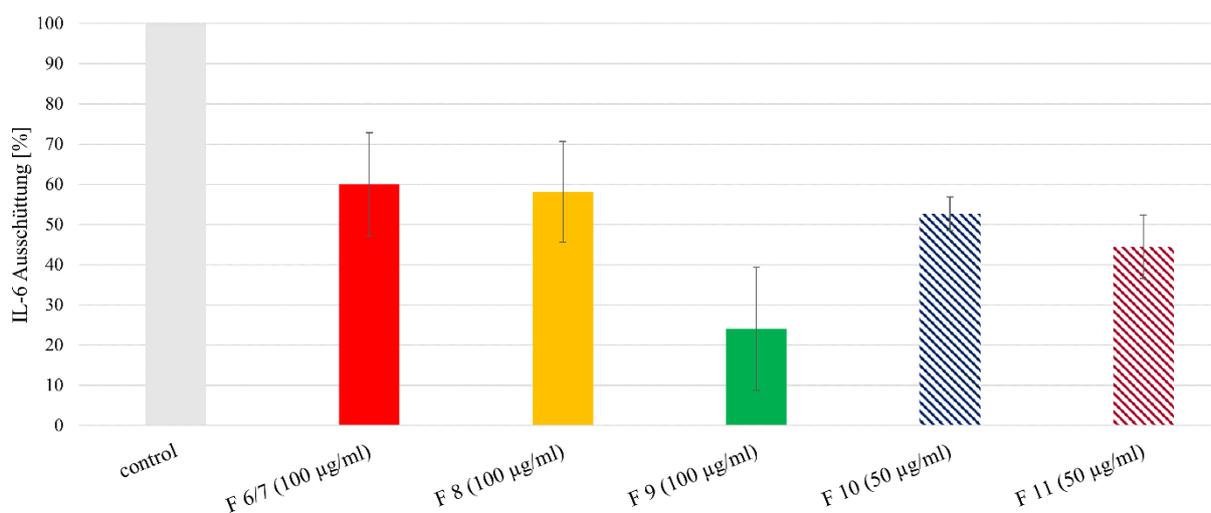


Abbildung 17 Vergleich der antiinflammatorischen Wirkung der Fraktionen 6 – 11

Abbildung 17 zeigt die antiinflammatorische Wirkung der einzelnen Fraktionen. Die Durchführung des Versuchs ist in Kapitel 2.3.3 beschrieben, die sich daran anschließende Quantifizierung der IL-6 Ausschüttung mittels ELISA ist in Kapitel 2.4 dargestellt.

Als Referenz zur Bewertung der Wirksamkeit der entzündungshemmenden Wirkung dient die Kontrolle. Dieser wird keine Probe zugesetzt, sondern es wird, wie auch bei den mit den Fraktionen versetzten Zellen, lediglich das LPS zur Stimulation der Interleukin Ausschüttung hinzugegeben. Dadurch kann der, während des ELISAs, gemessene Absorptionswert einer 100 % Interleukin-6 Ausschüttung gleichgesetzt werden. Die für die Proben gemessenen Absorptionswerte können, in Bezug auf die Kontrolle, prozentual ausgerechnet werden.

Ein Stoff ist als entzündungshemmend anzusehen, wenn die Interleukin-6 Ausschüttung um mindestens 25 % gesenkt wird. Alle Fraktionen zeigten eine Verminderung der Interleukin Ausschüttung um mindestens 40 % und sind somit als entzündungshemmend einzustufen.

F 6/7 und F 8 zeigten eine knapp 60 % IL-6 Ausschüttung, somit entspricht es einer Reduktion von ungefähr 40 %. Bei Fraktion 9 zeigt sich sogar nur noch eine Interleukin-6 Ausschüttung von 24 %, was eine Reduktion um dreiviertel des Referenzwerts bedeutet. Für die verringerte Konzentration von Fraktion 10, auf 50 µg/ml, zeigt sich eine Reduktion der Interleukin-6 Ausschüttung von 48 %. Die Intensität der Entzündungsreaktion ist somit auf die Hälfte reduziert worden. In der verringerten Konzentration wurde durch Fraktion 11 die Interleukin-6 Ausschüttung um 56 % gemindert.

Bei Versuchen mit lebenden Zellen liegt eine Standardabweichung im Bereich von bis zu 20 % im Normalmaß. Die Versuche weisen eine Standardabweichung in diesem Rahmen auf.

Die Standardabweichung ist durch schwankende Ergebnisse teilweise erhöht. Die Schwankung kommt möglicherweise dadurch zustande, dass die Fraktionen nicht vor jedem Versuch frisch aufgelöst worden sind, sondern in DMSO gelöst im Kühlschrank gelagert wurden. Daher ist es denkbar, dass eine Um- oder Zersetzung stattgefunden hat. Da die eingewogenen und zu pipettierenden Mengen sehr klein waren, stieg zudem der Einfluss methodischer Fehler, wie z.B. Wäge- bzw. Messfehler auf das Messergebnis.

3.4 Zytotoxizität der Fraktionen 10 und 11 von *Caesalpinia sappan* auf Krebszelllinien

Da sich während der Untersuchung der entzündungshemmenden Wirkung die Fraktionen 10 und 11 in der Konzentration 100 µg/ml als zytotoxisch herausstellten, wurden sie auf eine mögliche antikanzerogene Wirkung hin getestet.

Bei allen Versuchen ist 24 Stunden nach dem Einsäen eine Zelldichte von 40 - 80 % erwünscht, um nach der Probenzugabe ein aussagekräftiges Ergebnis zu erhalten. Nach weiteren 24 Stunden Inkubationszeit sollte die Konfluenz nahezu 100 % betragen. Bei der Optimierung der Zellzahl erwies sich eine Anfangskonfluenz von mindestens 40 % bei allen Krebszelllinien als zielführend.

Um diese Konfluenz zu erreichen waren für die HeLa Zellen eine Konzentration von $1 \cdot 10^6$ Zellen pro Well nötig, für Cacos und MCF-7 jeweils $2 \cdot 10^6$ Zellen pro Well. Nachdem verschiedene Inkubationszeiten, sowohl mit als auch ohne Probe untersucht wurden (vgl Kapitel 2.3.5), stellte sich hierbei heraus, dass die bewährte Methode der antiinflammatorischen Versuchsanordnung sich für die Krebszellen ebenso eignet. In Kapitel 2.3.5 ist diese Methode als erste Versuchsanordnung beschrieben.

Zuerst wurden die Zellen eingesät und für 24 Stunden inkubiert. Nach der ersten Konfluenzüberprüfung, wenn diese als ausreichend eingestuft wurde, wurden die Proben zugegeben und die 96 Wellplatte für weitere 24 Stunden inkubiert. Danach wurde die Zelldichte mittels MTT – Test bestimmt.

3.4.1 Zytotoxizität der Fraktionen 10 und 11 auf die Caco-2 Zelllinie

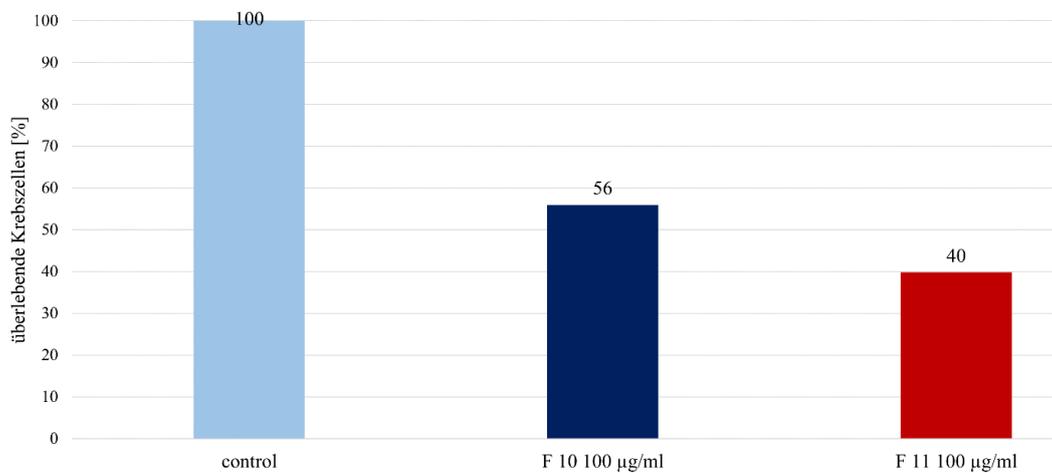


Abbildung 18 Überlebensrate der Caco-2 Zelllinie bei Behandlung mit F 10 und F 11

Sowohl Fraktion 10 als auch Fraktion 11 zeigten auf ein Kolorektalkarzinomzelllinie ein zytotoxisches Potential. F 10 tötet geringfügig weniger als die Hälfte der Zellen ab, beim Einsatz der Fraktion 11 überleben lediglich 40 % der Zellen (Abbildung 18).

3.4.2 Zytotoxizität der Fraktionen 10 und 11 auf die MCF-7 Zelllinie

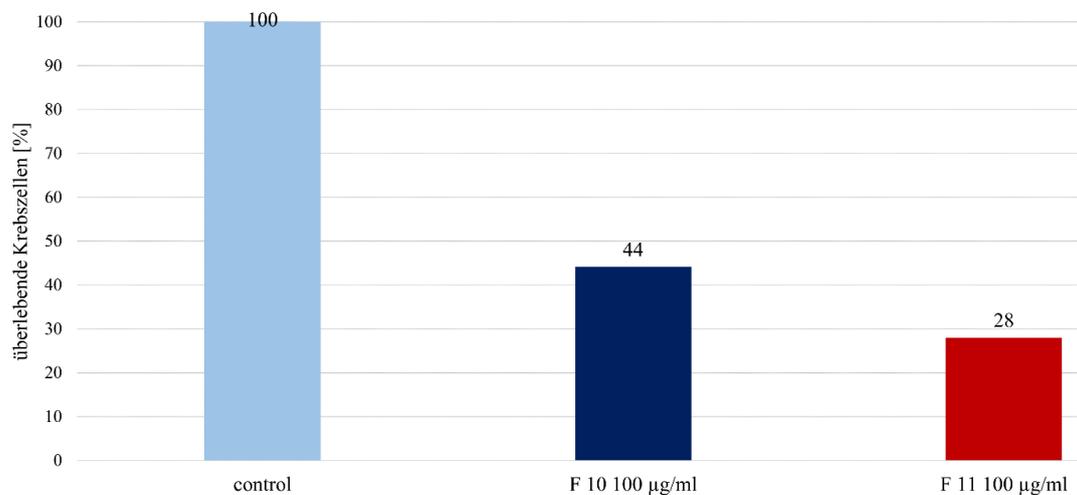


Abbildung 19 Überlebensrate der MCF-7 Zelllinie bei Behandlung mit F 10 und F 11

Bei der Untersuchung der krebszelltötenden Wirkung der Fraktionen 10 und 11 auf die Brustkrebszelllinie MCF-7 zeigte sich, dass F 11 bei 100 µg/ml einen stärker abtötenden Effekt hatte, als F 10 in derselben Konzentration. Konkret tötet F 11 72 % der Krebszellen ab, wohingegen es bei F 10 56 % waren (siehe Abbildung 19).

3.4.3 Zytotoxizität der Fraktionen 10 und 11 auf die HeLa Zelllinie

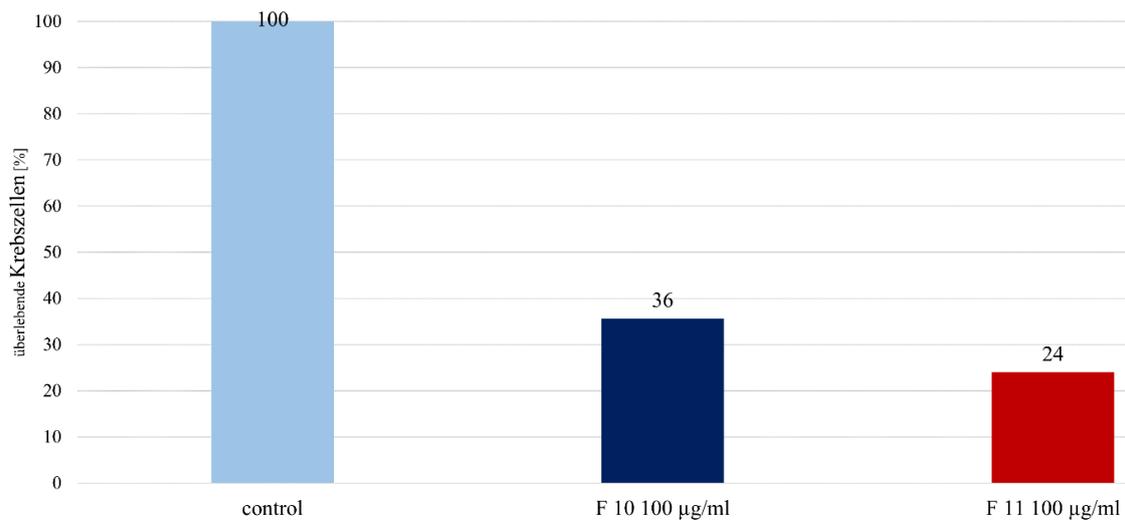


Abbildung 20 Überlebensrate der HeLa Zelllinie bei Behandlung mit F 10 und F 11

Der stärkste zu beobachtende Effekt auf Krebszellen zeigte sich bei den Gebärmutterhalskrebszellen. Bei Fraktion 10 starben 64 % der behandelten Krebszellen, bei Behandlung mit F 11 sogar 76 % (siehe Abbildung 20).

3.5 Stabilität von *Caesalpinia sappan* Fraktionen

3.5.1 Stabilität der Fraktionen in Lösung

Da die polareren Fraktionen in vorangegangenen Arbeiten Instabilitäten aufwiesen, wurden die apolareren Fraktionen bezüglich ihrer Stabilität untersucht.

Um eine bessere Übersichtlichkeit der Zersetzung zu ermöglichen, wurden lediglich die Hauptprodukte der Zersetzungsreaktionen berücksichtigt.

Fraktion 8

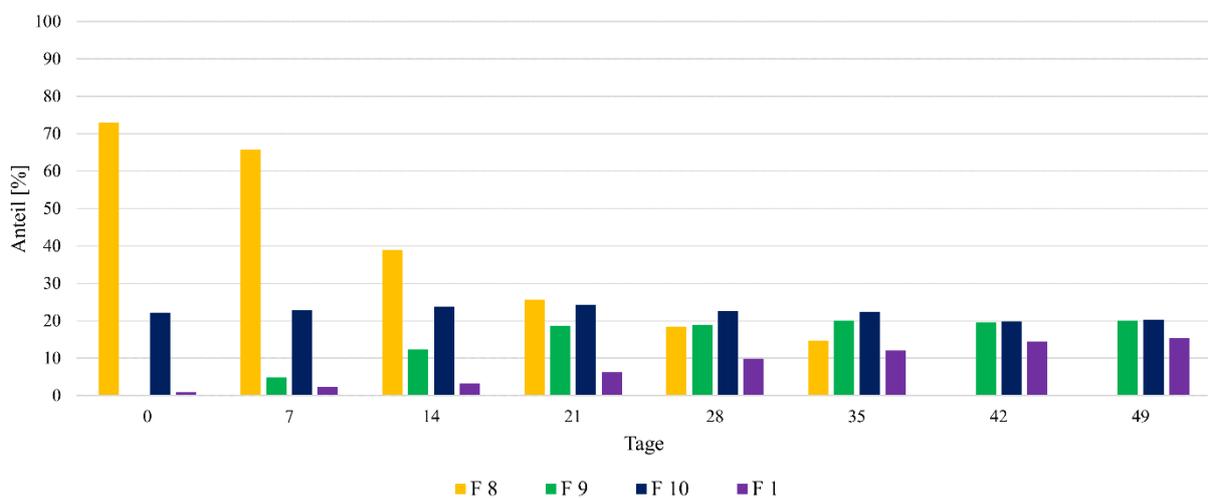


Abbildung 21 Stabilität von F 8 bei Lagerung über sieben Wochen in Lösung mit TFA

Fraktion 8 (als Hauptkomponente) zeigt im gelösten Zustand sofort einen Anteil von ungefähr 20 % an Fraktion 10, wobei es keinen Unterschied macht, ob das Lösungsmittel TFA enthält (Abbildung 21), oder nicht, siehe Abbildung 22.

Im Verlauf des siebenwöchigen Untersuchungszeitraums zeigt sich bei dem Versuchsansatz mit TFA eine vollständige Zersetzung der Fraktion 8 nach Tag 35. Ab der ersten Woche baut sich Fraktion 9 auf. Dieser Anteil steigt soweit an, bis er an Tag 35 20 % erreicht hat und ab diesem Zeitpunkt stagniert. Die bereits erwähnte Fraktion 10 liegt bei der ersten Messung mit einem Anteil von 22 % vor. Dieser Anteil steigt bis Tag 21 und sinkt danach leicht ab, um nach sieben Wochen einen Anteil von 20 % zu erreichen. Episappanol (F 1) entsteht zu einem sehr geringen Anteil bereits innerhalb der ersten Woche (1 %) und erreicht beim Versuchsansatz mit TFA nach sieben Wochen 15 %.

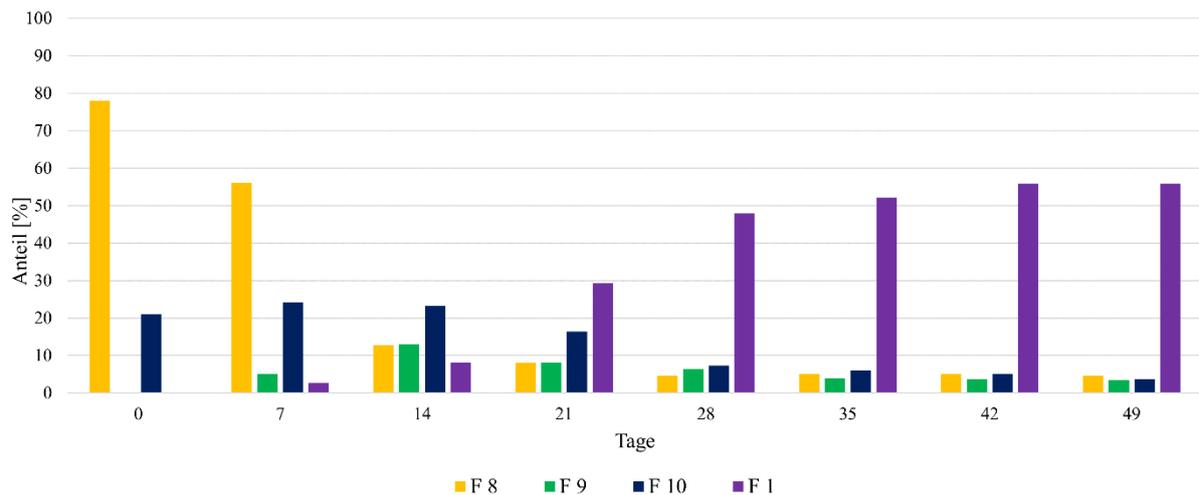


Abbildung 22 Stabilität von F 8 bei Lagerung über sieben Wochen in Lösung ohne TFA

Beim Versuchsansatz ohne TFA (Abbildung 22) verhält sich der Verlauf des Abbaus von F 8 ähnlich, allerdings wird F 8 hierbei nicht vollständig abgebaut. Nach sieben Wochen beträgt der Anteil von F 8 noch 5 %, bei der ersten Messung sind es 78 %. Im Laufe der zweiten Woche nimmt der Anteil von F 8 auf 56 %, an Tag 7, auf 13 % an Tag 14 ab. Fraktion 8 baut sich in dieser Versuchsanordnung schneller, als mit TFA aber nicht vollständig ab wie bei der Untersuchung mit TFA. Nach der ersten Woche ist F 9 entstanden, welche aber bereits nach zweiwöchiger Lagerung ihren anteilmäßigen Höhepunkt mit 13 % erreicht hat. Dieser Anteil nimmt danach stetig ab und beträgt zuletzt 4 %. Der prozentuelle Anteil von F 10, beginnend mit 21 %, steigt innerhalb der ersten Woche auf den Höchststand von 24 % und fällt danach stetig ab, so dass er nach Woche sieben bei 4 % liegt. Beim Versuchsansatz ohne TFA ist am Ende des Untersuchungszeitraums Episappanol (F 1) die Hauptkomponente. Nach einer Woche ist Fraktion 1 entstanden, hat aber zu diesem Zeitpunkt einen sehr geringen Anteil mit 3 %. Dieser wächst im Laufe der nächsten drei Wochen rapide an und erreicht an Tag 28 48 %. Danach steigt der Anteil von Episappanol nur noch langsam an und erreicht nach Ablauf des Untersuchungszeitraums 56 %.

Fraktion 9

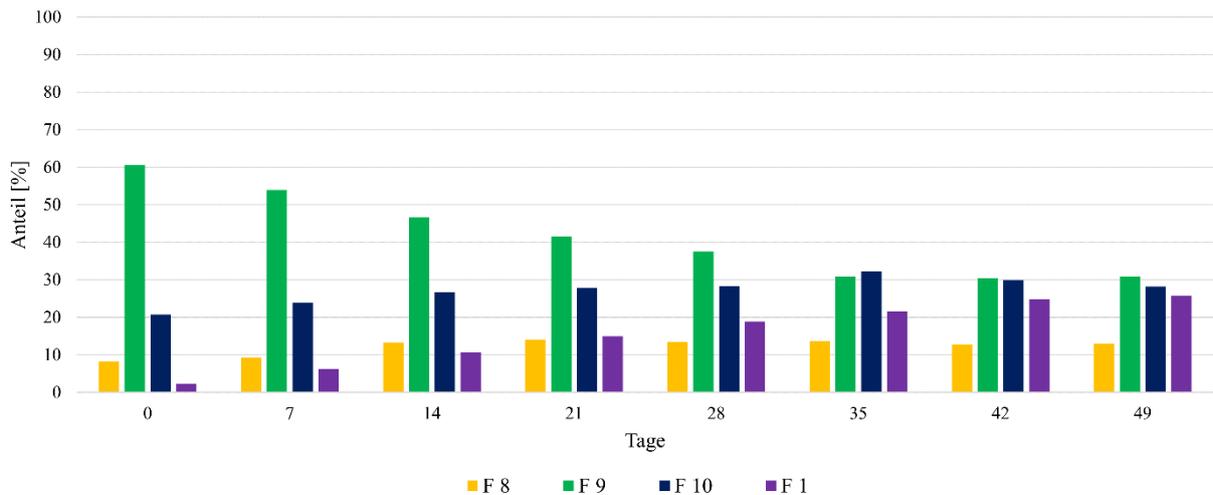


Abbildung 23 Stabilität von F 9 bei Lagerung über sieben Wochen in Lösung mit TFA

Fraktion 9 setzt sich zu Anfang, sowohl bei der Untersuchung mit TFA, als auch bei der Untersuchung ohne TFA, aus drei Komponenten zusammen. F 9 stellt dabei die Hauptkomponente, F 8 und F 10 die Nebenkomponten dar.

In der Untersuchung mit TFA (Abbildung 23) baut sich Fraktion 9 während des siebenwöchigen Untersuchungszeitraums, besonders innerhalb der ersten fünf Wochen ab und erreicht am Ende einen Anteil von 31 %, vorher betrug dieser 61 %. Während Fraktion 9 abgebaut wird, steigert sich der Anteil von F 8 und F 10 bis zum Tag 35 stetig. Zu Anfang hatte F 8 einen Anteil von 8 % und zu seinem Höhepunkt nach Tag 35 einen Anteil von 14 %. F 10 weist zu Beginn einen Anteil von 21 % auf, an Tag 35 steigt dieser auf 32 %. Im Verlauf der letzten beiden Untersuchungswochen sinkt er wieder leicht ab. Zu Beginn der Stabilitätsuntersuchung (mit TFA) zeigt sich bereits bei der ersten Messung Episappanol (F 1) mit einem Anteil von 2 %. Dieser Anteil steigt innerhalb der sieben untersuchten Wochen auf einen Stand von 26 % an.

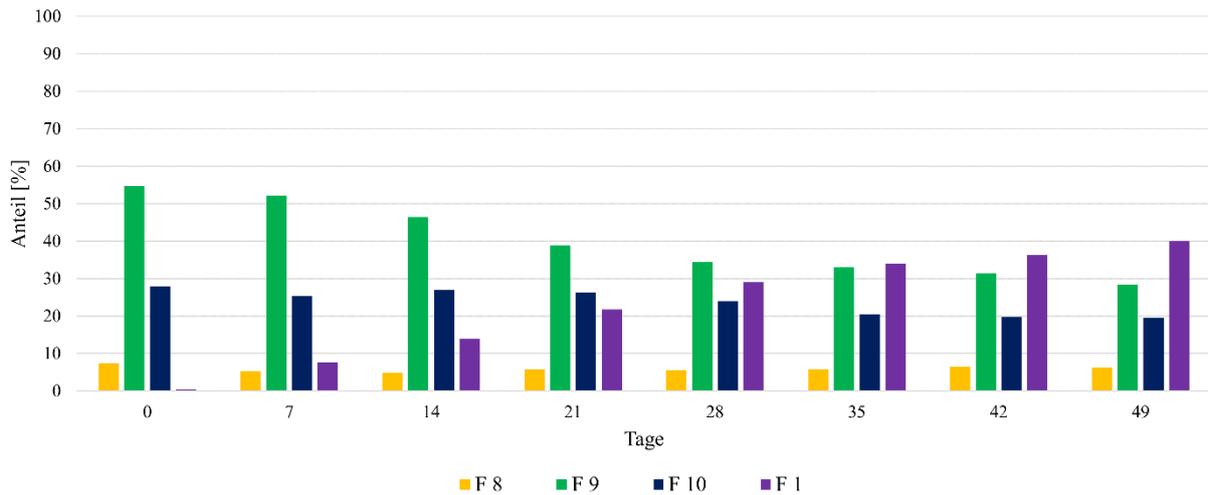


Abbildung 24 Stabilität von F 9 bei Lagerung über sieben Wochen in Lösung ohne TFA

Bei der Untersuchung ohne TFA (Abbildung 24) ist der Anteil von F 9 zu Anfang geringer, als bei der Untersuchung mit TFA. Hierbei beträgt der Anteil 55 %. Während des Untersuchungszeitraums sinkt der Wert auf 28 % und liegt damit auf einem ähnlichen Niveau wie bei der Untersuchung mit TFA (31 %). Fraktion 8 hat bei der ersten Messung einen Anteil von 7 % und sinkt im Verlaufe der Untersuchung auf 6 %. Der Anteil von F 10 liegt höher, zu Anfang beträgt er 28 %. Innerhalb der ersten vier Wochen sinkt der Anteil auf 24 %, am Ende des Untersuchungszeitraums beträgt er noch 20 %. Episappanol (F 1) ist in der ersten Messung bereits mit einem Anteil von 1 % vorhanden und baut sich danach rasch auf. Nach der ersten Woche beträgt der Anteil 8 %, nach sieben Wochen stellt Episappanol (F 1) mit 40 % die Hauptkomponente dar.

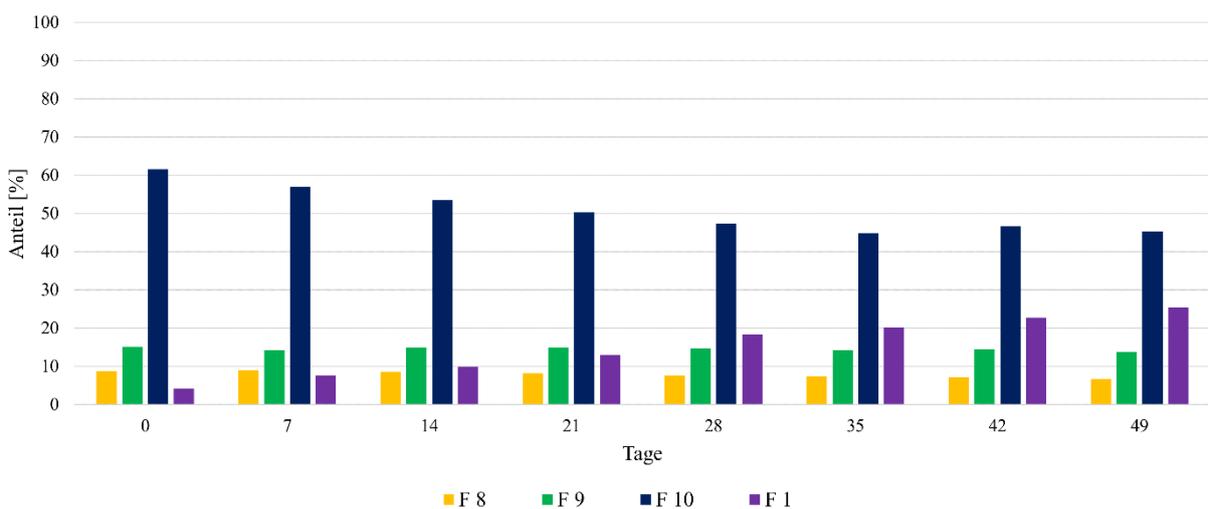


Abbildung 25 Stabilität von F 10 bei Lagerung über sieben Wochen in Lösung mit TFA

Fraktion 10 (Abbildung 25) setzt sich, wie Fraktion 9, aus drei Komponenten zusammen. In diesem Fall stellt F 10 die Hauptkomponente und F 8 und 9 die Nebenkomponten dar.

Die Lagerungsstudie von F 10 mit TFA, dargestellt in Abbildung 25, zeigt die Abnahme des prozentuellen Anteils der Fraktion 10 von 62 % auf 45 %. Nachdem die Abnahme von F 10 zu Anfang recht kontinuierlich verläuft, jede Woche werden ungefähr 3 % zersetzt - verlangsamt sich der Abbau während Woche vier deutlich - die Abnahme beträgt nur noch ungefähr 1 %. Zu Beginn der Untersuchung hat F 8 einen Anteil von 9 %, während des siebenwöchigen Testzeitraums sinkt dieser Anteil auf 7 % ab. Der Anteil von F 9, der zu Anfang 15 % beträgt, sinkt während des betrachteten Zeitraums kontinuierlich leicht ab. Nach sieben Wochen beträgt der Anteil noch 14 %. Auch bei der Lagerung von Fraktion 10 entsteht Episappanol (F 1), dieser Prozess vollzieht sich sofort während des Lösens, so dass Fraktion 1 schon bei der ersten Untersuchung mit einem Anteil von 4 % vorliegt. Dieser Anteil vergrößert sich stetig bis er nach sieben Wochen mit 25 % die Komponente mit dem zweitgrößten Anteil darstellt.

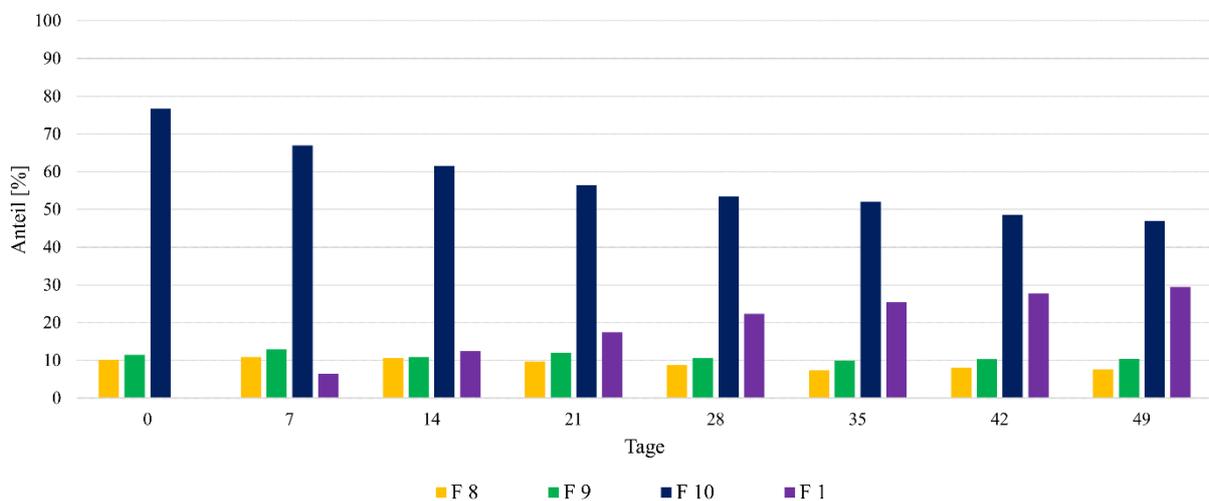


Abbildung 26 Stabilität von F 10 bei Lagerung über sieben Wochen in Lösung ohne TFA

Die Ergebnisse der Lagerungsuntersuchung ohne TFA sind in Abbildung 26 dargestellt. Der Anteil von F 10 ist mit einem Anfangswert von 77 % höher als im Versuch mit TFA, er fällt aber direkt in der ersten Wochen bereits um 10 % auf 67 %. Im weiteren Verlauf sinkt der Anteil an F 10 auf 47 % ab und erreicht damit einen ähnlichen prozentuellen Anteil, wie F 10 in der Untersuchung mit TFA. Bei Betrachtung des Verlaufs von Fraktion 8 fällt auch hier eine kontinuierliche Abnahme des Anteils auf. Der Anteil von F 8 beträgt in der ersten Messung 10 %, nach sieben Wochen liegt dieser Anteil nur noch bei 8 %. Bei Fraktion 9 zeigt sich innerhalb der ersten Woche ein leichter Anstieg des Anteils von 11 % auf 13 %. Dieser Anteil nimmt aber im Verlauf des verbleibenden Zeitraums auf 10 % ab. Wie bereits bei der Untersuchung mit TFA aufgezeigt, entsteht auch bei der Untersuchung ohne TFA Episappanol (F 1). Allerdings ist der Anteil mit 0,2 % zu Anfang sehr gering. Innerhalb der ersten Woche wächst dieser auf 7 % und nimmt danach weiter stetig zu. Am Ende des

Untersuchungszeitraums beträgt der Anteil 30 % und stellt damit die zweitgrößte Komponente dar. Die größte Komponente verbleibt auch hier F 10.

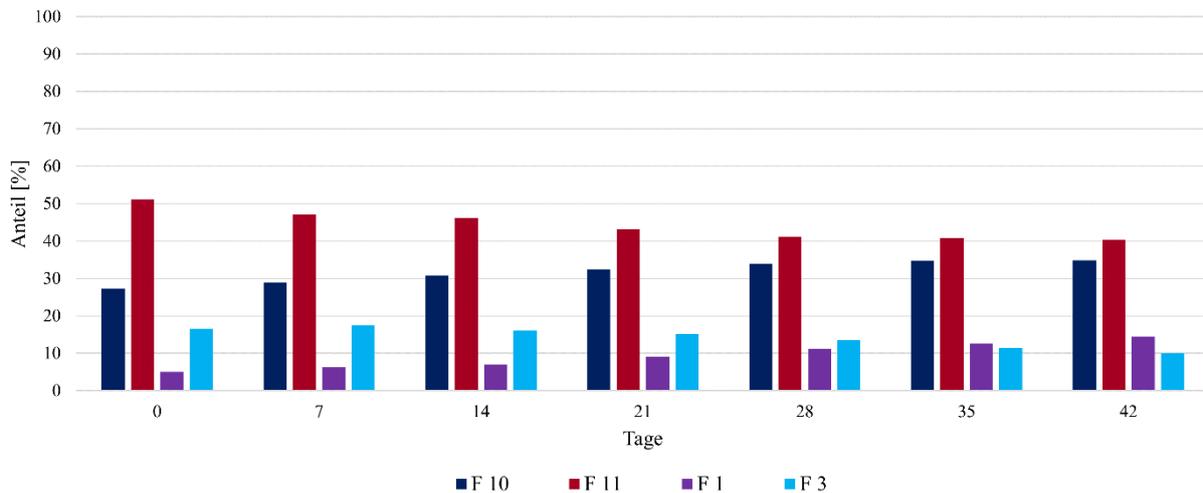


Abbildung 27 Stabilität von F 11 bei Lagerung über sieben Wochen in Lösung mit TFA

In Abbildung 27 ist der Verlauf der Untersuchung von Fraktion 11 mit TFA dargestellt. Aufgrund des Mangels an Untersuchungslösung ist diese Lagerungsstudie lediglich für sechs Wochen durchgeführt worden. Fraktion 11 zeigt während der ersten Messung einen Anteil von 51 %. Dieser Anteil sinkt kontinuierlich im Laufe der sechs untersuchten Wochen auf einen Anteil von 40 % ab. Wohingegen der Anteil von Fraktion 10, der zu Anfang 27 % beträgt, stetig ansteigt, bis er nach sechs Wochen 35 % beträgt. Episappanol (F 1) zeigt sich bereits während der ersten Untersuchung mit einem Prozentsatz von fast 5 %. Dieser Anteil steigt im Verlauf der sechs Wochen auf 15 %. Die vierte Komponente, die bereits in der ersten Untersuchung vorhanden ist, ist Fraktion 3. Fraktion 3 wurde in vorangegangenen Arbeiten als Brazilin identifiziert. Nach einem kurzfristigen geringen Anstieg innerhalb der ersten Woche auf 17 %, sinkt der Anteil von Brazilin im weiteren Verlauf auf 10 % ab.

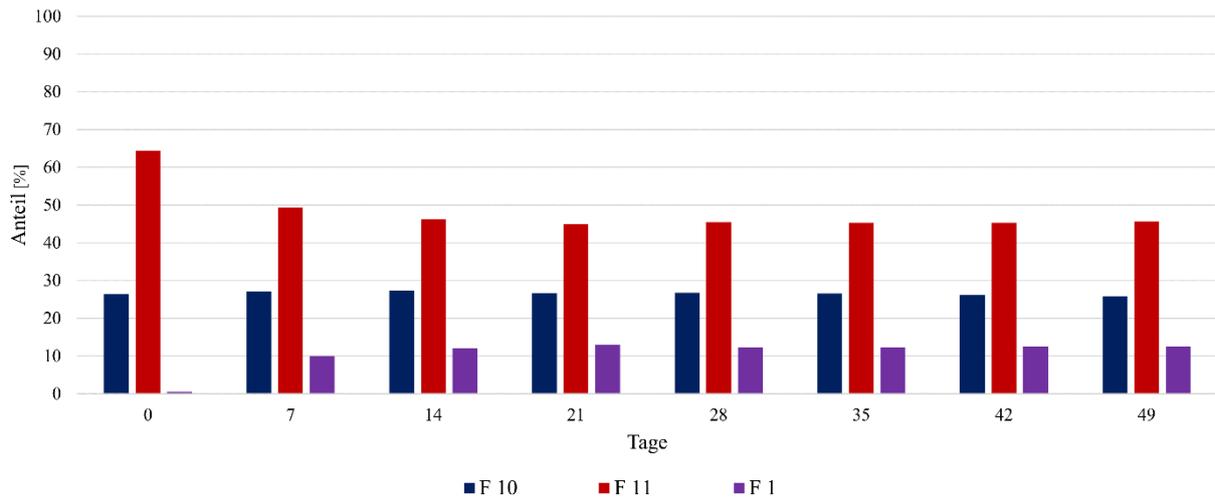


Abbildung 28 Stabilität von F 11 bei Lagerung über sieben Wochen in Lösung ohne TFA

Die Lagerungsstudie von Fraktion 11 bei Lagerung in Lösungsmittel ohne TFA ist in Abbildung 28 dargestellt. Die Hauptkomponente F 11 hat zu Anfang den größten Anteil mit 64 %. Innerhalb der ersten Woche sinkt dieser Anteil auf 49 %. Im Laufe der zweiten Woche ist nur noch eine kleinere Abnahme auf 46 % zu verzeichnen. Der Anteil bleibt ab diesem Zeitpunkt, bis auf einige unerhebliche Schwankungen, konstant. Bei Fraktion 10 stellt sich ebenso nach zwei Wochen nahezu ein Gleichgewicht ein. Zu Beginn beträgt der Anteil 26 %, dieser steigt nach einer Woche auf 27 %. Bei der dritten Messung, nach der zweiten Lagerungswoche, beträgt der Anteil 27 %, ab diesem Zeitpunkt sinkt der Anteil von Fraktion 10 nach der siebten Lagerungswoche auf 26 % ab. Für Fraktion 1, die sich innerhalb der ersten Woche bildet, verhält es sich recht ähnlich. Nach der ersten Lagerungswoche steigt der Anteil von 1 % auf 10 %. Im Lauf der zweiten Woche baut sich Episappanol (F 1) weiter auf und erreicht in der dritten Messung einen Wert von 12 %. Danach stellt sich das Gleichgewicht für Episappanol (F 1) bei ungefähr 13 % ein.

Im Stabilitätsversuch zeigt F 11 die höchste Stabilität.

Übersicht der Stabilität von F 8 bis F 11 in Lösung

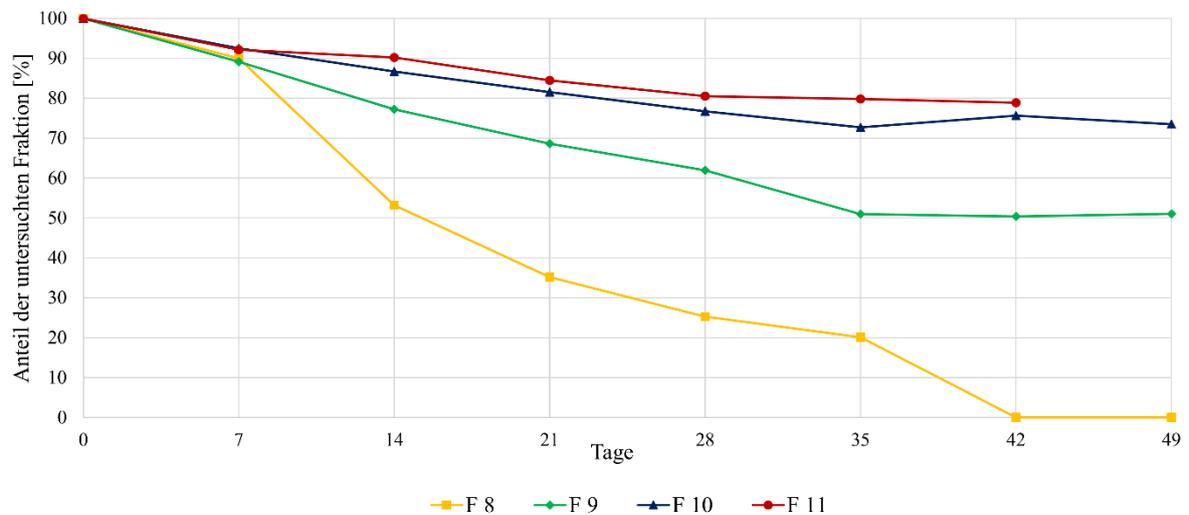


Abbildung 29 Vergleich der Lagerungsstabilität der Fraktionen in Lösung mit TFA

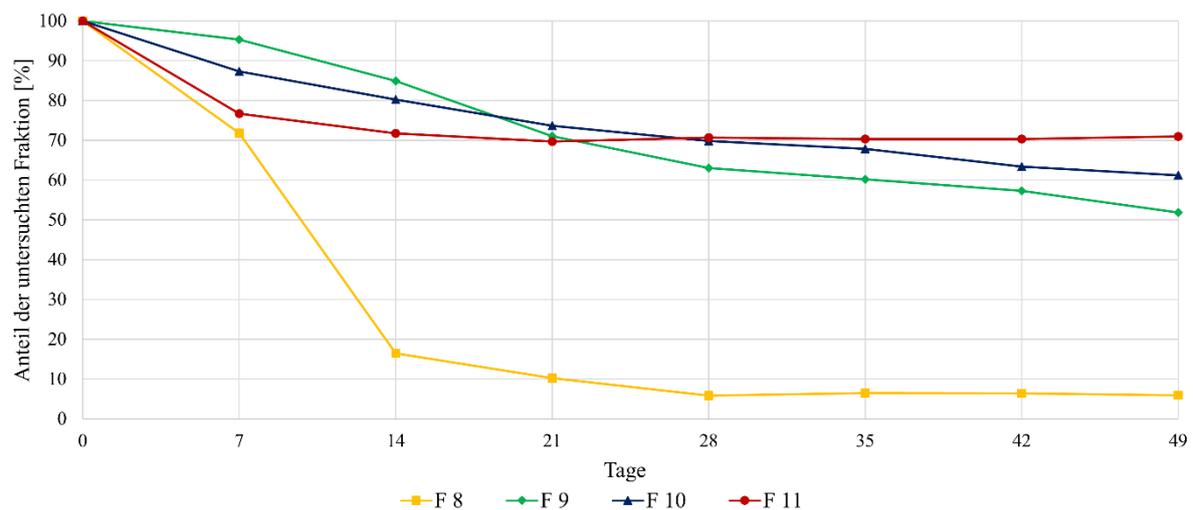


Abbildung 30 Vergleich der Lagerungsstabilität der Fraktionen in Lösung ohne TFA

In Abbildung 29 und Abbildung 30 sind die Zersetzungsprozesse der Hauptkomponenten während der Lagerung mit TFA (Abbildung 29) und ohne TFA (Abbildung 30) im Lösungsmittel dargestellt. Um die Ergebnisse miteinander vergleichbar zu machen wurden die errechneten Werte der ersten Messung auf 100 % normiert.

Bei der Lagerung mit TFA im Lösungsmittel ist besonders bei F 8 die rasche und vor allem vollständige Zersetzung deutlich erkennbar. Bei Fraktion 9 ist das Erreichen des Gleichgewichts nach Tag 35 sehr gut ersichtlic. F 10 fällt bis zum Tag 42 kontinuierlich leicht ab. F 11 erreicht ab Tag 28 einen konstanten Wert.

In der Lagerungsuntersuchung ohne TFA ist F 8 ebenfalls die instabilste Fraktion. Der Anteil an Fraktion 9 sinkt während der gesamten Lagerungszeit kontinuierlich ab. F 10 zersetzt sich stetig, mit Anfangs steiler im Verlauf dann abflachender Kurve. Deutlich ist zu erkennen, dass sich bei F 11 relativ früh ein Gleichgewicht einstellt.

Für Fraktion 8 zeigen sich im Vergleich der Lösungslagerungen deutliche Unterschiede im Verlauf der Zersetzung. Bei Lagerung mit TFA erfolgte diese vollständig und bei Lagerung ohne TFA unvollständig. Die bei der Lagerung ohne TFA stattfindende Zersetzung erfolgt aber dafür rascher, da hier bereits nach einer Woche nur noch knapp 70 % der Ausgangsmenge vorhanden sind (vgl. 90 % mit TFA) und dieser rapide Abfall sich fortsetzt. Bereits in der dritten Messung, am Tag 14, macht Fraktion 8, als ursprüngliche Hauptkomponente, nur noch 17 % aus und erreicht nach weiteren zwei Wochen Lagerungszeit seine Endkonzentration.

Fraktion 9 weist am Ende der Untersuchung ohne TFA denselben normierten Wert auf, wie bei Lagerung mit TFA. Bei der TFA-freien Lagerung wird dieser Wert langsamer erreicht.

Fraktion 10 zeigt bei der Lagerung ohne TFA besonders in der ersten Woche eine deutlich schnellere Abbaureaktion, als bei der Lagerung mit TFA. Am Ende der Stabilitätsuntersuchung zeigt sich, dass die Lagerung ohne TFA zu einem höheren Zersetzungsgrad führt. Im ersten Fall, die Lagerung mit TFA, pendelt sich der Anteil bei ungefähr 75 % ein, während er im zweiten Fall - Lagerung ohne TFA - auf 60 % absinkt.

Fraktion 11 erreicht bei Lagerung ohne TFA bereits nach zwei Wochen, ein Gleichgewicht bei ungefähr 80 % der Ausgangsmenge. Wohingegen der Anteil von F 11 bei Lagerung mit TFA langsam, aber stetig sinkt und nach vier Wochen ein Gleichgewicht bei 70 % erreicht.

3.5.2 Stabilität der Fraktionen als Festsubstanz

Man kann eine Fraktion als stabil bezeichnen, wenn innerhalb des Untersuchungszeitraums die Um- oder Zersetzungsrates geringer als 10 % von der Ausgangsmenge ist.

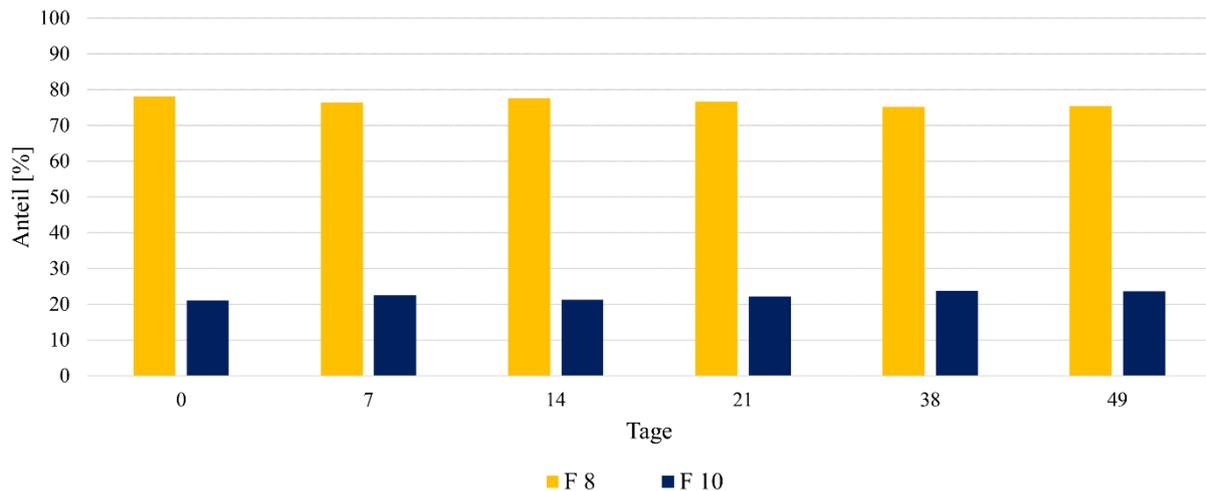


Abbildung 31 Darstellung der Stabilität der Fraktion 8 bei Lagerung als Trockensubstanz

Bei der Untersuchung von Fraktion 8 über einen Zeitraum von sieben Wochen zeigt sich, wie in Abbildung 31 dargestellt, dass diese als stabil zu bezeichnen ist. Der Anteil des bei Fraktion 8 enthaltenen F 10 bleibt über den Zeitraum ebenfalls konstant.

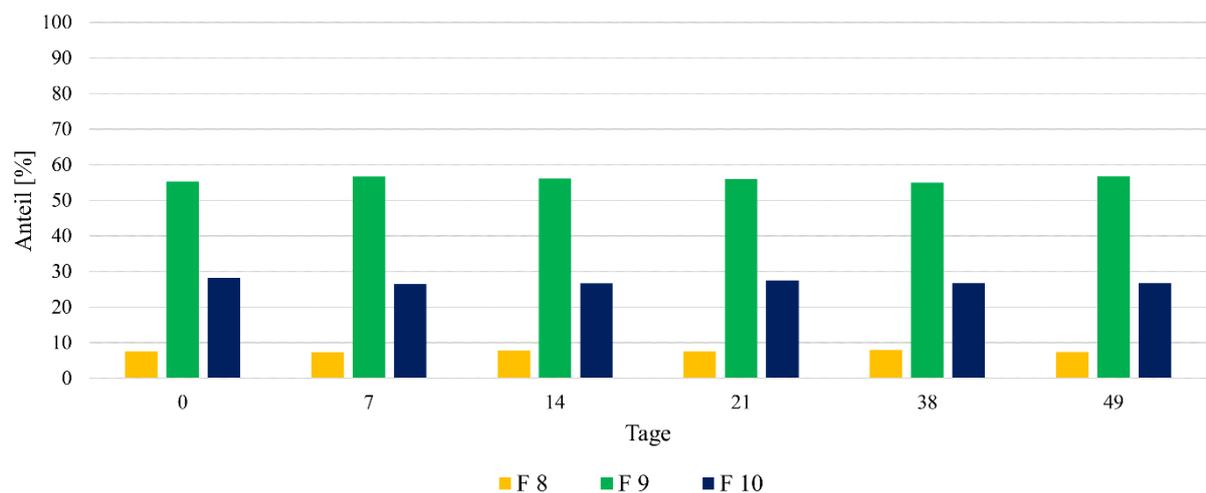


Abbildung 32 Darstellung der Stabilität der Fraktion 9 bei Lagerung als Trockensubstanz

Fraktion 9, siehe Abbildung 32, zeigt während des Untersuchungszeitraums von sieben Wochen eine ausreichende Stabilität um Fraktion 9 als stabil bezeichnen zu können. Die beiden

zusätzlich enthaltenen Fraktionen 8 und 10 verändern sich ebenfalls nicht in ihrem Anteil im Untersuchungszeitraum.

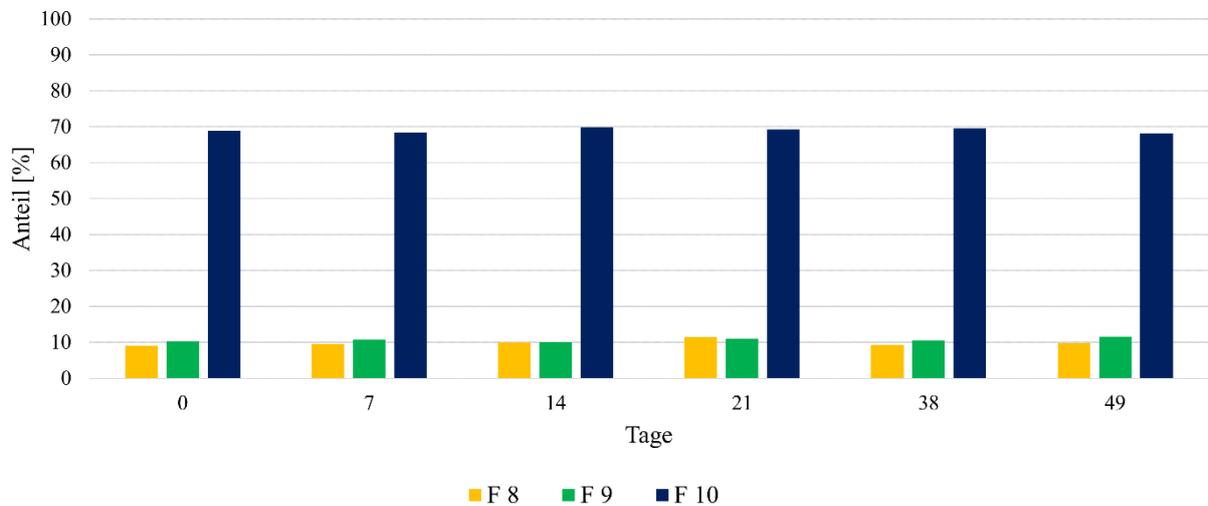


Abbildung 33 Darstellung der Stabilität der Fraktion 10 bei Lagerung als Trockensubstanz

Die Untersuchung von Fraktion 10 (siehe Abbildung 33) zeigt über den untersuchten Zeitraum keinerlei Umsetzungsreaktionen. Damit kann auch Fraktion 10 als stabil bezeichnet werden. Die Fraktionen 8 und 9 bleiben in ihren Anteil ebenfalls konstant.

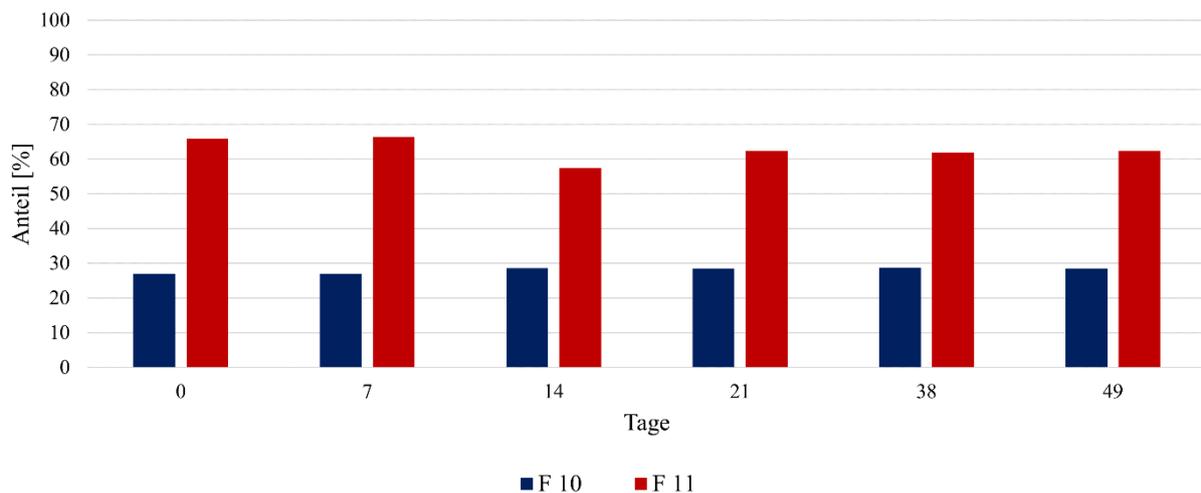


Abbildung 34 Darstellung der Stabilität der Fraktion 11 bei Lagerung als Trockensubstanz

Fraktion 11, siehe Abbildung 34, ist als stabil anzusehen. Der Anteil von Fraktion 10 bleibt über den gesamten Zeitraum gleich.

4 Zusammenfassung

Die Auftrennung der apolareren Fraktionen von *Caesalpinia sappan* mittels präparativer reversed phase HPLC wurde in mehreren Schritten erfolgreich optimiert. Dadurch konnten fünf Einzelfraktionen in adäquater Menge isoliert werden, so dass verschiedene weiterführende Untersuchungen realisiert werden konnten. Die Fraktionen wurden auf ihre jeweilige antiinflammatorische Wirkung getestet und zwei geeignete Fraktionen auf die Zytotoxizität gegenüber Krebszellen analysiert. Abschließend wurden die Lagerungsstabilitäten der gewonnenen Fraktionen in Lösung und als Trockensubstanz untersucht.

Die fünf gewonnenen und im Rahmen dieser Arbeit untersuchten Fraktionen wurden, entsprechend ihrer Position im Chromatogramm, als Fraktionen 6/7, 8, 9, 10 und 11 bezeichnet. Die chemische Struktur der Fraktionen ist derzeit noch nicht bekannt.

Fraktion 8 ist ein Gemisch aus Fraktion 8 und 10, der Anteil von 8 liegt bei 78 %. Fraktion 9 ist ein Vielkomponentengemisch, wobei der Anteil der Hauptkomponente F 9 relativ gering ist (Anteil F 9 – 55 %). Ebenso weist F 10 Anteile von F 8 und F 9 auf (F 10 – 70 %). F 11 mit einem Anteil von 65 % beinhaltet F 10.

In Bezug auf die antiinflammatorische Untersuchungen weisen alle getesteten Fraktionen ein eindeutiges entzündungshemmendes Potential auf. Dieses Potential reicht von 40 bis 75 % Reduzierung der Interleukin-6 Ausschüttung in LPS induzierten Makrophagen. Eine in diesem Zusammenhang herausragende antiinflammatorische Wirksamkeit wurde bei Fraktion 9 festgestellt. Diese senkt die Interleukin-6 Ausschüttung auf 24 %. Bei allen anderen Fraktionen liegt die Hemmung der Ausschüttung von Interleukin-6 zwischen 40 und 55 %. Fraktionen 10 und 11 erwiesen sich in der verwendeten Konzentration von 100 µg/ml als zytotoxisch. Bei Minderung der Konzentration auf 50 µg/ml konnte eine Interleukin-6 Reduktion von ungefähr 50 % festgestellt werden.

Aufgrund des zytotoxischen Potentials der Fraktionen 10 und 11 auf Makrophagen wurde untersucht, ob dieser Effekt bei unterschiedlichen Krebszelllinien verifiziert werden kann und sie somit potenziell zur Therapie einer Krebserkrankung geeignet sind. Bei allen untersuchten Krebszellen zeigen die Fraktionen 10 und 11 einen zytotoxischen Effekt bei einer Konzentration von 100 µg/ml.

F 11 weist bei den drei untersuchten Krebszelllinien ein stark zytotoxisches Potential auf. Die Zervixkarzinomzelllinie ist am stärksten beeinträchtigt. Es überleben nur 24 % der eingesetzten Zellen. Auch bei den Zellen der Mammakarzinomzelllinie MCF-7 überleben lediglich 28 %. Die geringste Auswirkung, im Vergleich zu den anderen beiden untersuchten Zelllinien, zeigt F 11 auf die Kolorektalkarzinomzellen, es überleben 40 %.

Alle Krebszellen sprechen auch auf die Behandlung mit Fraktion 10 an, aber nicht im selben Ausmaß, wie es bei der Behandlung mit F 11 zu beobachten ist. Die HeLa-Zellen zeigen die größte Empfindlichkeit mit lediglich 36 % Überlebensrate der Zellen. Bei MCF-7 überleben weniger als die Hälfte der Zellen (44 %). Wie bereits bei Fraktion 11 beobachtet, zeigen die Caco-2 Zellen die geringste Empfindlichkeit auf F 10. Es überleben hierbei mit 56 % knapp mehr als die Hälfte der Zellen.

Ob sich ein Einsatz, zumindest als Unterstützung zu einer Krebstherapie, anbietet, müsste in weiteren Studien eingehender untersucht werden.

Um eventuelle Instabilitäten der Pflanzenauszüge bei einem Einsatz als Medikament vorab bewerten zu können, wurden Untersuchungen der Lagerungsstabilitäten in verschiedenen Lösungen und als Trockensubstanz durchgeführt.

In Lösung verhalten sich alle Fraktionen instabil. Die Instabilität weist allerdings einen unterschiedlichen Schweregrad auf. F 8 ist vollkommen instabil, wohingegen F 11 nur ein geringes Potential zur Zersetzung zeigt. Die sich zeigenden Zersetzungen treten unabhängig von der Verwendung des Lösungsmittels mit TFA oder ohne TFA auf, lediglich der Grad der Zersetzung variiert. Aber die entstehenden Produkte unterscheiden sich stark in ihrem jeweiligen Anteil. Es ist festzustellen, dass eine Lagerung ohne TFA möglicherweise einen größeren Anteil an Episappanol (F 1) verursacht.

Im Gegensatz zur instabilen Lagerung in Lösung erwies sich eine Lagerung als Feststoff im trockenen Zustand, unter Lichtausschluss, durchweg als stabil.

Abschließend kann festgehalten werden, dass alle durch die Optimierung gewonnenen apolareren Fraktionen von *Caesalpinia sappan* eine antiinflammatorische Wirkung aufzeigen und die Fraktionen 10 und 11 zusätzlich eine antikanzerogene Wirkung zeigen. Diese Wirkungen bieten für weitere Studien interessante Ansätze.

5 Tabellen und Abbildungsverzeichnis

5.1 Tabellenverzeichnis

	Seite
Tabelle 1 Komponenten und Bedingungen der analytischen HPLC.....	12
Tabelle 2 Ausgangsgradient – Gradient der polareren Komponenten angegeben als Konzentrationsverlauf	13
Tabelle 3 Optimierter Gradient – Gradient der apolareren Komponenten angegeben als Konzentrationsverlauf	14
Tabelle 4 Komponenten und Bedingungen der präparativen HPLC.....	15
Tabelle 5 Gradient der präparativen HPLC für die apolareren Komponenten, angegeben als Konzentrationsverlauf	16

5.2 Abbildungsverzeichnis

	Seite
Abbildung 1 Illustration von <i>Caesalpinia sappan</i> [5].....	2
Abbildung 2 RAW 264,7 Zelllinie, dargestellt bei niedriger und bei hoher Zelldichte (ATCC Collection, 2014) [26]	5
Abbildung 3 Caco-2 Zellen bei geringer Zelldichte (links) und bei hoher Zelldichte (rechts) (ATCC Collection, 2014) [32]	6
Abbildung 4 MCF-7 Zellen bei niedriger Zelldichte (links) und bei hoher Zelldichte (rechts) (ATCC Collection, 2014) [36]	8
Abbildung 5 HeLa Zellen bei niedriger Zelldichte (links) und bei hoher Zelldichte (rechts) (ATCC Collection, 2014) [43]	9
Abbildung 6 Schematische Darstellung der HPLC-Gradienten vor und nach der Optimierung	15
Abbildung 7 Schematische Darstellung des Gradienten für die Auftrennung mittels präparativer HPLC	16
Abbildung 8 Chromatogramm der präparativen Auftrennung des <i>C.sappan</i> Extrakts (100 mg/ml gelöst in 25 % Acetonitril, Injektionsvolumen 1000 µl, Trennung erfolgte ohne TFA)	27

Abbildung 9 Chromatogramm der präparativen Auftrennung des C.sappan Extrakts (100 mg/ml gelöst in 50% Ethanol, Injektionsvolumen 1000 µl)	28
Abbildung 10 Chromatogramm der präparativen Auftrennung des C.sappan Extrakts (100 mg/ml gelöst in 25 % Acetonitril, Injektionsvolumen 1000 µl, Trennung erfolgte ohne TFA)	28
Abbildung 11 Chromatogramm der präparativen HPLC bei einem Injektionsvolumen von 1500 µl.....	29
Abbildung 12 Chromatogramm (analytische HPLC) der Fraktion 6/7, 1 mg/ml	30
Abbildung 13 Chromatogramm (analytische HPLC) der Fraktion 8, 1 mg/ml	31
Abbildung 14 Chromatogramm (analytische HPLC) der Fraktion 9, 1 mg/ml	32
Abbildung 15 Chromatogramm (analytische HPLC) der Fraktion 10, 1 mg/ml	33
Abbildung 16 Chromatogramm (analytische HPLC) der Fraktion 11, 1 mg/ml	33
Abbildung 17 Vergleich der antiinflammatorischen Wirkung der Fraktionen 6 – 11	34
Abbildung 18 Überlebensrate der Caco-2 Zelllinie bei Behandlung mit F 10 und F 11	37
Abbildung 19 Überlebensrate der MCF-7 Zelllinie bei Behandlung mit F 10 und F 11	37
Abbildung 20 Überlebensrate der HeLa Zelllinie bei Behandlung mit F 10 und F 11	38
Abbildung 21 Stabilität von F 8 bei Lagerung über sieben Wochen in Lösung mit TFA	39
Abbildung 22 Stabilität von F 8 bei Lagerung über sieben Wochen in Lösung ohne TFA.....	40
Abbildung 23 Stabilität von F 9 bei Lagerung über sieben Wochen in Lösung mit TFA	41
Abbildung 24 Stabilität von F 9 bei Lagerung über sieben Wochen in Lösung ohne TFA.....	42
Abbildung 25 Stabilität von F 10 bei Lagerung über sieben Wochen in Lösung mit TFA	42
Abbildung 26 Stabilität von F 10 bei Lagerung über sieben Wochen in Lösung ohne TFA...	43
Abbildung 27 Stabilität von F 11 bei Lagerung über sieben Wochen in Lösung mit TFA	44
Abbildung 28 Stabilität von F 11 bei Lagerung über sieben Wochen in Lösung ohne TFA...	45
Abbildung 29 Vergleich der Lagerungsstabilität der Fraktionen in Lösung mit TFA.....	46
Abbildung 30 Vergleich der Lagerungsstabilität der Fraktionen in Lösung ohne TFA	46
Abbildung 31 Darstellung der Stabilität der Fraktion 8 bei Lagerung als Trockensubstanz ...	48
Abbildung 32 Darstellung der Stabilität der Fraktion 9 bei Lagerung als Trockensubstanz ...	48
Abbildung 33 Darstellung der Stabilität der Fraktion 10 bei Lagerung als Trockensubstanz .	49
Abbildung 34 Darstellung der Stabilität der Fraktion 11 bei Lagerung als Trockensubstanz .	49

6 Quellenverzeichnis

1. Hikino, H., T. Taguchi, H. Fujimura, and Y. Hiramatsu, *Antiinflammatory principles of Caesalpinia sappan wood and of Haematoxylon campechianum wood*. *Planta Medica*, 1977. **31**(3): p. 214-20.
2. Baek, N.I., S.G. Jeon, E.M. Ahn, J.T. Hahn, J.H. Bahn, J.S. Jang, S.W. Cho, J.K. Park, and S.Y. Choi, *Anticonvulsant compounds from the wood of Caesalpinia sappan L.* *Archives of Pharmacal Research*, 2000. **23**(4): p. 344-8.
3. Xu, H.X. and S.F. Lee, *The antibacterial principle of Caesalpinia sappan*. *Phytotherapy research : PTR*, 2004. **18**(8): p. 647-51.
4. eFloras.org. *Flora of China*. [Zugriff am 17. Februar 2015]; Available from: http://www.efloras.org/florataxon.aspx?flora_id=2&taxon_id=200011982.
5. I.M.P.G.C. *Indian Medicinal Plants Growers' Consortium, Caesalpinia sappan 2003-10* [Zugriff am 19. März 2015]; Available from: http://www.impgc.com/plantinfo_A.php?id=275&bc=Raw%20Herbs%20%BB%20Wood.
6. Badami, S., S. Moorkoth, S.R. Rai, E. Kannan, and S. Bhojraj, *Antioxidant activity of Caesalpinia sappan heartwood*. *Biological & pharmaceutical bulletin*, 2003. **26**(11): p. 1534-7.
7. Wang, Y.-Z., S.-Q. Sun, and Y.-B. Zhou, *Extract of the dried heartwood of Caesalpinia sappan L. attenuates collagen-induced arthritis*. *Journal of Ethnopharmacology*, 2011. **136**(1): p. 271-278.
8. Yodsaoue, O., S. Cheenpracha, C. Karalai, C. Ponglimanont, and S. Tewtrakul, *Anti-allergic activity of principles from the roots and heartwood of Caesalpinia sappan on antigen-induced beta-hexosaminidase release*. *Phytotherapy research : PTR*, 2009. **23**(7): p. 1028-31.
9. Jeong, I.-Y., C.-H. Jin, Y.-D. Park, H.-J. Lee, D.-S. Choi, M.-W. Byun, and Y.-J. Kim, *Anti-inflammatory Activity of an Ethanol Extract of Caesalpinia sappan L. in LPS-induced RAW 264.7 Cells*. *Journal of Food Science and Nutrition*, 2008. **13**(4): p. 253-258.
10. Wu, S.Q., M. Otero, F.M. Unger, M.B. Goldring, A. Phrutivorapongkul, C. Chiari, A. Kolb, H. Viernstein, and S. Toegel, *Anti-inflammatory activity of an ethanolic Caesalpinia sappan extract in human chondrocytes and macrophages*. *Journal of ethnopharmacology*, 2011. **138**(2): p. 364-72.
11. Batubara, I., T. Mitsunaga, and H. Ohashi, *Brazilin from Caesalpinia sappan wood as an antiacne agent*. *Journal of Wood Science*, 2009. **56**(1): p. 77-81.

12. Hu, J., X. Yan, W. Wang, H. Wu, L. Hua, and L. Du, *Antioxidant Activity In Vitro of Three Constituents from Caesalpinia sappan L.* Tsinghua Science & Technology, 2008. **13**(4): p. 474-479.
13. Kim, E.C., Y.S. Hwang, H.J. Lee, S.K. Lee, M.H. Park, B.H. Jeon, C.D. Jeon, S.K. Lee, H.H. Yu, and Y.O. You, *Caesalpinia sappan induces cell death by increasing the expression of p53 and p21WAF1/CIP1 in head and neck cancer cells.* The American journal of Chinese medicine, 2005. **33**(3): p. 405-14.
14. Fu, L.-c., X.-a. Huang, Z.-y. Lai, Y.-j. Hu, H.-j. Liu, and X.-l. Cai, *A New 3-Benzylchroman Derivative from Sappan Lignum (Caesalpinia sappan).* Molecules, 2008. **13**(8): p. 1923-1930.
15. Silbernagl, S. and F. Lang, *Taschenatlas der Pathophysiologie.* 2. korr. Aufl. ed. 2005, Stuttgart [u.a.]: Thieme. X, 407 S.
16. Ferrero-Miliani, L., O.H. Nielsen, P.S. Andersen, and S.E. Girardin, *Chronic inflammation: importance of NOD2 and NALP3 in interleukin-1beta generation.* Clinical and experimental immunology, 2007. **147**(2): p. 227-35.
17. Thomas, L. and M. Messinger, *Pathobiochemie und Labordiagnostik der Entzündung.* LaboratoriumsMedizin; Journal of Laboratory Medicine, 1993. **17**(5): p. 179-194.
18. Curfs, J.H., J.F. Meis, and J.A. Hoogkamp-Korstanje, *A primer on cytokines: sources, receptors, effects, and inducers.* Clinical microbiology reviews, 1997. **10**(4): p. 742-80.
19. Kishimoto, T., *The biology of interleukin-6.* Blood, 1989. **74**(1): p. 1-10.
20. Castell, J.V., M.J. Gomezlechón, M. David, T. Andus, T. Geiger, R. Trullenque, R. Fabra, and P.C. Heinrich, *Interleukin-6 Is the Major Regulator of Acute Phase Protein-Synthesis in Adult Human Hepatocytes.* Febs Letters, 1989. **242**(2): p. 237-239.
21. Maggio, M., J.M. Guralnik, D.L. Longo, and L. Ferrucci, *Interleukin-6 in aging and chronic disease: a magnificent pathway.* The journals of gerontology. Series A, Biological sciences and medical sciences, 2006. **61**(6): p. 575-84.
22. Bauer, J., T.M. Bauer, T. Kalb, T. Taga, G. Lengyel, T. Hirano, T. Kishimoto, G. Acs, L. Mayer, and W. Gerok, *Regulation of interleukin 6 receptor expression in human monocytes and monocyte-derived macrophages. Comparison with the expression in human hepatocytes.* The Journal of experimental medicine, 1989. **170**(5): p. 1537-49.

23. Virca, G.D., S.Y. Kim, K.B. Glaser, and R.J. Ulevitch, *Lipopolysaccharide induces hyporesponsiveness to its own action in RAW 264.7 cells*. The Journal of biological chemistry, 1989. **264**(36): p. 21951-6.
24. ATCC. *RAW 264.7 (ATCC® TIB-71™)* 2014 [Zugriff am 5. Februar 2015]; Available from: <http://www.lgcstandards-atcc.org/Products/All/TIB-71.aspx#generalinformation>.
25. Raschke, W.C., S. Baird, P. Ralph, and I. Nakoinz, *Functional macrophage cell lines transformed by abelson leukemia virus*. Cell, 1978. **15**(1): p. 261-267.
26. ATCC. *RAW 264,7 Zelllinie, dargestellt bei niedriger und bei hoher Zelldichte (ATCC Collection, 2014)*. 2014 [Zugriff am 5. Februar 2015]; Available from: <http://www.lgcstandards-atcc.org/Products/All/TIB-71.aspx#characteristics>.
27. WHO. *Cancer*. 2015 [Zugriff am 17. Februar 2015]; Available from: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs297/en/>.
28. Scholz, H., [Hrsg.], G.B. Kuschinsky, and R.H. Böger, *Taschenbuch der Arzneibehandlung angewandte Pharmakologie*. 213 13., überarb. und aktualisierte Aufl. ed. Springer-Lehrbuch, ed. H. Scholz, G. Kuschinsky, and T. Eschenhagen. 2005, Berlin [u.a.]: Springer. XX, 917 S.
29. Artursson, P., K. Palm, and K. Luthman, *Caco-2 monolayers in experimental and theoretical predictions of drug transport*. Advanced Drug Delivery Reviews, 1996. **22**(1-2): p. 67-84.
30. Sambuy, Y., I. De Angelis, G. Ranaldi, M.L. Scarino, A. Stammati, and F. Zucco, *The Caco-2 cell line as a model of the intestinal barrier: influence of cell and culture-related factors on Caco-2 cell functional characteristics*. Cell biology and toxicology, 2005. **21**(1): p. 1-26.
31. ATCC. *Caco-2 [Caco2] (ATCC® HTB-37™)* 2014 [Zugriff am 5. Februar 2015]; Available from: <http://www.lgcstandards-atcc.org/products/all/HTB-37.aspx#generalinformation>.
32. ATCC. *Caco-2 Zellen bei geringer Zelldichte (links) und bei hoher Zelldichte (rechts) (ATCC Collection, 2014)*. 2014 [Zugriff am 13. Februar 2015]; Available from: <http://www.lgcstandards-atcc.org/~media/Attachments/E/F/1/4/1985.ashx>.
33. Soule, H.D., J. Vazquez, A. Long, S. Albert, and M. Brennan, *A human cell line from a pleural effusion derived from a breast carcinoma*. Journal of the National Cancer Institute, 1973. **51**(5): p. 1409-16.
34. Holliday, D.L. and V. Speirs, *Choosing the right cell line for breast cancer research*. Breast cancer research : BCR, 2011. **13**(4): p. 215.

35. ATCC. *MCF7 (ATCC® HTB-22™) morphology*. 2014 [Zugriff am 5. Februar 2015]; Available from: http://www.lgcstandards-atcc.org/products/all/HTB-22.aspx?geo_country=at#generalinformation.
36. ATCC. *MCF-7 Zellen bei niedriger Zelldichte (links) und bei hoher Zelldichte (rechts) (ATCC Collection, 2014)*. 2014 [Zugriff am 13. Februar 2015]; Available from: <http://www.lgcstandards-atcc.org/~media/Attachments/0/E/E/2/1980.ashx>.
37. Walboomers, J.M.M., M.V. Jacobs, M.M. Manos, F.X. Bosch, J.A. Kummer, K.V. Shah, P.J.F. Snijders, J. Peto, C.J.L.M. Meijer, and N. Munoz, *Human papillomavirus is a necessary cause of invasive cervical cancer worldwide*. *Journal of Pathology*, 1999. **189**(1): p. 12-19.
38. Landry, J.J., P.T. Pyl, T. Rausch, T. Zichner, M.M. Tekkedil, A.M. Stutz, A. Jauch, R.S. Aiyar, G. Pau, N. Delhomme, J. Gagneur, J.O. Korbel, W. Huber, and L.M. Steinmetz, *The genomic and transcriptomic landscape of a HeLa cell line*. G3 (Bethesda), 2013. **3**(8): p. 1213-24.
39. Scherer, W.F., J.T. Syverton, and G.O. Gey, *Studies on the propagation in vitro of poliomyelitis viruses. IV. Viral multiplication in a stable strain of human malignant epithelial cells (strain HeLa) derived from an epidermoid carcinoma of the cervix*. *The Journal of experimental medicine*, 1953. **97**(5): p. 695-710.
40. Fairman, K. and B.S. Jacobson, *Unique morphology of HeLa cell attachment, spreading and detachment from microcarrier beads covalently coated with a specific and non-specific substratum*. *Tissue & cell*, 1983. **15**(2): p. 167-80.
41. ATCC. *HeLa (ATCC® CCL-2™) general information*. 2014 [Zugriff am 5. Februar 2015]; Available from: <http://www.lgcstandards-atcc.org/Products/All/CCL-2.aspx#generalinformation>.
42. ATCC. *ATCC® CCL-2 : Morphology 2009* [Zugriff am 13. Februar 2015]; Available from: http://atcc.custhelp.com/app/answers/detail/a_id/442/~atcc%C2%AE-ccl-2-%3A-morphology.
43. ATCC. *HeLa Zellen bei niedriger Zelldichte (links) und bei hoher Zelldichte (rechts) (ATCC Collection, 2014)*. 2014 [Zugriff am 13. Februar 2015]; Available from: <https://www.lgcstandards-atcc.org/~media/Attachments/E/7/3/C/1765.ashx>.
44. Mosmann, T., *Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays*. *Journal of immunological methods*, 1983. **65**(1-2): p. 55-63.

45. Müller-Esterl, W., *Biochemie eine Einführung für Mediziner und Naturwissenschaftler*. 2. Aufl. ed, ed. U. Brandt. 2011, Heidelberg: Spektrum, Akad. Verl. XX, 738 S.
46. eBioscience. *Avidin HRP*. [Zugriff am 21. April 2015]; Available from: <http://www.ebioscience.com/avidin-hrp.htm>.
47. eBioscience. *m-IL 6 Biotin conjugated*. [Zugriff am 21. April 2015]; Available from: <http://www.ebioscience.com/mouse-il-6-ready-set-go-elisa.htm>.
48. Tremblay, P., M. Houde, N. Arbour, D. Rochefort, S. Masure, R. Mandeville, G. Opendakker, and D. Oth, *Differential effects of PKC inhibitors on gelatinase B and interleukin 6 production in the mouse macrophage*. *Cytokine*, 1995. **7**(2): p. 130-6.

Curriculum Vitae

Constanze Victoria Richter

Geburtsdatum: 14. Juli 1984
Geburtsort: Essen, Deutschland
Staatsbürgerschaft: deutsch
Familienstand: ledig

Ausbildung:

1991 – 1995 St. Franziskus Schule, Düsseldorf
1995 – 2004 Städtisches Görres-Gymnasium, Düsseldorf
09/2004 – 03/2007 Ausbildung Pharmazeutisch-technische Assistentin, Solingen
2007 – 2009 Pharmazie Studium, Ernst-Moritz-Arndt Universität Greifswald
2009 – 2010 Pharmazie Studium, Universität Regensburg
2010 – 2015 Diplomstudium Pharmazie Universität Wien
05/2014 – 12/2014 Diplomarbeit am Department für Pharmazeutische Technologie und Biopharmazie

Berufserfahrung:

2006 – 2007 Halbjährliche praktische Ausbildung Elch Apotheke, Neuss

Ferialpraktika als Pharmazeutisch-technische Assistentin:

2007 – 2010 Galerie Apotheke, Düsseldorf
2009 Wiesen Apotheke, Krefeld,
2010 – 2015 Jägerhof Apotheke, Düsseldorf