

# UNIVERSITÄTSKLINIKUM HAMBURG-EPPENDORF

Institut für Experimentelle Pharmakologie und Toxikologie des Zentrums für Experimentelle  
Medizin

Direktor: Prof. Dr. T. Eschenhagen

## **Die Wirkung von *Morinda citrifolia* L. (Noni) Fruchtsaft auf die Bildung der Entzündungsmediatoren PGE<sub>2</sub>, TXB<sub>2</sub> und LTB<sub>4</sub>**

### **Dissertation**

zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin  
an der Medizinischen Fakultät der Universität Hamburg

vorgelegt von:

Basem Samir Hasan Hamzeh  
geb. in Quedlinburg

Hamburg 2015

**Angenommen von der  
Medizinischen Fakultät der Universität Hamburg am: 29.06.2016**

**Veröffentlicht mit Genehmigung der  
Medizinischen Fakultät der Universität Hamburg.**

**Prüfungsausschuss, der/die Vorsitzende:** Prof. Dr. J. Westendorf

**Prüfungsausschuss, zweite/r Gutachter/in:** Prof. Dr. R. Böger

„Nur wer seinen eigenen Weg geht, kann von niemandem überholt werden.“

Marlon Brando



# Inhaltsverzeichnis

<b>I Einleitung</b> .....	<b>1</b>
<b>1. Entzündung</b> .....	<b>1</b>
1.1. Allgemein.....	1
1.2. Effektorzellen.....	2
1.3. Entzündungsmediatoren (Mediatoren).....	4
1.3.1. Eikosanoide .....	4
1.3.1.1. Arachidonsäure als Ausgangssubstrat für die Biosynthese der Entzündungsmediatoren .....	6
1.3.1.2. Arachidonsäure-Metabolisierung über die PGH-Synthase .....	9
1.3.1.2.1. Produktion von PGE <sub>2</sub> .....	10
1.3.1.2.2. Produktion von TXB <sub>2</sub> .....	11
1.3.1.3. Arachidonsäure-Metabolisierung über die 5-Lipoxygenase .....	11
1.3.1.3.1. Produktion von LTB <sub>4</sub> .....	12
1.4. Entzündungen experimentell erzeugen und hemmen .....	13
1.4.1. Entzündungshemmer bezogen auf die AA-Kaskade.....	13
<b>2. Noni (<i>Morinda citrifolia</i> L.)</b> .....	<b>15</b>
2.1. Allgemein.....	15
2.2. Inhaltsstoffe.....	17
2.3. Von traditionellen Anwendungen zu heutigen Verwendungen .....	20
2.4. Entzündungshemmung durch die Nonifrukt .....	21
2.5. Entzündungshemmung durch Iridoide .....	23
<b>3. Fragestellung der Arbeit</b> .....	<b>24</b>
3.1. Die Wahl der Quantifizierungsmethode .....	26
<b>II Material und Methoden</b> .....	<b>27</b>
<b>1. Material</b> .....	<b>27</b>
1.1. Chemikalien .....	27
1.2. Verbrauchsmaterialien .....	28
1.3. Geräte .....	28
1.4. Testmaterialien.....	28
1.5. Stimulatoren .....	29
1.6. Lösungen.....	29
<b>2. Methoden</b> .....	<b>31</b>

2.1. Quantifizierung von Entzündungsmediatoren mittels ELISA .....	31
2.1.1. Vorversuche für ein funktionierendes Blutauflbereitungssystem .....	31
2.1.2. Aufbereitung des humanen Vollbluts: Pilotstudie-1 .....	32
2.1.3. Aufbereitung des humanen Vollbluts: Pilotstudie-2 .....	33
2.1.4. In vitro Exposition von humanem Vollblut mit Iridoiden und DTA .....	35
2.1.5. Durchführung und Messung des kompetitiven Cayman ELISAs für PGE <sub>2</sub> TXB <sub>2</sub> und LTB <sub>4</sub> .....	35
2.1.6. Durchführung und Messung des US Biological Sandwich-ELISAs für TNF- $\alpha$ .....	38
<b>III Ergebnisse .....</b>	<b>40</b>
<b>1. Vorversuche - Grundgerüstparameter .....</b>	<b>40</b>
1.1. K0-Zeitkurven bezogen auf PGE <sub>2</sub> -, TXB <sub>2</sub> - und LTB <sub>4</sub> -Konzentration .....	42
1.2. Stimulation der Entzündungsmediatoren PGE <sub>2</sub> , TXB <sub>2</sub> , LTB <sub>4</sub> und TNF- $\alpha$ durch LPS oder CaIP .....	44
1.2.1. Stimulation von PGE <sub>2</sub> durch LPS .....	45
1.2.2. Stimulation von TXB <sub>2</sub> durch LPS.....	46
1.2.3. Stimulation von LTB <sub>4</sub> durch CaIP .....	47
1.2.4. Stimulation von TNF- $\alpha$ durch LPS .....	49
1.2.5. Zusammenfassung der Stimulationsversuche .....	50
1.3. Hemmung der PGE <sub>2</sub> -, TXB <sub>2</sub> - und LTB <sub>4</sub> -Freisetzung aus Vollblut durch Indomethacin oder Zileuton.....	51
1.3.1. Hemmung der PGE <sub>2</sub> -Konzentration durch Indomethacin.....	51
1.3.2. Hemmung der TXB <sub>2</sub> -Konzentration durch Indomethacin .....	52
1.3.3. Hemmung der LTB <sub>4</sub> Konzentration durch Zileuton .....	53
1.3.4. Zusammenfassungen der Hemmstoff-Versuche .....	55
1.4. Bestimmung von PGE <sub>2</sub> -Standardkonzentrationen unter den Bedingungen des komplet- ten Assays .....	55
<b>2. Ergebnisse der zu quantifizierenden ELISA Tests.....</b>	<b>57</b>
2.1. <i>Ex vivo - in vitro</i> Pilotstudie-1: Untersuchung der Konzentrationen der Entzündungs- mediatoren vor und nach Nonisafteinnahme .....	57
2.1.1. Messung der PGE <sub>2</sub> -Konzentration vor und nach Nonisafteinnahme.....	57
2.1.2. Messung der TXB <sub>2</sub> -Konzentration vor und nach Nonisafteinnahme .....	58
2.1.3. Messung der LTB <sub>4</sub> -Konzentration vor und nach Nonisafteinnahme.....	59
2.1.4. Die Entzündungsmediatoren PGE <sub>2</sub> , TXB <sub>2</sub> und LTB <sub>4</sub> im Vergleich .....	59

2.2. <i>Ex vivo</i> - <i>in vitro</i> Pilotstudie-2: Untersuchung der Konzentrationen der Entzündungsmediatoren vor und nach Nonisafteinnahme .....	63
2.2.1. Messung der PGE <sub>2</sub> -Konzentration vor und nach Nonisafteinnahme.....	63
2.2.2. Messung der TXB <sub>2</sub> -Konzentration vor und nach Nonisafteinnahme .....	65
2.2.3. Messung der LTB <sub>4</sub> -Konzentration vor und nach Nonisafteinnahme.....	66
2.2.4. Messung der TNF- $\alpha$ -Konzentration vor und nach Nonisafteinnahme.....	67
2.2.5. Die Entzündungsmediatoren PGE <sub>2</sub> , TXB <sub>2</sub> , LTB <sub>4</sub> und TNF- $\alpha$ im Vergleich.....	68
2.3. Untersuchung der Entzündungsmediatorkonzentrationen im Vollblut, bei <i>in vitro</i> Vorbehandlung mit DAA, Geniposid, Genipin oder DTA .....	72
2.3.1. Messung der PGE <sub>2</sub> -Konzentration.....	72
2.3.2. Messung der TXB <sub>2</sub> -Konzentration.....	73
2.3.3. Messung der LTB <sub>4</sub> -Konzentration .....	74
2.3.4. Zusammenfassende Betrachtung der Wirkung von isolierten Nonibestandteilen auf den Arachidonsäuremetabolismus <i>in vitro</i> .....	75
2.3.4.1. Konzentrationsveränderungen durch DAA .....	76
2.3.4.2. Konzentrationsveränderungen durch Geniposid .....	76
2.3.4.3. Konzentrationsveränderungen durch Genipin.....	76
2.3.4.4. Konzentrationsveränderungen durch DTA.....	76
<b>IV Diskussion.....</b>	<b>78</b>
<b>V Zusammenfassung.....</b>	<b>88</b>
<b>VI Summary .....</b>	<b>90</b>
<b>VII Abkürzungsverzeichnis .....</b>	<b>92</b>
<b>VIII Abbildungsverzeichnis .....</b>	<b>94</b>
<b>IX Tabellenverzeichnis .....</b>	<b>96</b>
<b>X Literaturverzeichnis .....</b>	<b>97</b>
<b>XI Lebenslauf .....</b>	<b>105</b>
<b>XII Danksagung .....</b>	<b>106</b>
<b>XIII Eidesstattliche Versicherung.....</b>	<b>107</b>



# **I Einleitung**

## **1. Entzündung**

### **1.1. Allgemein**

Eine Entzündung ist physiologisch betrachtet ein Schutzmechanismus des Körpers. Es ist ein Signal zur Reparatur und dient der Bekämpfung und Verhinderung größerer Schäden.<sup>[1,p.6]</sup> Entzündungen können stark oder schwach, selten oder häufig in Erscheinung treten, man wird jedoch zeitlebens mit ihnen konfrontiert, da sie auch bei alltäglichen Umbauprozessen und Abwehrmechanismen entstehen.

Neben dem Schutzfaktor als Warn- und Effektor System können Entzündungen auch pathologisch schwer und chronisch verlaufen.

Klinisch betrachtet ist die Entzündung ein Sammelbegriff, welcher das vielfältige Wechselspiel von Zellen und Entzündungsmediatoren umschreibt. Kardinalsymptome sind unter anderem eine erhöhte Durchblutung, verbunden mit einer Rötung (Rubor). Hinzu kommen brennende Schmerzen durch Erregung der Schmerzrezeptoren (Dolor) und Wärmeentstehung (Calor).<sup>[1, p. 6]</sup> Erhöhte Kapillarpermeabilitäten führen zu Schwellungen (Ödeme) und erhöhter Exsudation von Fibrin, Erythrozyten und Thrombozyten. Weitere Faktoren, die zur Entzündung gezählt werden, sind Funktionseinschränkungen (Funktio laesa), Gerüche (Odor) sowie lokale Reaktionen wie Einwanderung von Leukozyten in das Gewebe, Fibroblastenproliferation am Ort der Entzündung sowie in Nachbarschaft, aber auch allgemeine Entzündungsreaktionen wie Fieber und Kreislauf-Versagen.

Entzündungen manifestieren sich in einer Vielzahl unterschiedlicher klinischer Erscheinungsformen und ebenso viele biochemische Mechanismen liegen ihnen zugrunde.

## 1.2. Effektorzellen

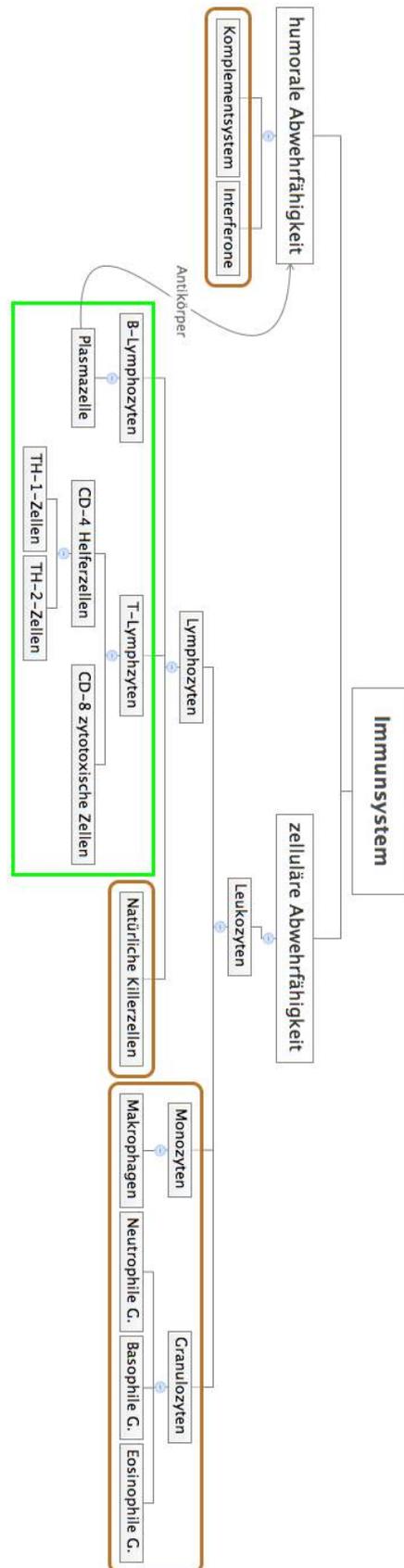
Das Immunsystem ist ein komplexes Konstrukt aus angeborenen/unspezifischen und erworbenen/spezifischen Abwehrfähigkeiten. Es umfasst physikalische, chemische, zelluläre und humorale Abwehrmechanismen, welche ubiquitär im menschlichen Körper verankert sind.

Zu den Effektorzellen, die im Rahmen dieser Arbeit von Bedeutung sind, gehören die ausdifferenzierten Lymphozyten wie B- und T-Zellen sowie die Monozyten und Makrophagen. Sie alle gehören zur großen Familie der kernhaltigen hämoglobinlosen Zellen, den Leukozyten. Sie lassen sich morphologisch grob in Granulozyten, Lymphozyten und Monozyten unterteilen und haben unterschiedliche Aufgaben im komplexen System (s. Abb. 1).

Die neutrophilen Granulozyten zum Beispiel, sind im Besitz eines Formylpeptid-Rezeptors, welcher bakterielle Peptide erkennt und somit Bakterien auffinden kann. Aufgabe der neutrophilen Granulozyten als Phagozyten ist, Mikroorganismen aufzunehmen und abzutöten. Dazu nutzen sie einen Scavenger-Rezeptor um *pathogen-associated molecular patterns* (PAMPs) zu erkennen.<sup>[2,p. 700]</sup>

Die Lymphozyten umfassen 30% aller Leukozyten, sind dem adaptiven Immunsystem zugeordnet und besitzen unterschiedliche Fähigkeiten zur spezifischen Antigenerkennung. B-Lymphozyten gehören zum humoral-adaptiven Immunsystem und sezernieren nach ihrer Differenzierung zur Plasmazelle Antikörper. T-Lymphozyten sind dem zellvermittelten-adaptiven Immunsystem zugehörig. Sie umfassen zytotoxische CD-8 positive T-Zellen sowie CD-4 positive T-Helferzellen-1 und -2 (TH-1, TH-2), welche als zentrale Schaltstelle fungieren.

Hauptsächlich sind in dieser Arbeit die Makrophagen von Interesse, da sie unter anderem direkt über sogenannte PAMPs, wie zum Beispiel Lipopolysaccharide (LPS) aktiviert werden können. Die Monozyten/Makrophagen haben als antigenpräsentierende Zellen (APZ), Phagozyten und Zytokinproduzenten eine zentrale Bedeutung in der Pathophysiologie der Entzündungen. Sie sind unerlässlich für die adaptive Immunantwort als Hilfszellen der B- und T-Lymphozyten und werden zugleich dem angeborenen Immunsystem zugeschrieben.



**Abb. 1 Der humorale und zelluläre Anteil des Immunsystems im Überblick**

Der angeborene/unspezifische Anteil ist braun umrahmt, der erworbene(adaptive)/spezifische Anteil ist grün umrahmt.

### 1.3. Entzündungsmediatoren (Mediatoren)

Mediatoren sind körpereigene Substanzen und gehören zu den Plasmaproteinen und Gewebshormonen. Es sind lösliche Signalstoffe, die dem Immunsystem neben rezeptorvermittelter Übertragung als Kommunikationsmittel zwischen Zellen und Geweben dienen. Sie werden unter anderem lokal vom Parenchym, von Epithelzellen sowie von Effektorzellen produziert. Die Entzündungsmediatoren wirken in geringen Konzentrationen vorrangig am Produktionsort (autokrin) und im lokalen Umfeld (parakrin). Systemisch übers Blut verteilt (endokrin) wirken sie erst bei einer erhöht vorliegenden Konzentration. Zumeist fördern sie eine oder mehrere Komponenten der Entzündung.

Die meisten Mediatoren sind Zytokine. Es sind überwiegend parakrine oder autokrine Signalmoleküle, welche neben Effektorfunktionen für die Differenzierungs- und Wachstumsprozesse zuständig sind. Sie umfassen eine heterogene Gruppe von Steuer- und Kommunikationsproteinen, welche in fünf Mediatoruntergruppen unterteilt werden können: Interferone (IFN), Interleukine (IL), Tumornekrosefaktoren (TNF), Chemokine sowie hämatopoetische Wachstumsfaktoren, sogenannte *colony stimulating factors* (CSF).<sup>[1, p. 19]</sup>

Dabei sind IL-1 $\beta$ , IL-6 und TNF- $\alpha$  die wichtigsten Entzündungsmediatoren aus dieser Gruppe. Sie werden vor allem bei lokalen Entzündungsreaktionen von Makrophagen produziert und rufen systemische Effekte hervor. Zielorgane dieser Zytokine sind unter anderem der Hypothalamus, die Leber, das Knochenmark und die Blutgefäße. Dies führt zu Fieber, vermehrter Bildung von Akute-Phase-Proteinen und Leukozyten sowie zu einer vermehrten lokalen Durchblutung bis hin zu Kreislaufversagen, bedingt durch kapillare Lecks.<sup>[2, p. 729]</sup>

Neben der großen Gruppe der Zytokine gibt es als weitere Hauptgruppen der Entzündungsmediatoren die biogenen Amine (Histamin, Serotonin), das Kallikrein-Kininsystem, das Komplementsystem und die lipogenen Mediatoren (Eikosanoide, Plättchen aktivierender Faktor).<sup>[1, p. 19]</sup>

Die Eikosanoide sind ein Bestandteil dieser Arbeit und werden im Folgenden genauer betrachtet.

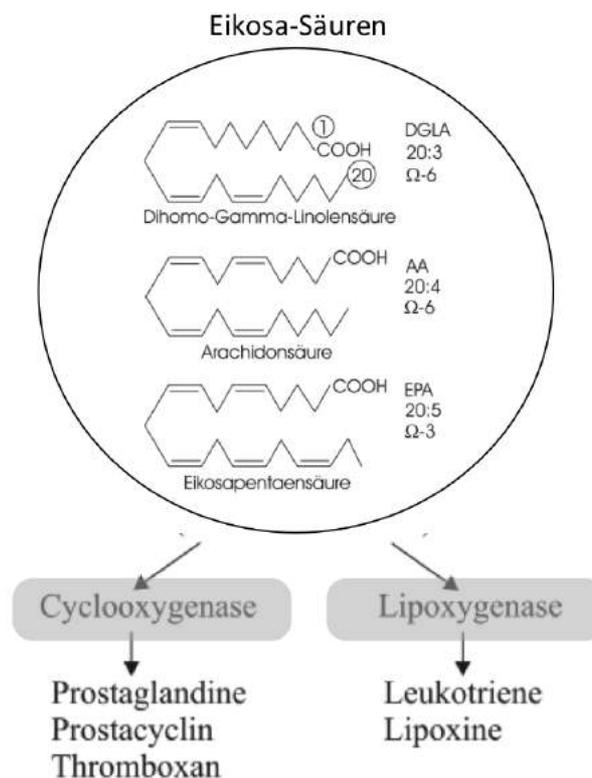
#### 1.3.1. Eikosanoide

Eikosanoide sind lipogene, zytogene Entzündungsmediatoren, welche aufgrund der geringen Konzentration im Zellstoffwechsel ( $10^{-10}$  bis  $10^{-8}$  mol/l) zu den Gewebshormonen zählen. Sie werden in Prostanoiden, bestehend aus Prostaglandinen, Prostazyklinen und Thromboxan sowie Leukotrienen unterteilt, die durch zwei verschiedene Enzymsysteme entstehen.

Eikosanoide, deren Name sich vom griechischen Wort „εικοσ“ (zwanzig) ableitet, sind Derivate mehrfach ungesättigter C<sub>20</sub>-Fettsäuren (Eikosa-Säuren), sogenannten *poly-unsaturated fatty acids* (PUFAs).<sup>[1, p. 34]</sup> Abhängig vom Ausgangssubstrat können unterschiedliche Eikosanoide gebildet werden. Als mögliche Ausgangssubstrate können folgende C<sub>20</sub>-Fettsäuren in Betracht gezogen werden (s. Abb. 2)<sup>[1, p. 35]</sup>:

- Dihomogammalinolensäure {*dihomo gamma linolenic acid*} DGLA 20:3 Omega-6
- Arachidonsäure = Eikosatetraensäure {*arachidonic acid*} AA 20:4 Omega-6
- Eikosapentaensäure {*eicosapentaenoic acid*} EPA 20:5 Omega-3

Mengenmäßig betrachtet entstehen die meisten Eikosanoide aus der AA. Sie sind ein wesentlicher Bestandteil von Überempfindlichkeits- und Entzündungsreaktionen. Sie zerfallen *in vivo* nach ca. 30 sec und werden immer *de novo* synthetisiert und nicht vesikulär gespeichert.<sup>[3]</sup> Ihre Wirkung ist abhängig von membranständigen Rezeptoren.



**Abb. 2** Schematische Darstellung der Metabolisierung von Eikosa-Säuren  
Basierend auf [1, p. 34/35]. Die Enzyme sind grau hinterlegt.

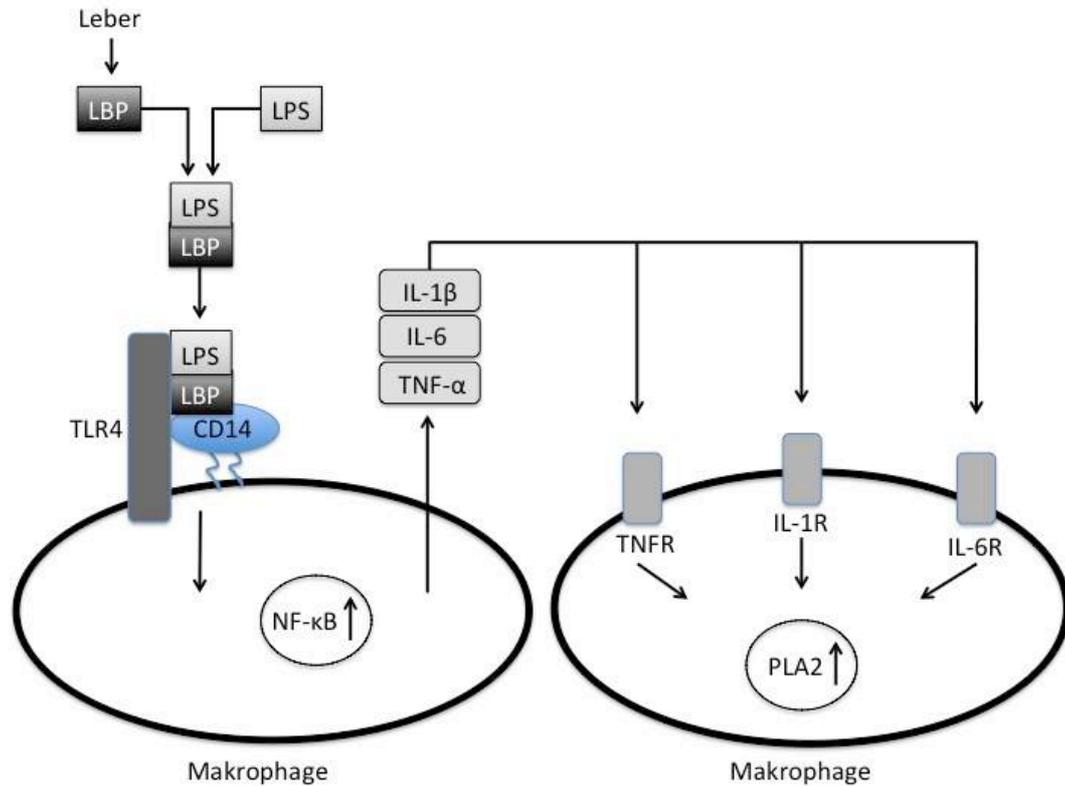
### 1.3.1.1. Arachidonsäure als Ausgangssubstrat für die Biosynthese der Entzündungsmediatoren

Diese Arbeit befasst sich vorrangig mit Prostaglandin E<sub>2</sub> (PGE<sub>2</sub>), Thromboxan B<sub>2</sub> (TXB<sub>2</sub>) und Leukotrien B<sub>4</sub> (LTB<sub>4</sub>), allesamt Derivate der Arachidonsäure (AA). Der Trivialname AA, unter dem chemischen Namen  $\Delta$ -5,8,11,14-Eicosatetraensäure (C<sub>20</sub>H<sub>32</sub>O<sub>2</sub>) bekannt, ist eine vierfach ungesättigte aber nicht essentielle C<sub>20</sub>-Fettsäure. Die AA kann durch Kettenverlängerung entstehen, benötigt aber als Grundbaustein die essentielle Fettsäure  $\Delta$ -9,12-Octadecadiensäure (C<sub>18</sub>H<sub>32</sub>O<sub>2</sub>), bekannt unter dem Trivialnamen Linolsäure.<sup>[4, p. 418]</sup>

Die AA ist vorrangig in Fischölen und Phosphoglyceriden zu finden. Sie ist über die OH-Gruppe des C<sub>2</sub>-Glycerinanteils mit membranständigen Phospholipiden, wie z.B. Phosphatidyl-Cholin, Phosphatidyl-Serin oder Phosphatidyl-Inositol verestert.<sup>[1, p. 36]</sup>

Auslöser für die Freisetzung der AA sind vor allem Mikroorganismen, Viren, Fremdkörper, Allergien oder Gewebeerstörungen. Durch Aktivierung des Komplementsystems oder durch Erkennen von PAMPs, wie zum Beispiel LPS als Bestandteil der äußeren Schicht gramnegativer Bakterien, werden Entzündungsmediatoren wie TNF-alpha, IL-1 und IL-6 freigesetzt (s. Abb. 3).<sup>[2, p. 699-700] [4, p. 799]</sup>

Durch diese entzündungsauslösenden Noxen oder dem intrazellulären Anstieg der Ca<sup>2+</sup>-Konzentration wird die im Zytosol inaktiv vorliegende Phospholipase A<sub>2</sub> (PLA<sub>2</sub>) zur Zellmembran geleitet und damit aktiviert (s. Abb. 3). PLA<sub>2</sub>, welche nahezu in allen Zellen vorkommt und frei im Zytosol vorliegt, spaltet die AA vom Membranphospholipid ab. Als Ausgangssubstrat wird es über unterschiedliche Enzymsysteme für die Produktion der entsprechenden Entzündungsmediatoren, oxygenierte Metabolite der AA, verwendet. Als Rest vorliegende Lysophospholipide werden in Plättchen-aktivierende-Faktoren (PAF) umgewandelt, welche ihren Beitrag im Rahmen des Entzündungsgeschehens leisten (s. Abb. 4).<sup>[1, p. 36]</sup>



**Abb. 3 Übersicht der PLA<sub>2</sub>-Aktivierung**

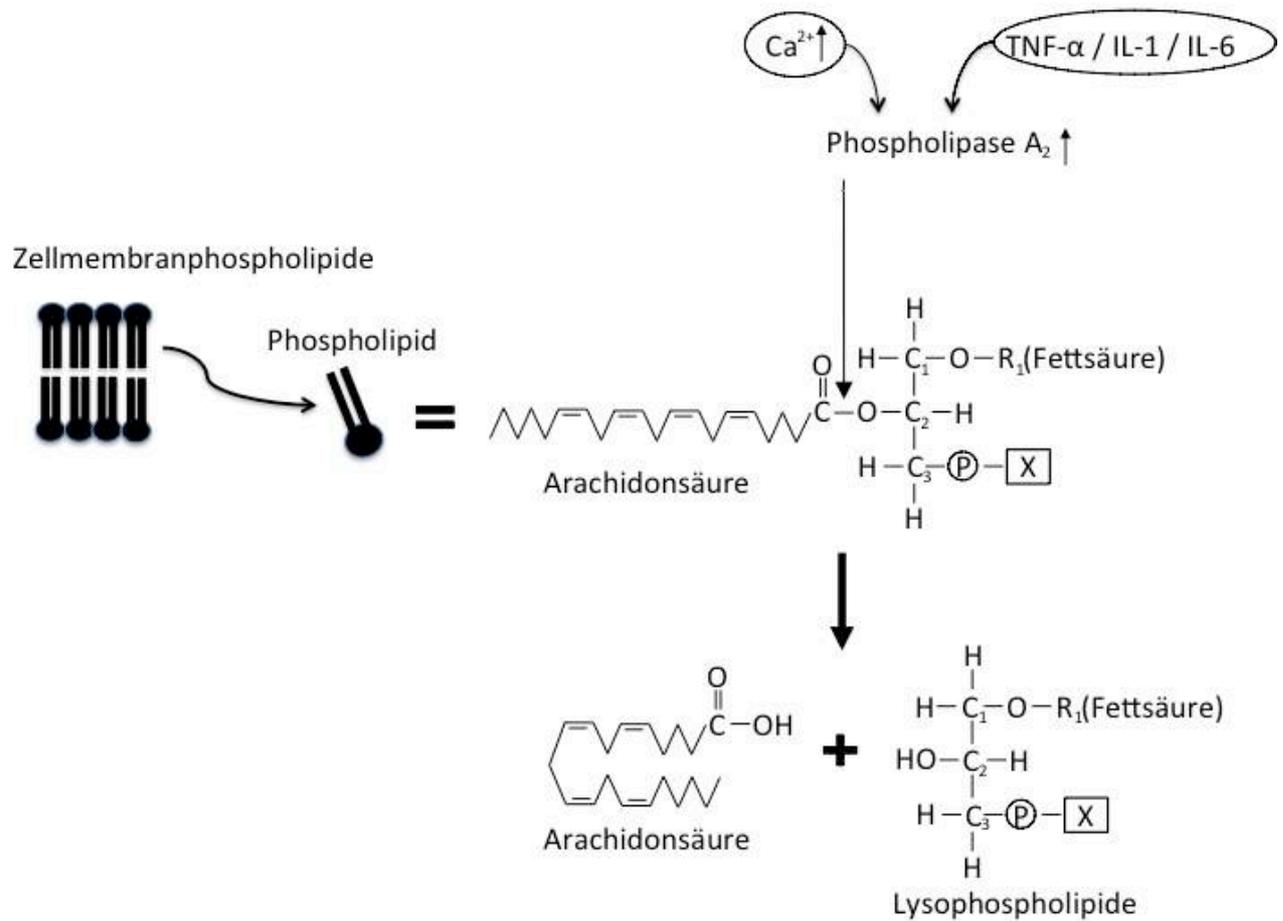
Bakterielle Antigene (LPS) als eine Form entzündungsauslösender Noxen, wirken durch Komplexbildung mit LBP als Ligand.

Bindung des Lipid A-Anteils des LPS an TLR4-Rezeptoren, vorzufinden an menschlichen CD-14 markierten Abwehrzellen, vorrangig Makrophagen und neutrophile Granulozyten.

Es führt zu einer Hochregulation des Transkriptionsfaktors NF-κB, wodurch die inflammatorischen Zytokine TNF-α, IL-1β, und IL-6 ausgeschüttet werden. In diesem Fall wirken sie parakrin, aktivierend auf die Phospholipase A<sub>2</sub>.

LPS = Lipopolysaccharid; LBP = LPS-Bindeprotein; TLR-4 = toll like receptor-4;

IL = Interleukin; PLA<sub>2</sub> = Phospholipase A<sub>2</sub>; TNF = tumor necrosis factor; NF-κB = nuclear factor -„kappa-light-chain-enhancer“.



#### Abb. 4 Hydrolytische Spaltung

Es wird AA und Lysophospholipid in äquimolarer Menge freigesetzt. Die Hydrolyse der Esterbindung am zweiten C-Atom ( $\beta$ -C-Atom) des Glycerins erfolgt durch Aktivierung und Anbindung der PLA<sub>2</sub>.

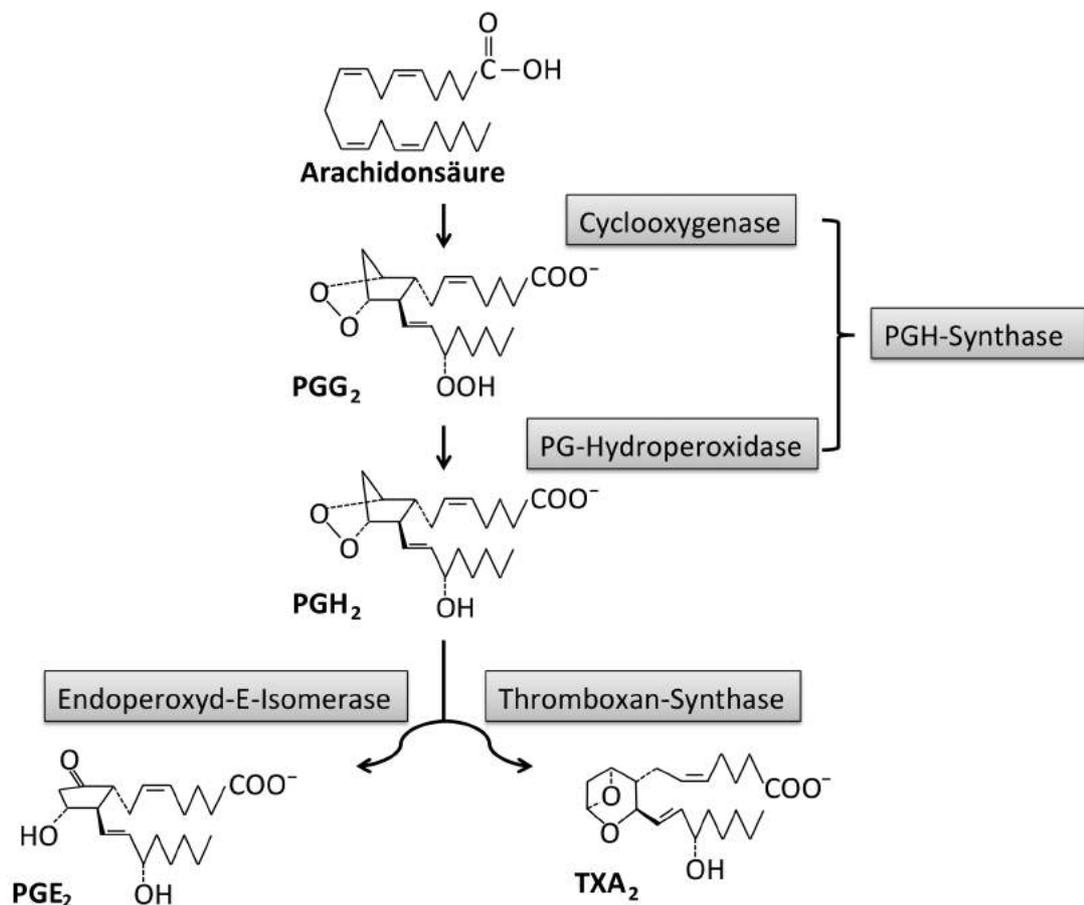
**X** = steht für Cholin, Ethanolamin oder Serin.

### 1.3.1.2. Arachidonsäure-Metabolisierung über die PGH-Synthase

Die PGH-Synthase ist ein bifunktionales Enzym, genannt Cyclooxygenase, welches neben einer Cyclooxygenaseaktivität eine Peroxidaseaktivität aufweist (s. Abb. 5).

Die Cyclooxygenase ist ein an das Endoplasmatische Retikulum gebundenes Enzym, welches als zyklische Endoperoxidase in einer sauerstoffabhängigen ersten Reaktion die aus dem Zytosol vorliegende AA in Prostaglandin  $G_2$  ( $PGG_2$ ) umwandelt.<sup>[5, p. 20]</sup> Der entstandene Cyclopentanring entsteht durch Sättigung zweier Doppelbindungen, wodurch ab  $PGG_2$  in der Nomenklatur fortlaufend die Zahl 2 auftritt.

Nach anschließender Reduktion der 15-Hydroperoxylgruppe zur 15-Hydroxylgruppe entsteht das Prostaglandin  $H_2$  ( $PGH_2$ ), mit Hilfe der Peroxidase. Ausgehend von  $PGH_2$  können  $PGE_2$  und  $TXB_2$  hergestellt werden.<sup>[4 p. 420]</sup>



**Abb. 5 Biosynthese der Eikosanoide  $PGE_2$  und  $TXB_2$  aus der Arachidonsäure**

Mit Hilfe von spezifischen Synthasen wird die Muttersubstanz  $PGH_2$  in die Entzündungsmediatoren  $TXA_2$  und  $PGE_2$  umgewandelt.  $TXA_2$  ist sehr instabil, hat eine Halbwertszeit von nur 30 sec und wird daher in physiologischer Umgebung zum stabilen  $TXB_2$  umgewandelt.

### 1.3.1.2.1. Produktion von PGE<sub>2</sub>

Bei der Synthese der Prostaglandine aus AA sind Prostaglandin H-Synthasen (PGHS) die geschwindigkeitsbestimmenden Enzyme, darunter gibt es zwei Isoenzyme (PGHS-1 und PGHS-2). Beide enthalten jeweils eine unterschiedliche Cyclooxygenase, entsprechend COX-1 und COX-2 benannt, und sind zu gleichen Teilen in der Kernmembran und am endoplasmatischen Retikulum verankert.<sup>[6]</sup> Die Aktivierung der COX-1 wird vorrangig durch einen physiologischen Stimulus induziert und weist in der Regel im gesunden Gewebe einen physiologischen Effekt auf. Das Enzym setzt durchgehend AA um.

Die COX-2 wird sowohl bei physiologischen Adaptionsvorgängen als auch bei Entzündungsreizen exprimiert. COX-2 setzt nur in manchen Organregionen konstitutiv AA-Produkte frei, wie z.B. in der Niere oder im ZNS. In anderen Regionen wird die Expression von COX-2 nur in Anwesenheit von Wachstumshormonen und Entzündungsmediatoren, wie z.B. IL-1, IFN- $\gamma$  und TNF- $\alpha$ , induziert.<sup>[5, p. 22]</sup>

Abhängig von unterschiedlichen Rezeptoren variiert die Wirkungsweise der PGE<sub>2</sub>. Bisher sind vier Subtypen (EP-1, -2, -3 und -4) als Zelloberflächenrezeptoren bekannt, welche über sieben Transmembrandomänen am großen heterotrimeren G-Protein gekoppelt vorliegen.<sup>[7]</sup>

Betrachtet man z.B. ausschließlich den Rezeptor EP-2 an den Gefäßen, so bewirkt dieser durch Gefäßerweiterung eine Durchblutungssteigerung. Durch Stimulierung der Adenylatzyklase steigt der cAMP-Gehalt, wodurch die Proteinkinase A aktiviert wird<sup>[7]</sup>, welche das Enzym Myosin-Leichte-Ketten-Phosphatase in den glatten Muskelzellen aktiviert. Durch Dephosphorylierung der leichten Kette des Myosins wird die glatte Gefäßmuskulatur relaxiert. Des Weiteren wird die Kapillarpermeabilität erhöht. Dies führt zu Erniedrigung des Blutdrucks sowie einem erhöhten Blutfluss durch die Niere, was wiederum zu einer gesteigerten Diurese führt.<sup>[2, p. 631]</sup> Durch erweitert vorliegende Gefäße werden zusätzlich Mediatoren schneller transportiert, durch zunehmende Permeabilität die Schmerzempfindlichkeit erhöht sowie Ödembildungen gefördert. Weitere physiologische und pathologische Beiträge des Entzündungsmediators PGE<sub>2</sub> konnten durch Versuche mit transgenen Mäusen, welchen entsprechende Cyclooxygenasen fehlten, besser der COX-1 und COX-2 zugeteilt werden.<sup>[5, p. 23]</sup>

### 1.3.1.2.2. Produktion von TXB<sub>2</sub>

Die Synthese des Thromboxan B<sub>2</sub> aus AA entspricht dem o.g. Verlauf der Prostaglandin-E<sub>2</sub>-Synthese mit dem Unterschied, dass sie lediglich über COX-1 läuft (s. Abb. 5).

Gebildet wird TXB<sub>2</sub> vorrangig von Thrombozyten und geschädigtem Gefäßendothel. Über das Zwischenprodukt PGH<sub>2</sub> entsteht über die Thromboxansynthase zunächst der biologisch aktive Metabolit TXA<sub>2</sub>. Dessen Wirkung umfasst vorrangig blutstillende Faktoren, wie z.B. Vasokonstriktion, Förderung der Thrombozytenaggregation sowie die Entleerung der Thrombozytengranula.<sup>[2, p. 631]</sup> Des Weiteren sind chemotaktische Wirkungen wahrscheinlich.

TXA<sub>2</sub> ist sehr instabil, hat eine Halbwertszeit von nur 30 sec und wird daher in physiologischer Umgebung zum stabilen TXB<sub>2</sub> umgewandelt.<sup>[1, p. 43]</sup>

### 1.3.1.3. Arachidonsäure-Metabolisierung über die 5-Lipoxygenase

Es gibt unterschiedliche Typen von Lipoxygenasen (5-, 12-, 15-LOX). Die Nomenklatur orientiert sich an dem numerischen C-Atom, welches von der LOX angegriffen wird. Von Interesse in dieser Arbeit ist die 5-LOX, welche in erster Linie aus der AA den Metaboliten LTB<sub>4</sub> produziert. Sie liegt inaktiv im Zytosol vor. Sie wird wie die PLA<sub>2</sub> durch Membranbindung aktiviert, benötigt jedoch zusätzlich das 5-Lipoxygenase aktivierende Protein (FLAP).<sup>[9]</sup> Nach der Aktivierung erfolgt durch Anlagerung von Sauerstoff eine Hydroperoxydstruktur am C<sub>5</sub>-Atom. Es entsteht 5-Hydroperoxyeikosatetraensäure (5-HPETE), der erste Metabolit, welcher ein Epoxid ist (s. Abb. 6).<sup>[1, p. 57]</sup> Durch Umlagerungen der Doppelbindungen zu drei konjugierten Doppelbindungen entsteht das biologisch inaktive Leukotrien A<sub>4</sub> (LTA<sub>4</sub>). LTA<sub>4</sub> ist Ausgangsprodukt für weitere Leukotriene und kann mithilfe der Leukotrien A<sub>4</sub>-Hydrolase zu LTB<sub>4</sub> umgewandelt werden.<sup>[4, p. 422]</sup> Die AA wird bei der Metabolisierung ohne die Anzahl der Doppelbindungen zu verändern über die 5-LOX metabolisiert, sodass alle Produkte ab LTA<sub>4</sub> in der Nomenklatur fortlaufend die Zahl 4 beibehalten.<sup>[2, p. 629]</sup>

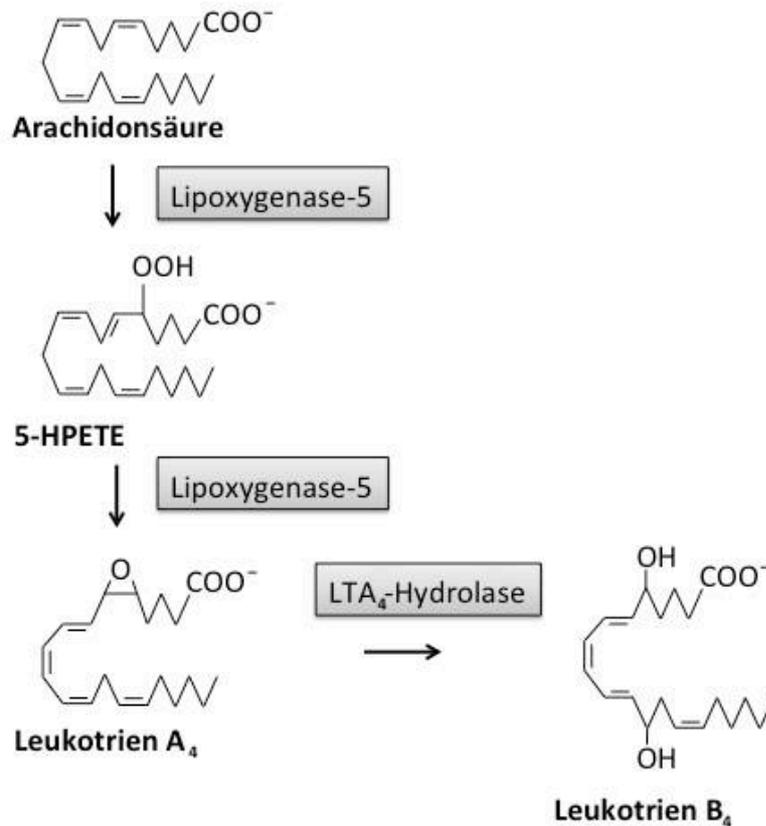


Abb. 6 Biosynthese des Leukotriens LTB<sub>4</sub> aus Arachidonsäure

#### 1.3.1.3.1. Produktion von LTB<sub>4</sub>

LTB<sub>4</sub> ist eines der Leukotriene, welches 1983 von Samuelson entdeckt wurde.<sup>[8]</sup> Es wird vorrangig in neutrophilen-, eosinophilen- und basophilen Granulozyten sowie Monozyten, Makrophagen und Mastzellen gebildet, in geringem Maß auch in T-Lymphozyten.<sup>[2, p. 629]</sup>

LTB<sub>4</sub> ist ein wichtiger autokriner, parakriner Informationsübermittler, welcher als gezielter Verstärker der akuten lokalen Entzündung gilt. Leukotriene, insbesondere LTB<sub>4</sub>, sind an der Pathogenese entzündlicher Erkrankungen beteiligt. Sie regen konzentrationsabhängig die ungerichtete und gerichtete Migration, Phagozytose und Aggregatbildung an sowie die Abgabe von Granula und Mediatorstoffen. LTB<sub>4</sub> wirkt an erster Stelle chemotaktisch auf inflammatorische Zellen, wie Leukozyten. Ist die Konzentration zu stark, wirkt es selbstschädigend auf den Organismus und wird als mitverantwortlich für Asthmaanfälle, entzündliche Darmkrankungen und rheumatischer Arthritis angesehen.<sup>[10]</sup>

## 1.4. Entzündungen experimentell erzeugen und hemmen

Um entzündungshemmende Wirkungen zu ermitteln, müssen zunächst kontrollierte Entzündungen *in vivo* oder *in vitro* erzeugt werden.

Durch „Carrageenan“ Injektionen in Regionen, wie Ohr oder Hinterfüße bei Ratten können Ödeme *in vivo* erzeugt werden. Um Hemmungen zu ermitteln, wird zusätzlich intraperitoneal die entsprechende hemmende Substanz injiziert.<sup>[12]</sup>

Im Rahmen dieser Doktorarbeit wurde ausschließlich *in vitro* stimuliert. Durch Hinzufügen einzelner PAMPs wie LPS wird auf zellulärer Ebene eine Entzündung erzeugt. Substanzen wie Calcium-Ionophor (CaIP) durchlöchern die Zellmembran, wodurch ebenfalls eine Entzündungsreaktion in Gang gesetzt wird. Durch Hinzusetzen ausgewählter Entzündungshemmer vor der Stimulierung mit entzündungsfördernden Substanzen können Entzündungsreaktionen kontrolliert reduziert werden.

### 1.4.1. Entzündungshemmer bezogen auf die AA-Kaskade

Gegen Entzündungen werden Analgetika mit antiphlogistischer und antipyretischer Wirkung eingesetzt. Im Rahmen dieser Doktorarbeit werden zur Kontrolle ein COX-Hemmer und ein 5-LOX-Hemmer verwendet.

Indomethacin, ein Arylessigsäurederivat, gehört zu den antiphlogistischen Analgetika (s. Abb. 7). Als Teil der *non-steroidal anti-inflammatory drugs* (NSAID) ist es ein Cyclooxygenasehemmer, welcher die PGE<sub>2</sub> und TXB<sub>2</sub> Synthese inhibiert.<sup>[11]</sup>

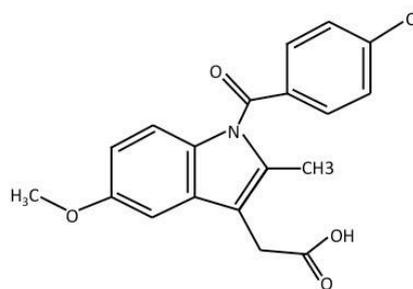
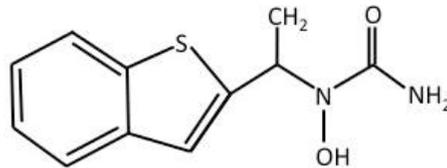


Abb. 7 Strukturformel von Indomethacin

Als 5-LOX Hemmer wird (RS)-1-(1-Benzothiophen-2-ylethyl)-1-hydroxyharnstoff (Zileuton) verwendet, um die LTB<sub>4</sub> Synthese zu inhibieren (s. Abb. 8). Es handelt sich dabei um einen Chelatbildner, welcher eine hohe Selektivität für die 5-LOX aufweist und in den USA zur Behandlung asthmatischer Erkrankungen eingesetzt wird (Zyflo®).<sup>[13]</sup>



**Abb. 8** Strukturformel von Zileuton

Heutzutage gewinnen in der sogenannten westlichen Bevölkerung in zunehmendem Maße traditionelle pflanzliche anti-inflammatorische Heilmittel an Stellenwert, entweder als klassischer Medikamentenersatz oder als begleitende Therapieform. Dabei ist die Phytomedizin, dicht gefolgt von der Bewegungstherapie, eine der am häufigsten verwendeten begleitenden Therapieformen.<sup>[14]</sup>

Das Interesse an Heilpflanzen wird zunehmend größer, was in den vergangenen 15 Jahren auch zu einer weltweiten Verbreitung eines Heilmittels der traditionellen polynesischen Medizin geführt hat. Es handelt sich dabei um die Nonipflanze (*Morinda citrifolia* L.), die von den polynesischen Völkern wahrscheinlich schon seit 3000 Jahren verwendet wird.<sup>[15]</sup>

## 2. Noni (*Morinda citrifolia* L.)

### 2.1. Allgemein

*Morinda citrifolia*, bekannt als Noni, gehört zur Familie der Rötengewächse (Rubiaceae). Es sind mindestens 64 weitere volkstümliche Namen für die Pflanze in Gebrauch. Teilweise orientiert sich der Name an ihrer Verwendung, wie z.B. „hog apple“ auf den Cayman Inseln oder an charakteristischen Eigenschaften der Frucht wie z.B. der käsige Geruch, „cheese fruit“ in Australien.<sup>[16] [17]</sup>

Noni ist eine Pflanze, deren Ursprungsort nicht genau bekannt ist, jedoch im südost-asiatischen Raum vermutet wird. Sie ist im tropischen Bereich rund um den Äquator zu finden, vor allem im Raum des pazifischen und indischen Ozeans.<sup>[17]</sup>

Noni dient unter anderem Vögeln als Nahrungsmittel, wodurch die Samen verbreitet werden. Eine weitere weit verbreitete Annahme ist, dass die Nonipflanze sich durch ihre schwimmfähigen, monatelang überlebenden Samen im Bereich des tropischen Gürtels ausbreiten konnte. Mit Beginn der Ausbreitung der polynesischen Völker über die pazifische Inselwelt wurde die Nonipflanze als sogenannte „canoe plant“ auf allen Reisen mitgeführt und an den neuen Siedlungsorten etabliert.<sup>[16]</sup>

Neben den natürlichen Verbreitungsprozessen lassen sich, aufgrund ähnlicher medizinischer Vorstellungen und Verwendungszwecke der Nonipflanze auf verschiedenen Inselgruppen, Rückschlüsse auf Siedlungsruten der heutigen Polynesier vor ca. 1400 Jahren schließen.<sup>[15] [18] [19]</sup>

*Morinda citrifolia* variiert im Erscheinungsbild abhängig von den Umgebungsbedingungen. Eine Nonipflanze dieser Arbeitsgruppe, importiert aus den Malediven, hatte ursprünglich lanzettförmige Blätter, welche nach einer gewissen Zeit in Hamburg oval wurden.<sup>[20]</sup> Neben unterschiedlichen Blatt- und Fruchtgrößen, kann sie als großer, immergrüner Strauch oder als Baum, bis zu 6 Meter hoch, vorkommen.<sup>[22]</sup> Die Blätter sind dunkelgrün, glänzend mit prominenten Blattadern. Sie können gerundet, elliptisch oder länglich vorkommen und weisen eine Länge von 20-40 cm sowie eine Breite von 15-30 cm auf (s. Abb. 9).<sup>[23]</sup> Die Blüten sind röhrenförmig, weiß und haben eiförmige bis kugelige Köpfe.<sup>[17]</sup> Die Früchte haben eine kugel- bis kartoffelartige Form und verändern je nach Reifegrad ihre Farbe, von grün (unreif), bis hellgelb/weiß (reif). Im reifen Zustand wird die Frucht weich und nimmt aufgrund gebildeter Oktansäure einen käsigen Geruch an.<sup>[22]</sup>

Die Nonipflanze kann auf sandigen Böden, Muschelkalkboden, in trockenen isolierten Umgebungen sowie auf fruchtbaren vulkanischen Böden, auch in höheren Lagen bis ca. 600 m, sehr schnell wachsen. Sie produziert ganzjährig Früchte und enthält eine hohe Anzahl an Samen.<sup>[19] [22]</sup>



*Abb. 9 Nonipflanzen im Labor (Ursprungsort Hawaii), sowie die Blüte und Frucht in unreifem Stadium*

## 2.2. Inhaltsstoffe

Die relativ nährstoffarme Nonifrukt enthält laut EFSA pro 100 g reines Fruchtpüree im Durchschnitt 91% Wasser, 7,2% Kohlenhydrate, 0,55% Proteine und 0,1% Lipide.<sup>[23]</sup>

In der reifen Frucht sind vor allem Fettsäuren in Form von Hexan- und Oktansäure vorhanden, welche sich durch einen käseartigen Geruch bemerkbar machen.

Des Weiteren finden sich wichtige essentielle Fettsäuren wie Linolensäure im Fruchtfleisch wieder. Neben diesen gibt es in der Nonifrukt Fettsäuren, wie z.B. 2E,4Z,7Z-Dekatriensäure (DTA) (s. Abb. 10).<sup>[24]</sup> Es ist eine C<sub>10</sub>-Fettsäure, welche in der Arbeitsgruppe erstmals isoliert und identifiziert wurde. Strukturell kann sie den  $\omega$ -3-Fettsäuren zugerechnet werden, unterscheidet sich aber von diesen durch das Vorhandensein einer trans-Doppelbindung zwischen dem C<sub>2</sub>- und C<sub>3</sub>-Atom und der Gesamtanzahl von nur zehn C-Atomen. Üblicherweise haben die als PUFA bezeichneten Fettsäuren, wozu auch die essentielle  $\omega$ -3-Fettsäure Linolensäure zählt, 18 C-Atome. DTA kann als Markersubstanz für den Nachweis der Echtheit bestimmter Noniprodukte verwendet werden, da sie bislang in keiner anderen Frucht nachgewiesen wurde.

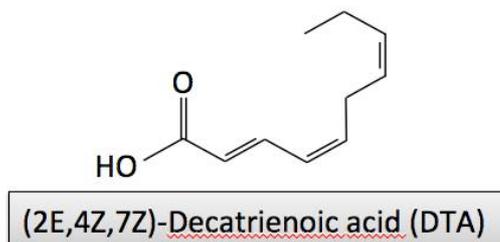


Abb. 10 Strukturformel von DTA

Obwohl fast alle Vitamine in der Nonifrukt enthalten sind, ist der Vitamingehalt pro 100 g bezogen auf den benötigten Tagesbedarf eher gering.<sup>[23]</sup>

Besonderes Augenmerk im Rahmen dieser Arbeit erhalten die Iridoide. Es sind Monoterpene, welche wie DTA zu den sekundären Pflanzenstoffen gezählt werden. Sekundäre Pflanzenstoffe dienen nicht dem Wachstum und der Funktion der Pflanze, sondern der Schutzfunktion gegenüber Fressfeinden und schädlichen Umwelteinflüssen. Iridoide sind bicyklische Monoterpene, welche sich in vier Hauptgruppen einteilen lassen: Nicht-glykosidische Iridoide, Iridoid-Glykoside, Iridoid-Acetalester und Secoiridoid-Glykoside.<sup>[25]</sup>

In der Nonifrukt wurden bisher 15 unterschiedliche Iridoide gefunden. Es handelt sich dabei ausschließlich um Iridoid-Glykoside, welche am C<sub>1</sub>-Atom eine O-glykosidische Bindung vorweisen (s. Abb. 11.1 und 11.2). Mengenmäßig am häufigsten kommen in der Nonifrukt das Iridoid Deacetylasperulasäure (DAA) gefolgt von Asperulasäure (ASPA) vor.<sup>[26]</sup>

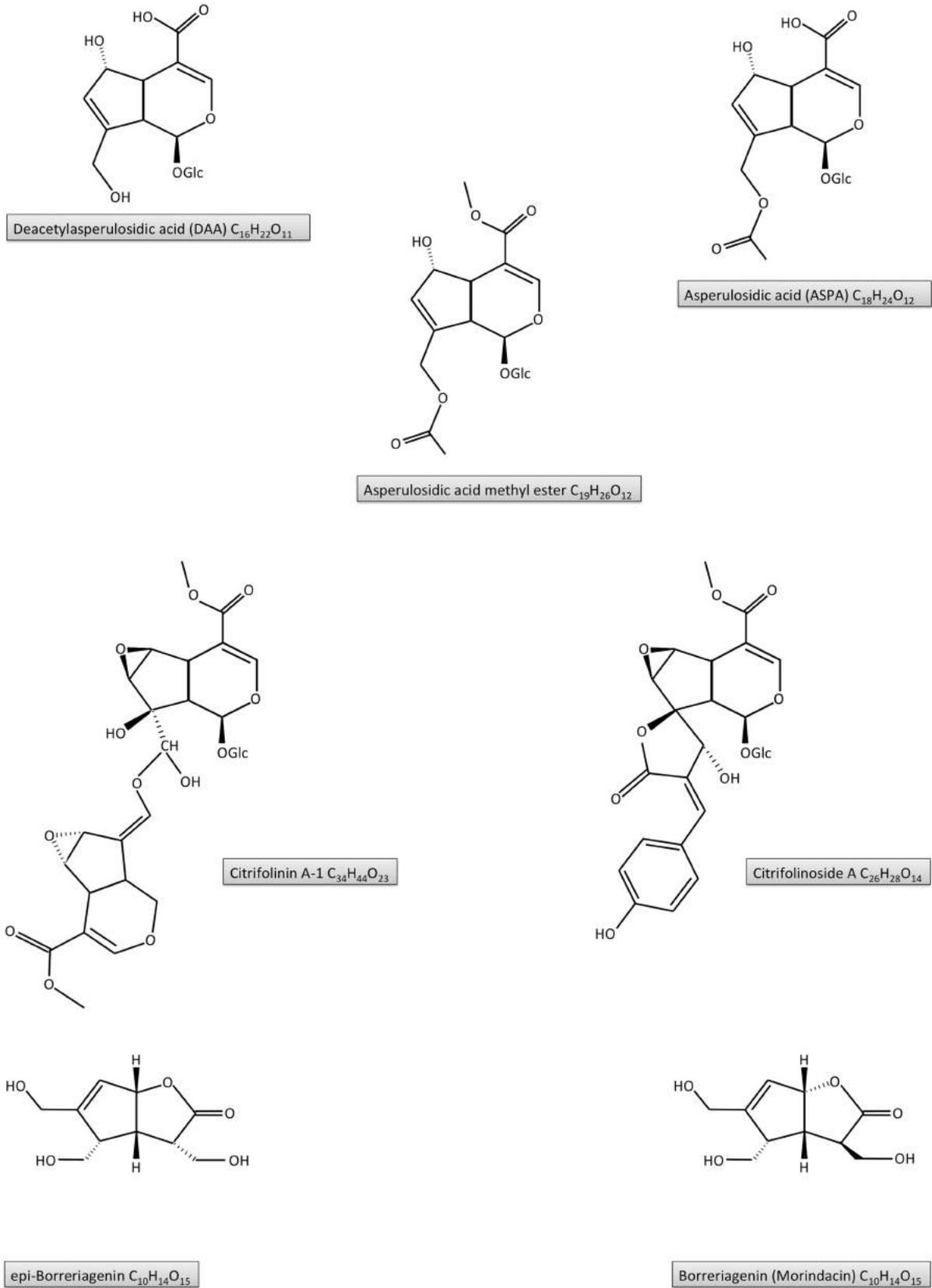


Abb. 11.1 Chemische Strukturformeln der Iridoide 1 – 7 in der Nonifruucht

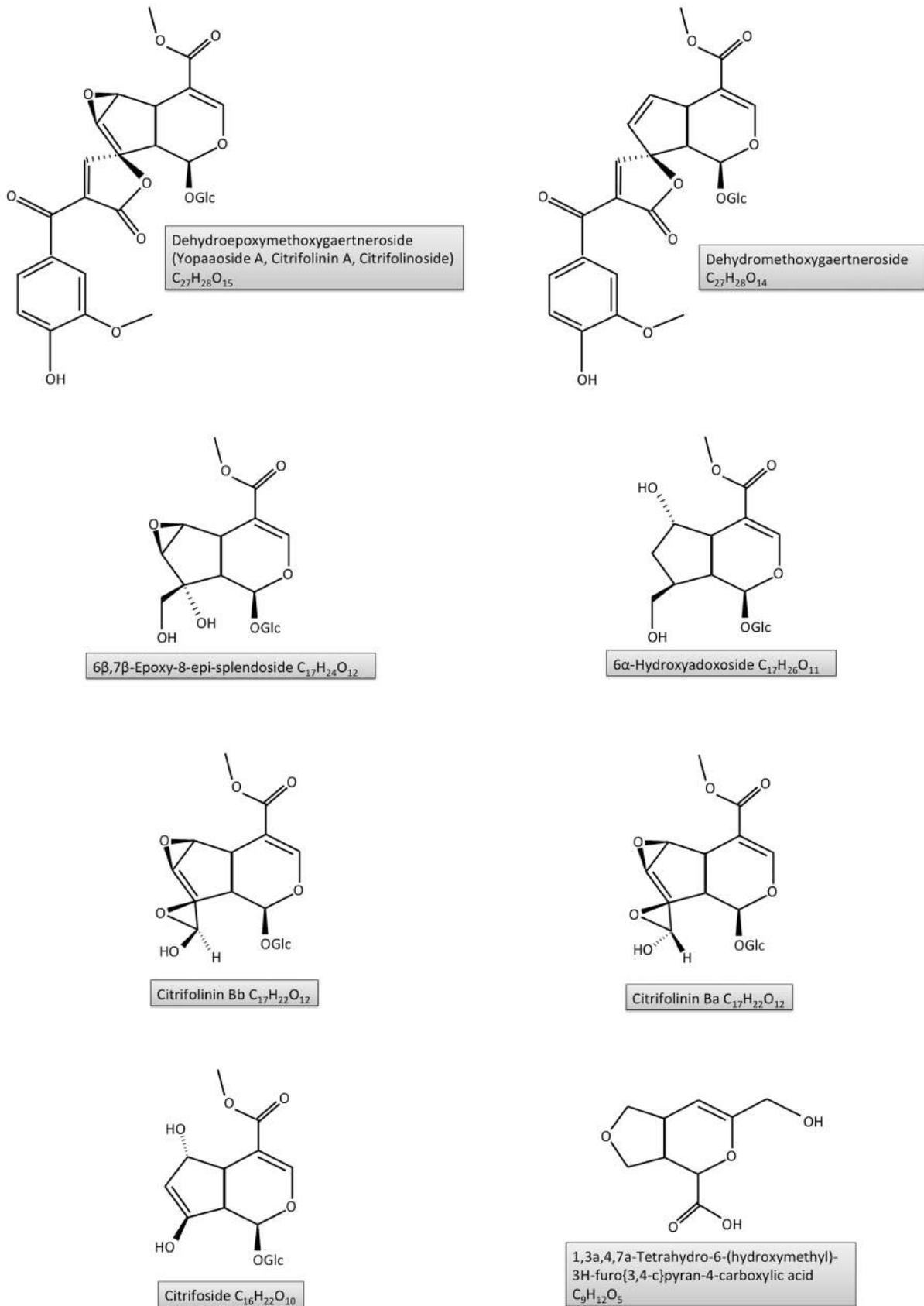


Abb. 11.2 Chemische Strukturformeln der Iridoide 8 – 15 in der Nonifruit

### 2.3. Von traditionellen Anwendungen zu heutigen Verwendungen

Noni ist eine Pflanze, welche schon seit Jahrtausenden in unterschiedlicher Art und Weise Verwendung fand. Eingesetzt wird Sie als Insektenschutz<sup>[22]</sup>, als Färbe- und Nahrungsmittel<sup>[16]</sup> oder Tierfutter für z.B. Seidenraupen oder Schweine, wodurch Namen wie „indische Maulbeere“ oder „hog apple“ entstanden.<sup>[19]</sup> Vor allem wird die Nonipflanze bei der einheimischen Bevölkerung im pazifischen Raum als traditionelles Heilmittel genutzt, wobei alle Pflanzenteile zur Anwendung kommen.<sup>[18]</sup>

Betrachtet man ausschließlich die Frucht, finden sich in unterschiedlichen Regionen der Welt eine Vielzahl unterschiedlicher Verwendungsmöglichkeiten. Im Folgenden genannte traditionelle Anwendungen als Heilmittel sind als Beispiele zu sehen.

Auf den Inseln des Hawaii-Archipels werden frische Früchte gegessen um gegen Diabetes und Arthritis sowie Brustkrebs vorzugehen.<sup>[27]</sup> Die Früchte werden bei Knochenbrüchen und tiefen Schnittwunden in getrockneter Form verwendet.<sup>[28]</sup>

Auf Rotuma wird der Saft aus frischen Früchten zur Behandlung von Tuberkulose, Fieber, Anfällen und viralen Infekten getrunken.<sup>[29]</sup> Auf den US Virgin Islands wird die Frucht bei Herzproblemen gegessen.<sup>[30]</sup> In Brunei wird Nonisaft gegen Karies verwendet.<sup>[31]</sup> Auf den Fidschi Inseln wird der Saft von jungen, noch nicht reifen Nonifrüchten, auf Hämorrhoiden appliziert.<sup>[32]</sup> Auf den Cook Inseln wird Noni zur Behandlung von Harnwegsinfekten und den damit verbunden Schmerzen, sowie zur Behandlung von Zwerchfellhernien und abdominalen Schwellungen verwendet.<sup>[33]</sup> Auf Jamaika wird der Nonisaft gegen Bluthochdruck, Diabetes mellitus, Asthma, bestimmte Krebsarten und sexuelle Dysfunktionen verwendet.<sup>[34]</sup>

Neben der Frucht werden im südpazifischen Raum auch die Blätter und Wurzeln der Pflanze als Heilmittel gegen Entzündungen eingesetzt<sup>[35]</sup>, wobei die Blätter vor allem einen Wundheilungseffekt aufweisen.<sup>[36]</sup> <sup>[37]</sup> Auf den Fidschi Inseln werden die Blätter oral appliziert, um rheumatische Erkrankungen zu behandeln.<sup>[38]</sup> Des Weiteren werden sie verwendet, um Schmerzen beim Entfernen von Splittern bzw. Widerhaken giftiger Fische zu reduzieren. Dazu lassen die Fidschianer den Dampf aufgekochter Blätter auf die betroffene Stelle einwirken.<sup>[32]</sup> Auf Neuguinea werden die Wurzeln zur Fieberreduktion verabreicht.<sup>[32]</sup>

Noch heute gilt Noni im pazifischen Raum, wie z.B. auf Hawaii, als eines der wichtigsten Naturheilmittel.<sup>[19]</sup>

Ihr viel verwendeter Nutzen als traditionelle Heilpflanze förderte das Interesse an wissenschaftlichen Studien. In den 90er Jahren des letzten Jahrhunderts nahm die Zahl der wissenschaftlichen Veröffentlichungen über die chemische Zusammensetzung und pharmakologischen Wirkungen der Pflanze sprunghaft zu. Den Anfang bildete eine Publikation von Ralph Heinicke<sup>[39]</sup>, der sich erstmals intensiv wissenschaftlich mit dieser Pflanze befasste. Es kam zu einem Übergang von Noni als traditioneller polynesischer Heilpflanze zu Noni als einem kommerziellen Nahrungsergänzungsmittel, mit einem breiten Spektrum von gesundheitsbezogenen Ansprüchen. Seit 2003 ist der Noni-Fruchtsaft in der EU als „Neuartiges Lebensmittel“ (Novel-Food) zugelassen.<sup>[40]</sup>

Im Jahre 2009 hat sich die *European Food Safety Authority* (EFSA) erneut mit der Sicherheit von Nonisaft als Nahrungsmittel befasst, als neue Publikationen erschienen waren, die einen Zusammenhang zwischen Lebererkrankungen und einer Einnahme des Saftes postulierten. Das Gremium der EFSA stufte den Nonisaft erneut als sicher für die allgemeine Bevölkerung ein. Es konnte kein kausaler Zusammenhang zwischen dem Verzehr von Nonisaft und einer Lebertoxizität ermittelt werden.<sup>[23]</sup>

## **2.4. Entzündungshemmung durch die Nonifrucht**

In der Kopenhagener-Studie und der Datenbank-Studie unserer Arbeitsgruppe konnte 2004 anhand von Fragebögen auf einem internationalen Treffen ermittelt werden, dass Noni-Konsumenten (n=1142) überwiegend positive Erfahrungen äußerten.

Neben besserem Allgemeinbefinden und dem Gefühl, mehr Energie zu haben sowie anderen vorteilhaften Wirkungen, war die Äußerung an weniger entzündlichen Schmerzen, wie z.B. durch Osteoarthritis zu leiden, die dritthäufigste.<sup>[41]</sup>

Im Jahre 2005 erschien eine epidemiologische Untersuchung, die den heutigen Gebrauch der Nonipflanze als Heilmittel auf den Fidschi Inseln beschreibt.<sup>[42]</sup> Als häufigste Indikation wurden entzündliche Schmerzen genannt.

Entzündungshemmende Wirkungen, hervorgerufen durch die Nonifrucht, machen einen Großteil wissenschaftlicher Arbeiten rund um die Nonipflanze aus, sodass im Folgenden genannte Arbeiten als Beispiele zu sehen sind.

J. Glang<sup>[43]</sup> konnte im Rahmen seiner Doktorarbeit zeigen, dass Nonisaft Gingivitis reduzieren kann.

Ebenfalls aus unserer Arbeitsgruppe stammt eine Dissertation, die sich mit der Wirkung von Nonisaft auf Schmerzen bei rheumatischen Erkrankungen des Bewegungsapparates befasst.<sup>[44]</sup>

In einer Fohlenstudie konnte gezeigt werden, dass die m-RNA-Expression von COX-2 sowie die Entzündungsmediatoren TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6 und IL-8 in isolierten Monozyten nach LPS-Stimulierung durch Verabreichung von Nonisaft repräsentativ gesunken war.<sup>[45]</sup>

Carrageenan induzierte Hinterpfotenödeme von Ratten können durch perorale Applikation von Nonisaft reduziert werden. Des Weiteren wurde eine duale COX-Inhibition bei einer isolierten Makrophagenlinie (J774-Zellen) festgestellt.<sup>[12]</sup>

Hohe Dosen von bis zu 200 mg/Tag Nonisaft, oral appliziert bei Ratten und Mäusen, konnten Bradykinin-induzierten Ödemen nahezu komplett entgegenwirken. Dabei wurde bei einer neunwöchigen Applikationen von 200 mg pro Tag zusätzlich auf toxische Effekte und Ulzerationen geachtet, welche ausblieben.<sup>[34]</sup>

Mit Hilfe der Dünnschichtchromatographie konnte mit frischem Nonisaft und getrocknetem Fruchtpulver eine Entzündungshemmung, speziell von COX-1, von über 70% nachgewiesen werden.<sup>[46]</sup>

## 2.5. Entzündungshemmung durch Iridoide

Neben der Beobachtung der entzündungshemmenden Wirkungen durch Nonisaft ist von Interesse, welche Stoffe aus der Frucht für diese Wirkungen verantwortlich sein könnten.

Iridoide können als Möglichkeit in Betracht gezogen werden, da bereits bekannt ist, dass sie anti-inflammatorische Effekte aufweisen.

Anhand von Carrageenan-induzierten Pfotenödemen bei Mäusen, zeigen die Iridoide Loganinsäure und Loganin Schwellungsreduktionen um bis zu 44%. In einem TPA-induzierten Mausohr-Ödemtest fand man heraus, dass Aucubin, Loganin und Verbenalin eine Hemmung von bis zu 80% erzeugten.<sup>[47]</sup>

Methanolextrakte, gewonnen aus der Nonifrukt, enthalten unter anderem die Iridoide ASPA und DAA. Diese Extrakte weisen anti-inflammatorische Wirkungen auf, indem sie durch Hemmung der PLA<sub>2</sub> die AA-Freisetzung und somit die Bildung weiterer Entzündungsmediatoren drosseln.<sup>[48]</sup>

Einflüsse von Iridoiden, speziell auf die Aktivität der Enzyme der AA-Kaskade (LOX und COX) sind ebenfalls bekannt.  $\beta$ -Glykosidasen können durch hydrolytische Spaltungen Iridoid-Glykoside in Iridoid-Aglyka umwandeln, welche dann durch Blockierungen der LOX Enzyme entzündungshemmend wirken.<sup>[49]</sup>

In *in vitro* Studien konnte hydrolysiertes Aucubin, entstanden durch Behandlung von Aucubin mit  $\beta$ -Glykosidase, vorrangig das COX-2-Enzym hemmen, wobei die hydolisierten Iridoide Loganin und Geniposid vorrangig das COX-1-Enzym inhibierten. Des Weiteren wurde bereits belegt, dass unter anderem Aucubin, Geniposid und Loganin die TNF- $\alpha$  Produktion drosseln können.<sup>[50]</sup>

### 3. Fragestellung der Arbeit

Die Nonipflanze weist, wie im Vorfeld erwähnt, entzündungshemmende Wirkungen speziell auf die AA-Kaskade auf.<sup>[46]</sup> Versuche mit einer isolierten Zelllinie (J774-Makrophagen) bestätigten dies.<sup>[12]</sup> Es liegen jedoch keine Informationen über die Entzündungshemmung durch Nonisaft in humanem Vollblut vor.

Darüber hinaus fehlen genauere Betrachtungen einzelner Inhaltsstoffe der Nonifrukt und Verhältnisverschiebungen der enzymatischen AA-Metabolisierung in Bezug auf COX-1, COX-2 und 5-LOX.

Im Rahmen dieser Arbeit gilt es zu überprüfen, inwieweit der Nonisaft (TNJ) und die in der Nonifrukt vorkommenden Iridoide anti-inflammatorische Eigenschaften aufweisen, speziell unter der Betrachtung der AA-Kaskade.

Dazu wird DAA, das mengenmäßige Hauptiridoid der Nonifrukt sowie das Iridoid Geniposid und sein Aglycon Genipin, welche nicht im Nonisaft vorliegen, untersucht.

Dadurch, dass sich die DAA-Strukturformel nur um eine Methylgruppe von dem Iridoid Geniposid unterscheidet, ist es von Interesse, zu vergleichen, ob Effektunterschiede vorliegen (s. Abb. 12).

Wie bereits erwähnt, hemmen das Iridoid Geniposid und sein Aglycon Genipin die Freisetzung von TNF- $\alpha$  und wirken dadurch entzündungshemmend.<sup>[50]</sup> Im Rahmen dieser Arbeit soll nun untersucht werden, ob auch ein Einfluss auf die Bildung der Zytokine erfolgt, die über die AA-Kaskade gebildet werden.

Des Weiteren wird im Rahmen dieser Arbeit die Gelegenheit genutzt DTA auf mögliche Entzündungshemmungen im Bereich der AA-Metabolisierung zu untersuchen.

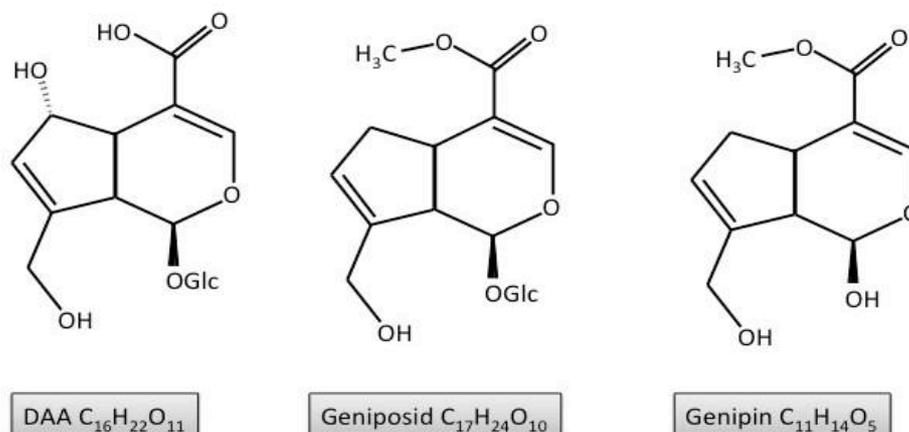


Abb. 12 Vergleich der beiden Iridoid-Strukturen DAA und Geniposid sowie des nach  $\beta$ -glykosylierung stabil vorliegenden Aglykons Genipin

Im Rahmen dieser Arbeit werden *ex vivo* / *in vitro* Tests mit humanem Vollblut durchgeführt, um zu betrachten, inwieweit Nonifruchtsaft eine Entzündungshemmung bewirken kann, die auf einer verminderten Bildung der Entzündungsmediatoren  $\text{PGE}_2$ ,  $\text{TXB}_2$  und  $\text{LTB}_4$  durch die Enzyme COX-1, COX-2 und 5-LOX beruht. Ziel dieser Arbeit ist es, einen Einfluss von Hemmstoffen bei der Bildung von Entzündungsmediatoren auf der Basis von *Morinda citrifolia*-Zubereitungen aufzuzeigen. Dabei soll eine kombinierte *in vivo* / *in vitro* Methode zum Einsatz kommen. Probanden sollen zunächst mit dem Nonisaft behandelt werden, worauf Ihnen dann Blut entnommen wird, das durch Einsatz von entzündungsstimulierenden Substanzen (LPS und CaIP) zur Abgabe der Zytokine der Arachidonsäurekaskade veranlassen soll.



*Abb. 13 Der verwendete Nonisaft: Tahitian Noni Juice (TNJ)*

Die Effekte müssen numerisch beurteilt werden, da eine aussagekräftige Statistik aufgrund der geringen Probandenzahl nicht möglich ist.

Als Nonisaft wurde ein Produkt aus dem Handel (*Tahitian Noni<sup>®</sup> Juice*) verwendet (s. Abb. 13). Daneben wurden Iridoide, teils aus dem Handel, teils in unserer Arbeitsgruppe hergestellt sowie verschiedene Noniextrakte, die ebenfalls in unserer Arbeitsgruppe aus Früchten unterschiedlicher Herkunftsorte gewonnen worden waren, verwendet. Die aus Nonifrüchten stammende Fettsäure DTA wurde ebenfalls in unserer Arbeitsgruppe gewonnen.

### 3.1. Die Wahl der Quantifizierungsmethode

Der *Enzym-Linked Immunosorbant Assay* (ELISA) dient zum Nachweis und zur Quantifizierung der Entzündungsmediatoren, basierend auf einer Antikörper-Antigenreaktion.

Zur Untersuchung der AA-Metabolisierung dient der Entzündungsmediator TXB<sub>2</sub> als Marker zur Betrachtung der COX-1-Aktivität, PGE<sub>2</sub> der COX-2-Aktivität sowie LTB<sub>4</sub> als Marker für die 5-LOX-Aktivität. Die verwendeten ELISA-Kits von Cayman Biomol sind für PGE<sub>2</sub> mit einem polyklonalen Ziege-anti-Maus-IgG-Antikörper, für LTB<sub>4</sub> sowie TXB<sub>2</sub> mit einem monoklonalen Maus-anti-Hase-IgG-Antikörper beschichtet. Die Kits umschreiben als kompetitive ELISA ein Konkurrenzverhalten an den Antigenbindungsstellen (Antikörper), zwischen dem jeweiligen Entzündungsmediator und der Entzündungsmediator-Acetylcholinesterase (Enzym-gekoppelter-Tracer). Das Enzym Acetylcholinesterase fungiert als Marker, welches in der Lage ist, Acetylthiocholin im Ellmanns-Reagenz in 5-thio-2-Nitrobenzoesäure zu spalten, wodurch ein Farbsignal erzeugt wird. Das farblich gelb erscheinende Produkt weist eine Absorption bei 412 nm auf und entspricht der Tracerkonzentration (s. Abb. 14).<sup>[3] [51] [52]</sup>

Auf die unmarkierte Antigenkonzentration kann anhand des Substratumsatzes durch den Tracer geschlossen werden, denn das Farbsignal verhält sich reziprok zu der unmarkierten Antigenkonzentration. Niedrige unmarkierte Antigenkonzentrationen bedeuten, dass die meisten Antikörperbindungsstellen vom Tracer besetzt sind (starkes Farbsignal). Eine hohe unmarkierte Antigenkonzentration bedeutet dementsprechend ein schwaches Farbsignal.<sup>[53]</sup>

Zur Quantifizierung des Entzündungsmediators TNF- $\alpha$  wird ein Sandwich-ELISA verwendet. Darunter versteht man ein Verfahren, bei dem der Entzündungsmediator als Antigen an unterschiedlichen Epitopen von zwei verschiedenen Antikörpern wie ein Sandwich umschlossen wird. Der verwendete ELISA-Kit von US Biological ist für TNF- $\alpha$  mit einem monoklonalen Antikörper beschichtet. Nach Hinzufügen und Bindung der TNF- $\alpha$  Proben werden diese durch Zugabe von Biotin, einem polyklonalen Antikörper, komplett umschlossen. Im Anschluss wird durch Zugabe von Avidin, ein tetrameres Protein, welches an Biotin bindet, die hinzugefügte Substratlösung zu einer detektierbaren Lösung umgesetzt. Das farblich gelb erscheinende Produkt weist eine Absorption bei 450 nm auf und entspricht der Entzündungsmediatorkonzentration.

## II Material und Methoden

### 1. Material

#### 1.1. Chemikalien

*Tabelle 1 verwendete Chemikalien*

Name	Hersteller
$\beta$ -Glykosidase	Sigma/Aldrich
Calciumionophor A23187	Sigma/Aldrich
DMEM Medium ( low Glucose )	PAA
DMSO	MERCK
Ethanol (100%)	MERCK
FCS	PAA
Heparin10000IU/mL	Braun Melsungen AG
HPLC Wasser	J.T. Baker
Hydroxylamine	Sigma/Aldrich
Indomethacin	Sigma/Aldrich
Lipopolysaccharid von Escherichia coli (Serotyp 026:B6)	Sigma, Steinheim, Deutschland
Methanol	MERCK
Nonisaft TNJ	Morinda Inc.
Noni Püree	Morinda Inc.
RPMI-1640 Medium	Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland
Streptomycin / Penicilin	Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland
Wasser aus Milli-Q-Anlage	Millipore, Merck
Zileuton	Sigma/Aldrich

## 1.2. Verbrauchsmaterialien

Tabelle 2 Verbrauchsmaterialien

Name	Hersteller
Blut-Monovetten mit Heparin	Sarstedt, Deutschland
LTB <sub>4</sub> Enzyme Immunoassay Kit	Cayman Chemicals, Ann Arbor, Massachussets, USA
PGE <sub>2</sub> Enzyme Immunoassay Kit	Cayman Chemicals, Ann Arbor, Massachussets, USA
TXB <sub>2</sub> Enzyme Immunoassay Kit	Cayman Chemicals, Ann Arbor, Massachussets, USA

## 1.3. Geräte

Spectra Reader 96-well Platten Photometer von Packard mit 412nm und 450nm Filter

## 1.4. Testmaterialien

Tabelle 3 Testmaterialien

Name	Woher
humanes Vollblut	Probanden aus der Arbeitsgruppe: Proband 1 weiblich, 24J. Proband 2 männlich, 20J. Proband 3 weiblich, 26J. Proband 4 männlich, 25J. Proband 5 männlich, 20J. Proband 6 weiblich, 50J. Proband 7 weiblich, 40J. Proband 8 männlich, 32J.
Genipin	Von Prof. Il Moo Chang, Seoul National University, Korea
Geniposid	Bio Trend Zürich/Schweiz

## 1.5. Stimulatoren

### LPS:

Als morphologischer Bestandteil gramnegativer Bakterien stimuliert LPS als PAMPs über Freisetzung von Entzündungsmediatoren wie TNF- $\alpha$  die Enzyme COX-1 und COX-2.

### Calcium-Ionophor A 23187 (CaIP):

Das CaIP fördert den Anstieg der intrazellulären  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration innerhalb intakter Zellen, wodurch zytosolische Enzyme, wie die  $\text{PLA}_2$ , an die Zellmembran geleitet werden und zu deren Aktivierung führen.<sup>[54]</sup>

## 1.6. Lösungen

### RPMI-Medium:

Dem RPMI-Medium wird zusätzlich 1% Penicillin/Streptomycin (5 ml auf 500 ml) unter der sterilen Werkbank hinzupipettiert.

### Filtrierter PBS Puffer mit 0,005% Hydroxylamin:

Es wird zu 100 ml PBS Puffer 5 mg Hydroxylamin hinzupipettiert und anschließend durch einen Filter (115 ml Filter Unit, Porengröße 45  $\mu$ ) gesaugt.

### LPS:

Als Stammkonzentration von 2 mg/ml wird 1 mg LPS in 0,5 ml PBS-Puffer, versetzt mit 0,005% Hydroxylamin, gelöst. Anschließend geschüttelt (Vortex) und im Ultraschallbad beschallt um Mizellenbildung vorzubeugen.

### CaIP (M = 523,62 g/mol):

Eine Stammkonzentration von 1,9 mM CaIP wird angelegt, indem 1 mg (1,9  $\mu\text{mol}$ ) in 1 ml PBS-Puffer gelöst wird. Die Lösung enthält zusätzlich 0,005% Hydroxylamin. Um CaIP vollständig zu lösen, muss die Probe erwärmt, beschallt und geschüttelt (Vortex) werden.

Indomethacin (M = 357,79 g/mol):

Eine Stammkonzentration von 2,8 mM Indomethacin wird angelegt, indem 1 mg (2,8 µmol) in 1 ml HPLC-Wasser, versetzt mit 1% Natriumhydrogencarbonat (10 mg) gelöst wird. Um Indomethacin vollständig zu lösen, muss die Probe erwärmt, beschallt und geschüttelt (Vortex) werden.

Zileuton (M = 236,39 g/mol):

Eine Stammkonzentration von 4,2 mM Zileuton wird angelegt, indem 1 mg (4,2 µmol) in 1ml PBS-Puffer gelöst wird. Die Lösung enthält zusätzlich 0,005% Hydroxylamin sowie 2,4 µl Salzsäure (1 mol/l). Um Zileuton vollständig zu lösen, muss die Probe erwärmt, beschallt und geschüttelt (Vortex) werden.

Proben:

DTA:	Stammkonzentration von 20 mg/ml, gelöst in H <sub>2</sub> O
DAA:	Stammkonzentration von 20 mg/ml, gelöst in H <sub>2</sub> O
Genipin:	Stammkonzentration von 20 mg/ml gelöst in H <sub>2</sub> O
Geniposid:	Stammkonzentration von 2 mg/ml gelöst in H <sub>2</sub> O

Hexanextrakt:

20 ml Nonifruchtsaft (TNJ) werden mit 20 ml Hexan ausgeschüttelt. Nach erfolgter Phasentrennung wird der Überstand abgehoben und unter Stickstoff eingeeengt. Anschließend wird der Rückstand in DMSO zu einer Stammkonzentration von 20mg/ml aufgenommen.

Ethylacetat-Extrakt:

20 ml Nonifruchtsaft (TNJ) werden mit 20 ml Ethylacetat ausgeschüttelt. Nach erfolgter Phasentrennung wird der Überstand abgehoben und unter Stickstoff eingeeengt. Anschließend wird der Rückstand in DMSO zu einer Stammkonzentration von 20 mg/ml aufgenommen.

Ethanolextrakt aus Noni-Püree:

1 g getrocknetes Noni-Püree wird mit 50 ml EtOH (100%) aufgenommen und über Nacht in einem Schüttelinkubator bei 37° geschüttelt. Nach Abfiltrieren und Entfernen der festen Bestandteile mit einem Faltenfilter wird die Lösung mit Hilfe eines Rotationsverdampfers unter Vakuum eingeeengt und dann in 1 ml DMSO aufgenommen, so dass eine Stammkonzentration entsteht, die 1 g/ml Noni-Püree entspricht.

## 2. Methoden

### 2.1. Quantifizierung von Entzündungsmediatoren mittels ELISA

Für die im Folgenden zu findenden Versuche wurde in Tabelle 4 eine einheitliche Benennung der vorzufindenden Proben zusammengestellt. Die Stimulatoren und Hemmer wurden in Lösungen bzw. Puffern gelöst und sind dem Materialabschnitt zu entnehmen.

Tabelle 4 Übersicht der Probenbenennung

K0	Probe ohne zusätzliche Stimulierung
K+	Probe mit zusätzlicher Stimulierung für den jeweiligen Entzündungsmediator: (LPS um PGE <sub>2</sub> , TXB <sub>2</sub> und TNF- $\alpha$ , sowie CaIP um LTB <sub>4</sub> zu stimulieren)
K++	Probe mit zusätzlicher Stimulierung (LPS oder CaIP) sowie zusätzlichem Hemmer vorab (Indomethacin, Zileuton oder Testsubstanzen, wie z.B. Nonifruchtsaft)

#### 2.1.1. Vorversuche für ein funktionierendes Blutaufbereitungssystem

Für ein funktionierendes Grundgerüst bedarf es Wirkungskurven unterschiedlicher Inkubationszeiten und Konzentrationen. Es ermöglicht Entzündungen kontrolliert, fast zentriert innerhalb der Standardkurve zu erzeugen, um neben möglichen Hemmungen auch Entzündungsförderungen durch hinzugefügte Substanzen zu beurteilen.

Der Ansatz orientiert sich an der Methode von Aulock *et al.*<sup>[55]</sup>. Auf einer 6-Well Petrischale wurden pro Well 800  $\mu$ l auf 37°C vorgewärmtes RPMI-Medium vorgelegt, versetzt mit 2.5 IU/ml Heparin. Anschließend wurden 200  $\mu$ l frisches Vollblut unmittelbar nach der Blutentnahme hinzupipettiert. Im Anschluss wurden alle Proben vor der Stimulierung vier Stunden bei 37°C und 10% CO<sub>2</sub> vorinkubiert.

Um einen Vergleich zu haben wie hoch die Konzentration der Entzündungsmediatoren ohne Stimulierung (K0) ist, wurde bei jeder K+ Probe zeitgleich eine K0 Probe mit aufbereitet. Bei der K0 Probe war der Ablauf inklusive Vorinkubationszeiten völlig identisch zu dem der K+ Proben, nur wurde kein Stimulator hinzupipettiert.

Die Freisetzung der verschiedenen Entzündungsmediatoren wurde mit unterschiedlichen Konzentrationen der Stimulatoren LPS und CaIP provoziert (K+). Als zweiter Parameter wurde bei 37°C und 10% CO<sub>2</sub> getestet, wie lange das System, ohne zusätzliche Stimulierung, keine spontanen Entzündungen aufweist. Im Anschluss wurden die Proben in Eppendorf-Tubes überführt, bei 4°C, 4500 Umdrehungen pro Minute (RPM) für 10 Minuten zentrifugiert und der

Überstand anschließend überführt. Dieser wurde entweder bei  $-80^{\circ}\text{C}$  in Aliquots gesichert oder für eine anschließende ELISA-Messung kurzzeitig bei  $4^{\circ}\text{C}$  gelagert. Zur Quantifizierung der Entzündungsmediatoren  $\text{PGE}_2$ ,  $\text{TXB}_2$  und  $\text{LTB}_4$  wurde der kompetitive ELISA von Cayman verwendet.

Nach erfolgreichen kontrollierten Stimulierungen wurde zusätzlich mit Hemmstoffen, wie Indomethacin und Zileuton, eine kontrollierte Hemmung der Entzündungsmediatoren erzeugt (K++ Probe). Hierzu wurde dem oben genannten Versuchsablauf orientierend an Aulock *et al.*<sup>[55]</sup>, eine Stunde vor Stimulierung Indomethacin zur Hemmung der  $\text{PGE}_2$  und  $\text{TXB}_2$ -Entstehung durch COX-1 und COX-2 zugesetzt. Als Hemmstoff der  $\text{LTB}_4$ -Bildung durch 5-LOX wird Zileuton verwendet.

Um zu testen inwieweit die Blutmatrix die Messung der Zytokine beeinträchtigt, wurde die Eichkurve zusätzlich in Gegenwart von Vollblut ohne Induktoren durchgeführt. (K0 Probe mit unterschiedlichen hinzupipettierten  $\text{PGE}_2$ -Standardkonzentrationen). Die Ergebnisse liefern darüberhinaus auch Auskunft darüber, ob während der Inkubationszeit neue Zytokine entstehen oder vorhandene Zytokine verschwinden. Hierbei diente  $\text{PGE}_2$  stellvertretend für alle untersuchten Zytokine als Indikator.

### **2.1.2. Aufbereitung des humanen Vollbluts: Pilotstudie-1**

Im Rahmen einer Pilotstudie wurde bei sieben Probanden (Proband 1-7), die aus der Arbeitsgruppe der Abteilung rekrutiert wurden, vor (Zeitpunkt: T0) und fünf Tage nach täglicher Einnahme von Nonifruftschaft (Zeitpunkt: T1), Blut im nüchternen Zustand mit Heparin-Röhrchen abgenommen.

Die Probanden tranken morgens auf nüchternen Magen jeweils 2 ml TNJ/kg Körpergewicht (KGW). Alle Probanden tranken 1 h vor der Entnahme der zweiten Blutprobe nach fünf Tagen die letzte Tagesdosis an Nonifruftschaft auf nüchternen Magen. Zum Zeitpunkt T0 und T1 erfolgte die Aufbereitung und Probensicherung, sowohl einer K0 als auch einer K+ Probe.

Orientiert an der Methode von Aulock *et al.*<sup>[55]</sup> wurden auf 6-Well Petrischalen pro Well 800  $\mu\text{l}$  auf  $37^{\circ}\text{C}$  vorgewärmtes RPMI-Medium, welches mit 2.5 IU/mL Heparin versetzt wurde, vorgelegt. Anschließend wurden 200  $\mu\text{l}$  frisches Vollblut unmittelbar nach der Blutentnahme hinzupipettiert (s. Abb. 14).

Im Anschluss wurden alle Proben vor der Stimulierung vier Stunden bei  $37^{\circ}\text{C}$  und 10%  $\text{CO}_2$  vorinkubiert. Abhängig vom untersuchten Entzündungsmediator wurden die Proben mit einer entsprechenden LPS- bzw. CaIP-Konzentration stimuliert und bei entsprechender Inkubationszeit

erneut bei 37°C und 10% CO<sub>2</sub> inkubiert. Die optimalen Bedingungen für die Stimulation der Entzündungsmediatoren sind der Tabelle 10 im Ergebnisteil zu entnehmen. Nach Überführung der Reaktionsansätze in Eppendorf-Tubes wurden diese bei 4°C und 4500 RPM für 10 Minuten



**Abb. 14** Befüllung der 6-Well Petrischale mit humanem Vollblut

zentrifugiert und der Überstand in ein neues Gefäß überführt. Davon wurden entweder Aliquots bei -80°C eingefroren oder für eine anschließende ELISA-Messung kurzzeitig bei 4°C gelagert. Zur Quantifizierung der Entzündungsmediatoren PGE<sub>2</sub>, TXB<sub>2</sub> und LTB<sub>4</sub> wurde der kompetitive ELISA von Cayman verwendet.

### 2.1.3. Aufbereitung des humanen Vollbluts: Pilotstudie-2

In dieser Studie war neben dem Effektvergleich vor und nach Nonifruchtsaft Einnahme vor allem von Interesse, inwieweit Effektveränderungen noch über mehrere Tage nach Beendigung der Einnahme sichtbar wurden. Die Pilotstudie-2 wurde mit lediglich drei Probanden durchgeführt (Proband 7, 8 und 4), vom Aufarbeitungsablauf entspricht sie ansonsten der Pilotstudie-1.

Der Verlauf der Saftaufnahme und der Blutabnahme ist in Tabelle 5 dargestellt. Es galten die gleichen Bedingungen bezüglich des Trinkverhaltens wie in der Pilotstudie-1 (2 ml TNJ/kg KGW, morgens auf nüchternen Magen).

Die erste Blutentnahme erfolgte im nüchternen Zustand ohne Nonisafteinnahme vorab (T0). Direkt danach erfolgte die erste Nonisafteinnahme. Eine Stunde vor der zweiten Blutentnahme (T1) wurde die gesamte Tagesdosis von Nonisaft eingenommen. Die letzten drei Blutentnahmen (T2-4) erfolgten wieder nüchtern, nach einer Nonisaft-Karenzzeit von 24, 72 und 120 Stunden.

Des Weiteren wurde neben den Entzündungsmediatoren PGE<sub>2</sub>, TXB<sub>2</sub> und LTB<sub>4</sub> zusätzlich TNF-α quantifiziert. Zur Quantifizierung der Entzündungsmediatoren PGE<sub>2</sub>, TXB<sub>2</sub> und LTB<sub>4</sub> wurde der kompetitive ELISA von Cayman verwendet. Zur Quantifizierung von TNF-α wurde eine LPS-Stimulierung mit 1 ng/ml bei einer Inkubationszeit von 10 h verwendet, orientierend an der Publikation von Maltzan *et al.*<sup>[56]</sup>, welche sich in den Vorversuchen als optimal erwiesen

hatte (s. Tab. 10). Die Quantifizierung wurde mit Hilfe des Sandwich-ELISA von US Biological durchgeführt.

*Tabelle 5 Trink- und Blutentnahmeverhalten der Probanden*

	Proband 7,8 und 4:		
Tag	Nonisaft	Blutentnahme (BE)	Welche Proben
1. Di	Ja, aber erst nach der ersten Blutentnahme!	Ja -> T0	K0/K+
2. Mi	Ja	/	/
3. Do	Ja	Ja -> T1	K0/K+
4. Fr	Ja	/	/
5. Sa	Ja	/	/
6. So	Ja	/	/
7. Mo	/	Ja -> T2	K0/K+
8. Di	/	/	/
9. Mi	/	Ja -> T3	K0/K+
10. Do	/	/	/
11. Fr	/	Ja -> T4	K0/K+

### **2.1.4. In vitro Exposition von humanem Vollblut mit Iridoiden und DTA**

Dieser Test entspricht vom Aufarbeitungsablauf dem der Pilotstudie-1, mit geringfügigen Änderungen. Auf einer 6-Well Petrischale wurde pro Well 800 µl auf 37°C vorgewärmtes RPMI-Medium, welches mit 2.5 IU/ml Heparin versetzt wurde, vorgelegt. 200 µl frisches Vollblut wurden unmittelbar nach der Blutentnahme hinzupipettiert. Im Anschluss wurden alle Proben vier Stunden lang mit den jeweiligen Reinsubstanzen, in diesem Fall die Iridoide DAA, Geniposid, Genipin sowie die Fettsäure DTA, bei 37°C und 10% CO<sub>2</sub> vorinkubiert. Die verwendeten Konzentrationen sind dem Ergebnisteil (s. Abb. 42-44) zu entnehmen.

Anschließend wurden abhängig vom untersuchten Entzündungsmediator die Proben mit entsprechender LPS- bzw. CaIP-Konzentration stimuliert und bei entsprechender Inkubationszeit erneut bei 37°C und 10% CO<sub>2</sub> inkubiert. Die optimalen Bedingungen für die Stimulation der Entzündungsmediatoren sind der Tabelle 10 im Ergebnisteil zu entnehmen.

Nach Überführung der Reaktionsansätze in Eppendorf-Tubes, wurde bei 4°C und 4500 RPM für 10 Minuten zentrifugiert und der Überstand überführt. Dieser wurde dann entweder bei -80°C in Aliquots eingefroren oder für eine direkt anschließende ELISA-Messung kurzzeitig bei 4°C gelagert.

### **2.1.5. Durchführung und Messung des kompetitiven Cayman ELISAs für PGE<sub>2</sub> TXB<sub>2</sub> und LTB<sub>4</sub>**

Die Durchführung und entsprechenden Vorbereitungen erfolgten nach Vorgabe des Herstellers.

#### Vorbereitung des EIA-Puffers:

Der 10-fach konzentrierte EIA Puffer wurde mit ddH<sub>2</sub>O (doppelt destilliertes Wasser) verdünnt. Anschließend konnten Tracer und Antikörper, geliefert als Trockensubstanz, mit 6 ml 1:1 vorliegendem EIA Puffer gelöst werden.<sup>[3] [51] [52]</sup>

#### Vorbereitung der Standardkurven PGE<sub>2</sub>, TXB<sub>2</sub> und LTB<sub>4</sub>:

Die Standardreihe ist eine Verdünnungsreihe von Tube S1 bis S8 mit gleichmäßig abfallender Entzündungsmediator-Konzentration. Verdünnt wurde mit 500 µl RPMI Medium, versetzt mit 2,5 IU/ml Heparin, vorgelegt in Tube S2 bis S8. In Tube S1 wurden 900 µl vorgelegt und anschließend mit 100 µL des entsprechenden Entzündungsmediator-Standards versetzt.

Der PGE<sub>2</sub>-Standard, geliefert als Trockensubstanz, wurde in 1 ml EIA Puffer gelöst, wodurch eine Konzentration von 10 ng/ml entstand, wovon 100 µl dem S1-Tube hinzupipettiert werden.

Bei dieser Verdünnungsreihe handelte es sich um eine 1:2 Verdünnung (s. Tab. 6). Nach kurzem schütteln (Vortex) zwischen den Verdünnungsschritten wurden immer 500 µl vom vorherigen Tube zum nächsten überführt.

Die Standards LTB<sub>4</sub> 50 ng/ml und TXB<sub>2</sub> 100 ng/ml sind bereits als Lösungen vorhanden und mussten 1:10 mit ddH<sub>2</sub>O vorverdünnt werden, wovon 100 µl ins S1-Tube überführt wurden. Die Verdünnungsreihe des TNF-α wird in Abschnitt 2.1.6 erläutert.

*Tabelle 6 Aus der Verdünnung resultierende Konzentrationen der Standardkurve S1-S8*

Tube	PGE <sub>2</sub> pg/ml	LTB <sub>4</sub> pg/ml	TXB <sub>2</sub> pg/ml	TNF-α pg/ml
S1	1000	500	1000	1000
S2	500	250	500	500
S3	250	125	250	250
S4	125	62,5	125	125
S5	62,5	31,3	62,5	62,5
S6	31,3	15,6	31,3	31,3
S7	15,6	7,8	15,6	15,6
S8	7,8	3,9	7,8	0

#### Befüllung der ELISA-Well:

Entsprechend der Durchführungsvorschrift wurden die ersten drei Reihen der 96-Wellplatte (s. Tab. 8) für die Parameter Blank, NSB, B<sub>0</sub>, TA (s. Tab. 7) sowie der Standardkurven (s. Tab. 6) nach Auftragsschema (s. Tab. 9) befüllt.

Tabelle 7 Erläuterung der Parameter für den Cayman ELISA

Blank = Leerwert -> Beschreibt die Durchsichtigkeit des Wells.
NSB = Unspezifische Bindung -> Durch Weglassen des spezifischen Antikörpers kann ermittelt werden, inwiefern es zu einer unspezifischen Bindung kommt.
$B_0$ = Maximale Bindung -> Ausschließliches Zusammenführen von Tracer und Antikörper gibt Auskunft, wie viel markierter Tracer an die Antikörper gebunden werden kann.
TA = Höchstaktivität -> dient der Überprüfung der Aktivität des konjugierten Enzyms.

Tabelle 8 Schematisch dargestellte ELISA Platte

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	Blank	S1	S1	Probe1	Probe1							
B	Blank	S2	S2	Probe2	Probe2							
C	NSB	S3	S3	Probe3	Probe3							
D	NSB	S4	S4	Probe4	Probe4							
E	$B_0$	S5	S5	Probe5	Probe5							
F	$B_0$	S6	S6	Probe6	Probe6							
G	$B_0$	S7	S7	...	...							
H	TA	S8	S8									

Tabelle 9 Auftragsschema, wie viel wovon in welches Well zu pipettieren ist

Medium	50 $\mu$ l in Well NSB und B0
Puffer	50 $\mu$ l in Well NSB
Verdünnungsreihe S1 - S8	50 $\mu$ l in Well S1 bis S8
Proben bzw. verdünnte Proben	50 $\mu$ l in entsprechendes Well
Tracer	50 $\mu$ l in alle Wells, außer Blank und TA
Antikörper	50 $\mu$ l in alle Wells außer Blank TA und NSB

Die Überstände der Blutproben wurden nach vorher gefertigten Pipettierskizzen, kurzem Schütteln (Vortex) und eventuellen Verdünnungen, doppelt aufgetragen.

Nach anschließender Tracerzugabe wurde der ELISA mit einer Plastikfolie abgedeckt und für 18 h im Kühlschrank bei 4°C inkubiert.

#### Vorbereitung des Waschpuffers und Ellmansreagenz:

Der 400-fach konzentrierte Waschpuffer wurde mit ddH<sub>2</sub>O verdünnt und mit 0,5ml Polysorbat pro Liter Waschpuffer versehen.

Das Ellmansreagenz wurde in 20 ml ddH<sub>2</sub>O aufgenommen und mit Alufolie vor Licht geschützt.

#### ELISA entwickeln:

Die Wells der Platte wurden fünf Mal mit 300 µl Waschpuffer gewaschen und anschließend mit 200 µl Ellmansreagenz versetzt. Das TA-Well erhielt zusätzlich 5 µl Tracer.

Bei Raumtemperatur, überdeckt mit einer Plastikfolie und zusätzlich durch Alufolie komplett abgedunkelt, wurden die PGE<sub>2</sub>- und TXB<sub>2</sub>-ELISA für 90 min und der LTB<sub>4</sub>-ELISA für 120 min auf einem Schüttelinkubator entwickelt.

Die Extinktion wurde photometrisch bei 412 nm gemessen. Mit Hilfe der gemessenen Eichkurven und anschließender Kurvenanpassung konnten aus den erhaltenen Extinktionen die Konzentrationen errechnet werden (s. Ergebnisteil Abb. 15-18).

Sobald Ergebnisse der Doppelbestimmungen zueinander eine Differenz >5% vorwiesen, wurden diese Ergebnisse nicht verwertet.

#### **2.1.6. Durchführung und Messung des US Biological Sandwich-ELISAs für TNF- $\alpha$**

Die Durchführung und entsprechenden Vorbereitungen erfolgten nach Herstellervorgabe.

#### Vorbereitung des Waschpuffers:

Der 20-fach konzentrierte Waschpuffer wurde mit ddH<sub>2</sub>O verdünnt.

#### Vorbereitung der Standardkurve, sowie des TNF- $\alpha$ -Standards:

Die Standardreihe ist eine Verdünnungsreihe von Tube S1 bis S8 mit gleichmäßig abfallender Entzündungsmediator-Konzentration. Verdünnt wurde mit „Calibrator Diluent 2“. Es wurden 500 µl in Tube S2 bis S8 vorgelegt. Die S1 Probe konnte direkt aus der Standardlösung entnommen werden.

Der TNF- $\alpha$ -Standard, geliefert als Trockensubstanz, wurde in 2 ml „Calibrator Diluent 2“ gelöst, wodurch eine Konzentration von 1 ng/ml entstand.

Bei dieser Verdünnungsreihe handelte es sich um 1:2 Verdünnungen. Nach kurzem Schütteln (Vortex) zwischen den Verdünnungsschritten wurden immer 500  $\mu$ l vom vorherigen Tube zum nächsten überführt. S8 erhält ausschließlich „Calibrator Diluent 2“, und wurde gleichzeitig als Blank-Wert genutzt (s. Tab. 7).

### ELISA entwickeln:

Die ersten zwei Reihen der 96-Wellplatte wurden mit jeweils 100  $\mu$ l der Standardreihe als Doppelbestimmung verwendet.

Die Überstände aus den Reaktionsansätzen der Blutproben wurden nach vorher gefertigten Pipettierskizzen nach kurzem Schütteln (Vortex) und eventuellen Verdünnungen, doppelt zu je 100  $\mu$ l aufgetragen, mit einer Plastikfolie abgedeckt und für eine Stunde bei Raumtemperatur inkubiert.

Anschließend wurden 50  $\mu$ l Biotin pro Well hinzupipettiert, erneut mit einer Plastikfolie abgedeckt und für eine Stunde bei Raumtemperatur auf einem Schüttelinkubator inkubiert.

Im weiteren Verlauf wurden die Wells der Platte fünf Mal mit 300  $\mu$ l Waschpuffer gewaschen und anschließend mit 100  $\mu$ l Avidin (HRP), geschützt mit einer Plastikfolie, bei Raumtemperatur für eine Stunde inkubiert.

Erst 15 Minuten vor Ablauf der Inkubation wurde die Substratlösung vorbereitet, indem Lösung A und B in gleichen Mengen zusammengemixt wurden.

Nach der Inkubation werden die Wells erneut fünf Mal mit 300  $\mu$ l Waschpuffer gewaschen und anschließend mit 100  $\mu$ l Substratlösung pro Well versehen, mit einer Plastikfolie geschützt und für 15 Minuten bei Raumtemperatur entwickelt.

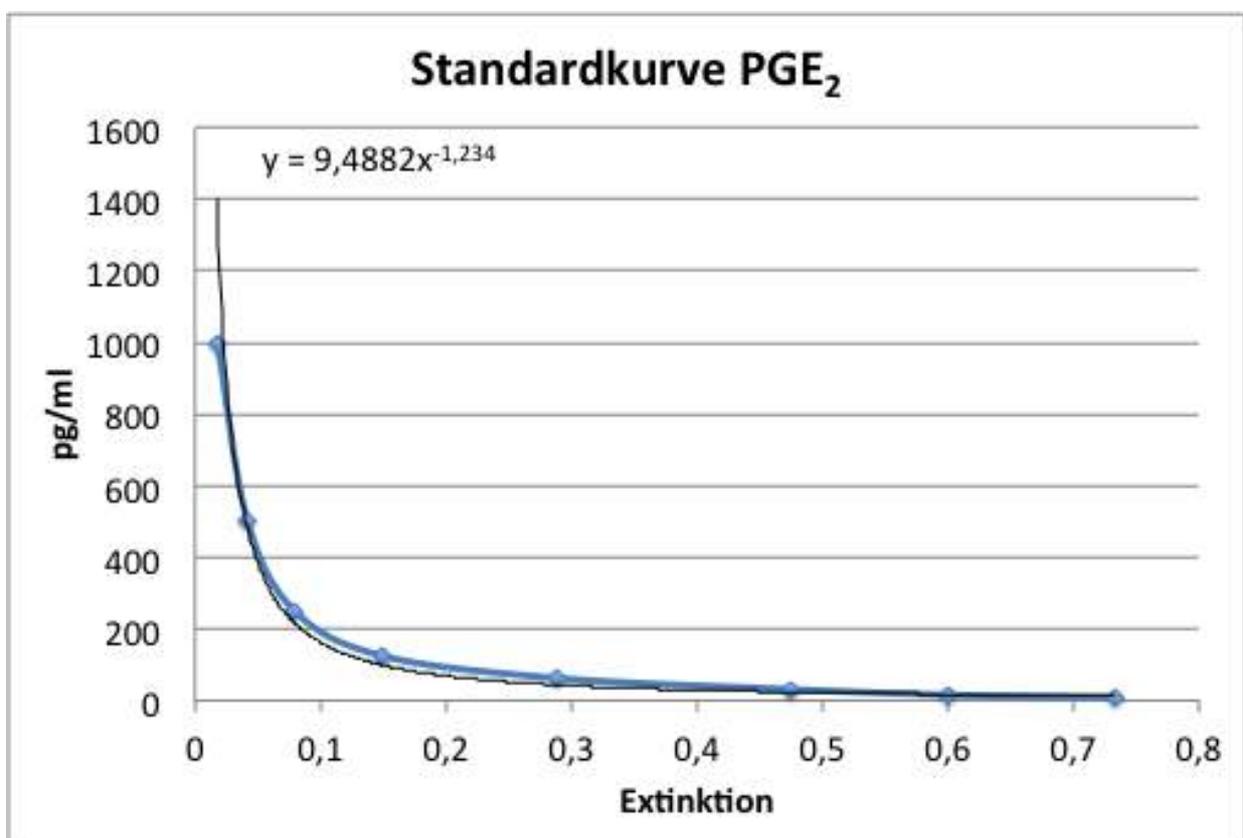
Zum Beenden der Reaktion wurden 100  $\mu$ l Stopplösung hinzupipettiert. Innerhalb der nächsten 30 Minuten musste die Extinktion photometrisch bei 450 nm gemessen werden.

Die einzelnen Messwerte konnten im Anschluss mithilfe der Standardkurve direkt in Entzündungsmediator-Konzentrationen umgewandelt werden, sodass resultierende Entzündungsförderungen bzw. -hemmungen der getesteten Substanzen sichtbar wurden.

### III Ergebnisse

#### 1. Vorversuche - Grundgerüstparameter

Alle gemessenen Extinktionen wurden mit Hilfe der Standardkurve des jeweils verwendeten Kits, nach Abzug des Blankwertes, in die entsprechenden Konzentrationen (pg/ml) der Entzündungsmediatoren umgerechnet. Die Standardkurven, siehe Abb. 15 bis 18, sind als Beispiel zu sehen. Wegen der hohen Kosten der Kits konnten jeweils nur wenige Messpunkte pro Entzündungsmediator bestimmt und die einzelnen Messungen nicht mehrfach wiederholt werden.



**Abb. 15 Standardkurve eines PGE<sub>2</sub>-Kits**

Anhand der gemessenen Extinktionen konnte mithilfe der eingefügten Trendlinie (schwarz) die PGE<sub>2</sub>-Konzentration errechnet werden. Die Versuchsansätze wurden entsprechend verdünnt, sodass die gemessenen Extinktionswerte sich nicht im Randbereich der Standardkurve befanden.

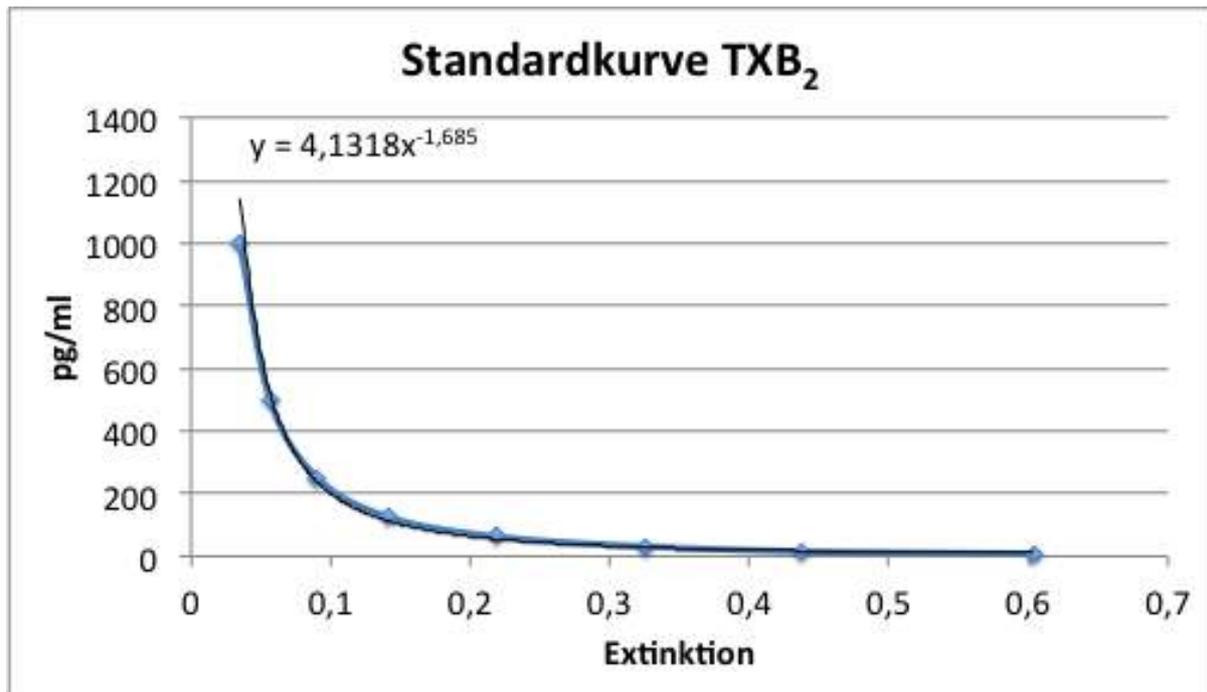


Abb. 16 Standardkurve eines TXB<sub>2</sub>-Kits

Anhand der gemessenen Extinktionen konnte mithilfe der eingefügten Trendlinie (schwarz) die TXB<sub>2</sub>-Konzentration errechnet werden. Die Versuchsansätze wurden entsprechend verdünnt, sodass die gemessenen Extinktionswerte sich nicht im Randbereich der Standardkurve befanden.

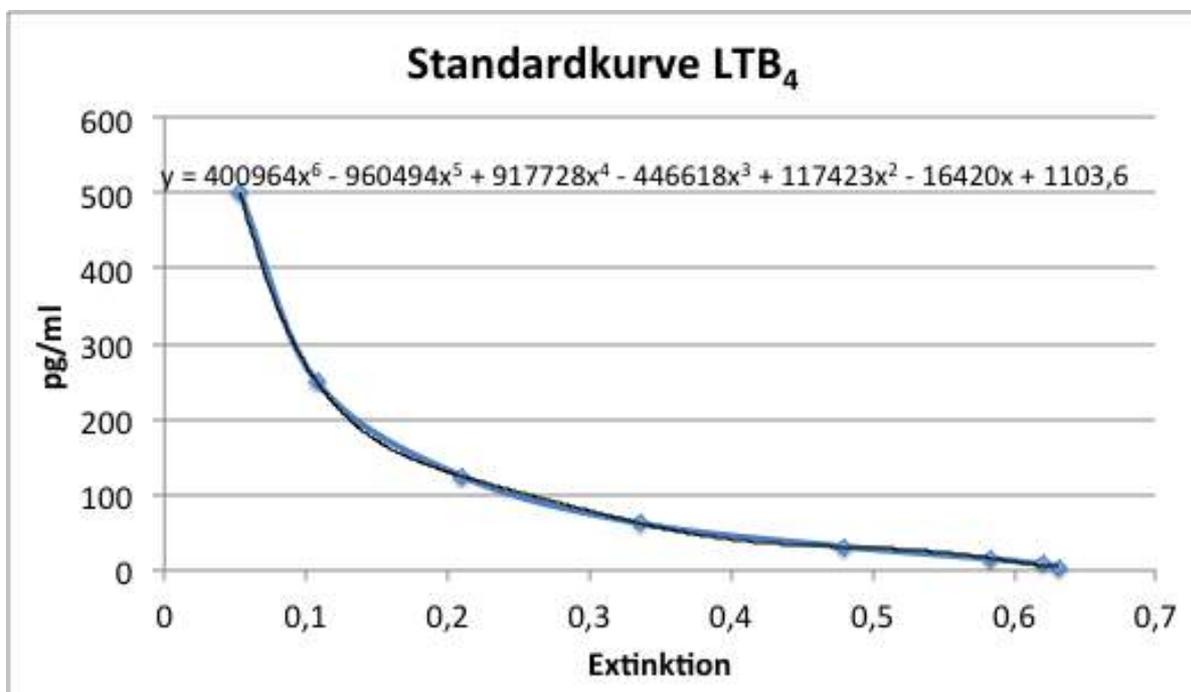
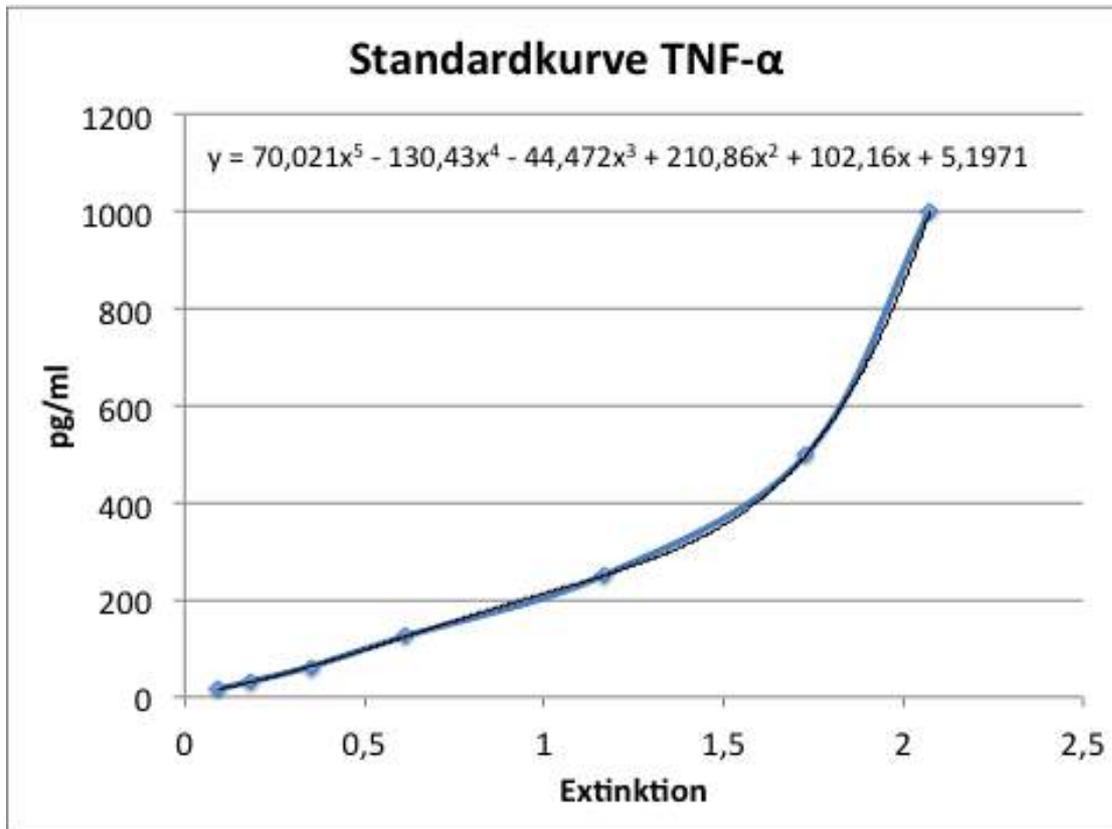


Abb. 17 Standardkurve eines LTB<sub>4</sub>-Kits

Anhand der gemessenen Extinktionen konnte mithilfe der eingefügten Trendlinie (schwarz) die LTB<sub>4</sub>-Konzentration errechnet werden. Die Versuchsansätze wurden entsprechend verdünnt, sodass die gemessenen Extinktionswerte sich nicht im Randbereich der Standardkurve befanden.



**Abb. 18** Standardkurve eines TNF- $\alpha$ -Kits

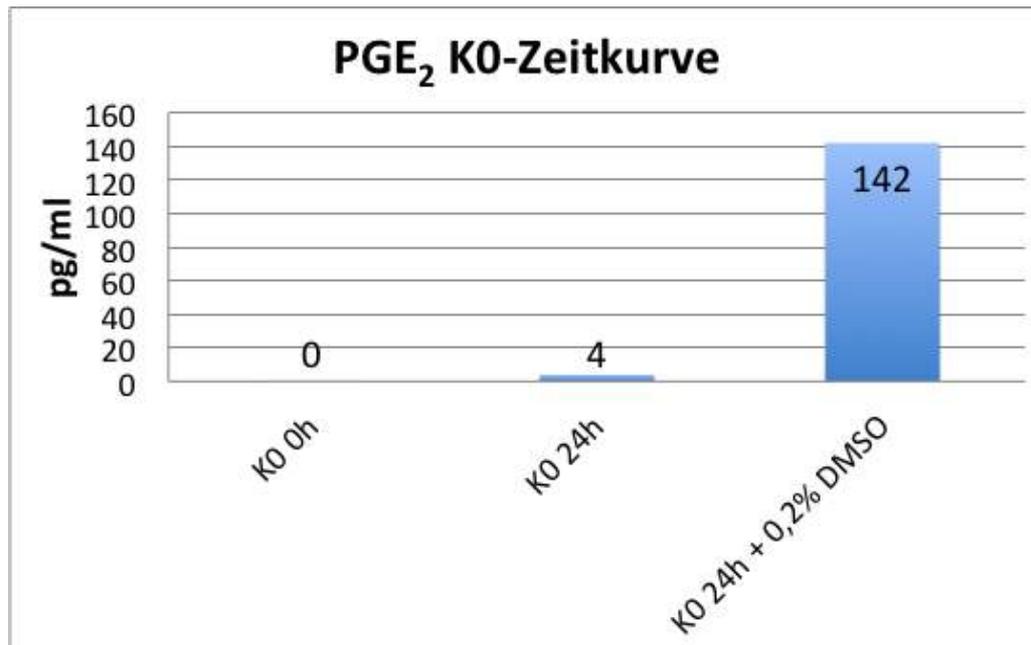
Anhand der gemessenen Extinktionen konnte mithilfe der eingefügten Trendlinie (schwarz) die TNF- $\alpha$ -Konzentration errechnet werden. Die Versuchsansätze wurden entsprechend verdünnt, sodass die gemessenen Extinktionswerte sich nicht im Randbereich der Standardkurve befanden.

### 1.1. K0-Zeitkurven bezogen auf PGE<sub>2</sub>-, TXB<sub>2</sub>- und LTB<sub>4</sub>-Konzentration

Die erhaltenen Entzündungsmediator-Konzentrationen von den K0 Proben (ohne zusätzlicher Stimulation) wurden übersichtshalber auf 0 pg/ml bei 0 h Inkubationszeit umgerechnet, um den Verlauf möglicher Konzentrationsveränderungen unterschiedlicher Inkubationszeiten besser darstellen zu können.

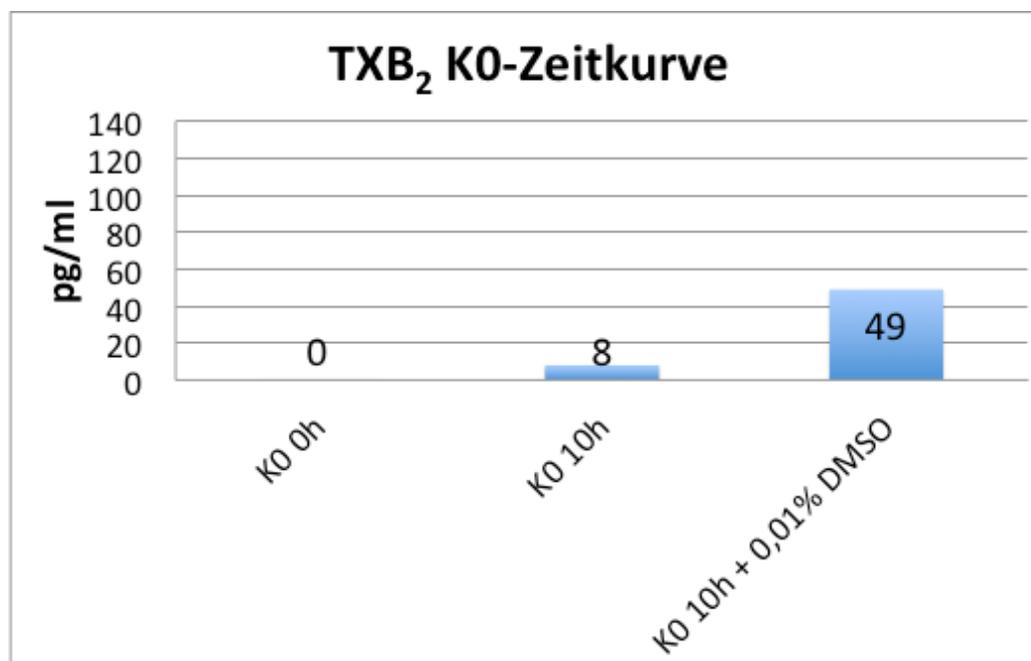
Das humane Vollblut ohne zusätzliche Stimulierung (K0 Probe), weist unter den vorliegenden Versuchsbedingungen über einen Zeitraum von bis zu 24 h keine Veränderung der Entzündungsmediator-Konzentrationen PGE<sub>2</sub> und LTB<sub>4</sub> auf (s. Abb. 19 und 21). Bei einer zusätzlichen Zugabe von 0,2% DMSO erhöht sich die PGE<sub>2</sub>-Konzentration auf das ca. 8-fache (s. Abb. 19).

Im Zeitverlauf von 10 h zeigt sich ein geringfügiger Anstieg der TXB<sub>2</sub>-Konzentration (s. Abb. 20). Bei einer zusätzlichen Zugabe von 0,01% DMSO erhöht sich die TXB<sub>2</sub>-Konzentration auf das ca. 2,5-fache (s. Abb. 20). Aufgrund der bereits gesichteten entzündungsfördernden Wirkung von DMSO bei PGE<sub>2</sub> und TXB<sub>2</sub>, wurde auf die Messung beim LTB<sub>4</sub>-Kit verzichtet.



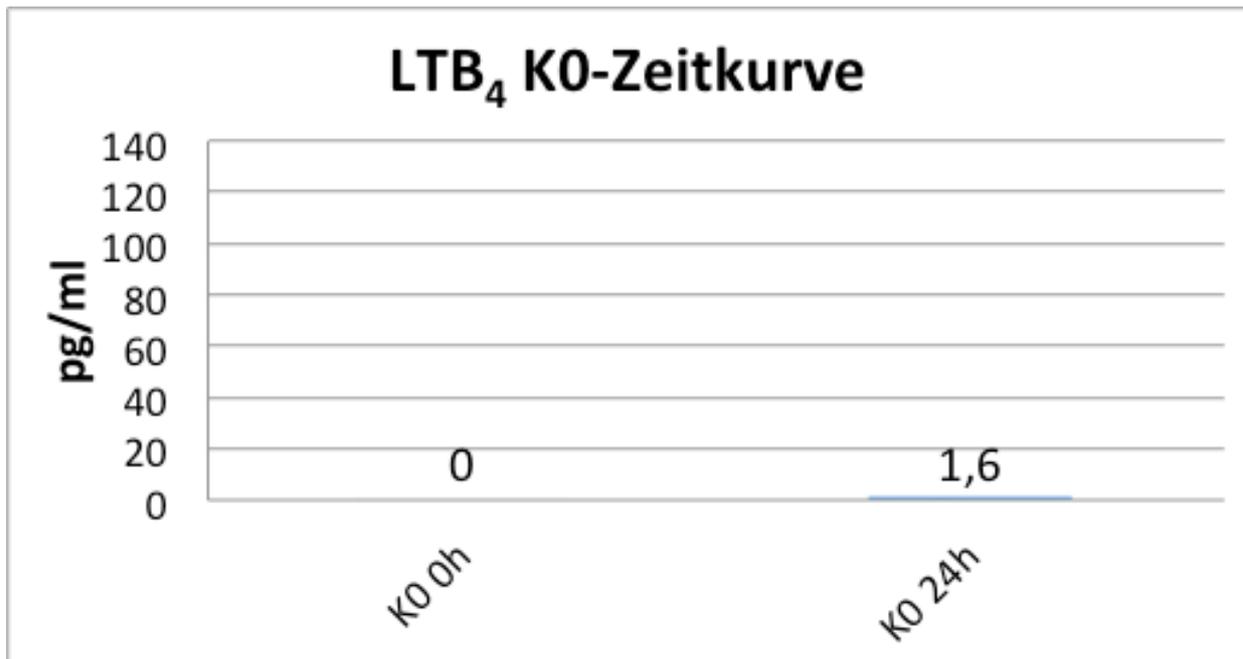
**Abb. 19 PGE<sub>2</sub> K0-Zeitkurve**

Dargestellt sind die PGE<sub>2</sub>-Konzentrationen einer K0-Blutprobe (K0= Kontrollprobe ohne zusätzliche Stimulierung), nach Messung mit dem Cayman ELISA Kit. Für jeden Ansatz wurden 800 µl RPMI-Medium, versetzt mit 2,5 IU/ml Heparin sowie 200 µl Vollblut verwendet und anschließend bei 37°C und 10% CO<sub>2</sub> für 0 h und 24 h inkubiert. Zudem sind die Auswirkungen einer Zugabe von 0,2% DMSO, als Lösungsmittel dargestellt.



**Abb. 20 TXB<sub>2</sub> K0-Zeitwerte**

Dargestellt sind die TXB<sub>2</sub>-Konzentrationen einer K0-Blutprobe (K0= Kontrollprobe ohne zusätzliche Stimulierung), nach Messung mit dem Cayman ELISA Kit. Für jeden Ansatz wurden 800 µl RPMI-Medium, versetzt mit 2,5 IU/ml Heparin sowie 200 µl Vollblut verwendet und anschließend bei 37°C und 10% CO<sub>2</sub> für 0 h und 10 h inkubiert. Zudem sind die Auswirkungen einer Zugabe von 0,01% DMSO als Lösungsmittel dargestellt.



**Abb. 21 LTB<sub>4</sub> K0-Zeitkurve**

Dargestellt sind die LTB<sub>4</sub>-Konzentrationen einer K0-Blutprobe (K0= Kontrollprobe ohne zusätzliche Stimulierung), nach Messung mit dem Cayman ELISA Kit. Für jeden Ansatz wurden 800 µl RPMI-Medium, versetzt mit 2,5 IU/ml Heparin sowie 200 µl Vollblut verwendet und anschließend bei 37°C und 10% CO<sub>2</sub> für 0 h und 24 h inkubiert.

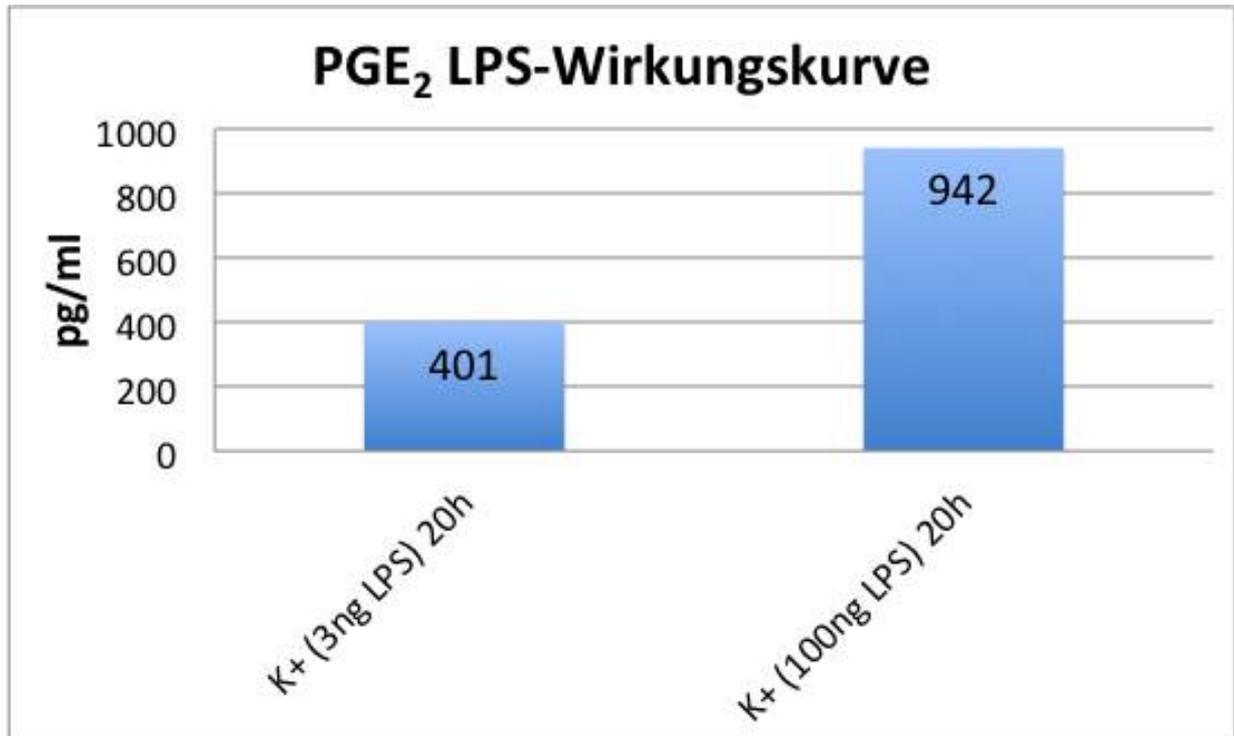
## 1.2. Stimulation der Entzündungsmediatoren PGE<sub>2</sub>, TXB<sub>2</sub>, LTB<sub>4</sub> und TNF-α durch LPS oder CaIP

Für die Stimulation von LTB<sub>4</sub> wurde CaIP verwendet. Alle anderen Mediatoren wurden durch LPS stimuliert. Alle Entzündungsmediatoren konnten durch die entsprechenden Induktoren stimuliert werden. Von den erhaltenen Zytokinkonzentrationen nach Stimulation (K+ Probe) wurden die Basiswerte ohne Stimulation (K0 Probe) abgezogen, um die Werte trotz Tageschwankungen vergleichbar zu machen. Die verwendete Inkubationszeit nach der Stimulierung ist der Beschriftung in den Abbildungen zu entnehmen.

Die gemessenen Konzentrationen wurden nur an einem Probanden ermittelt und dienen lediglich der Orientierung.

### 1.2.1. Stimulation von PGE<sub>2</sub> durch LPS

Es erfolgte eine dosisabhängige Steigerung der PGE<sub>2</sub>-Bildung bei zunehmender LPS-Konzentration. Aufgrund fehlender Verdünnungen konnten die Konzentrationen oberhalb 100 ng LPS bei einer Inkubationszeit von 20 h nicht gemessen werden (s. Abb. 22).

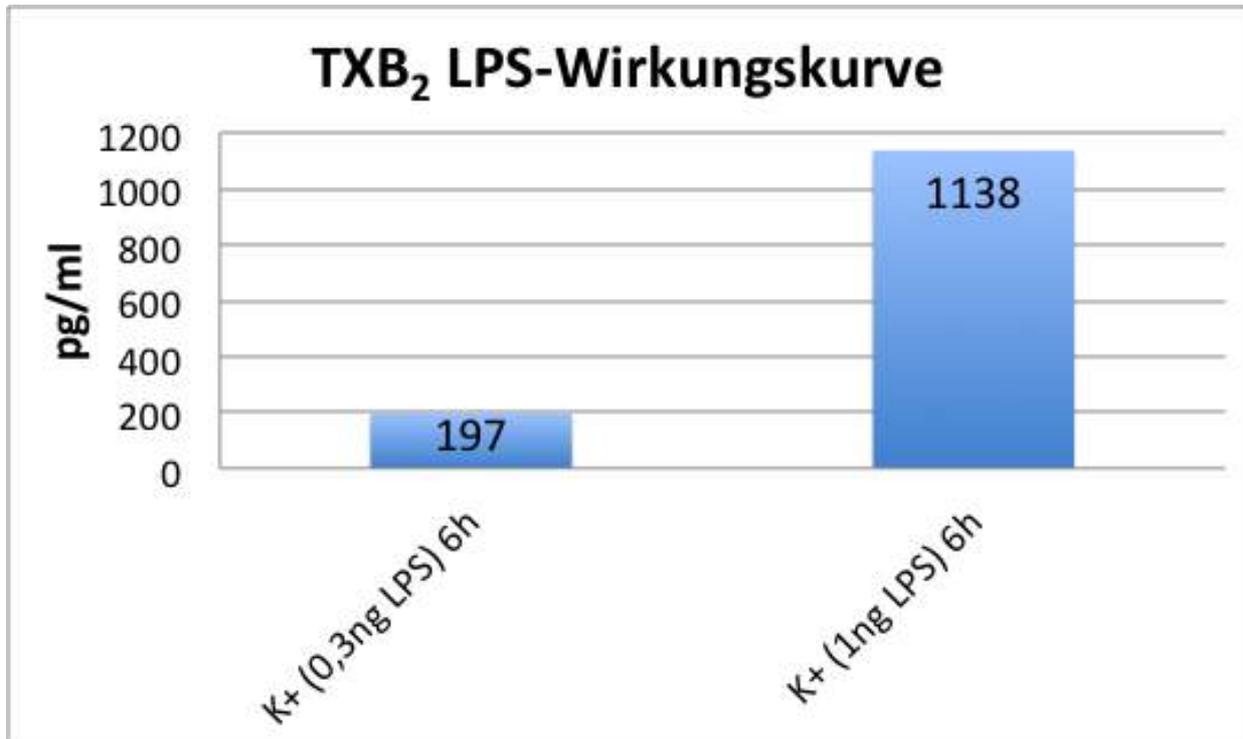


**Abb. 22** PGE<sub>2</sub>-Konzentrationen, stimuliert durch LPS

Gemessene PGE<sub>2</sub>-Konzentration im Überstand, mit dem Cayman ELISA Kit, an einem Probanden. Für jeden Ansatz wurden 800 µl RPMI-Medium, versetzt mit 2,5 IU/ml Heparin sowie 200µl Vollblut verwendet und für 4h vorinkubiert. Dargestellt sind die PGE<sub>2</sub>-Konzentrationen nach Stimulierung mit 3 ng und 100 ng LPS mit anschließender 20-stündiger Inkubation, bei 37°C und 10% CO<sub>2</sub>.

### 1.2.2. Stimulation von TXB<sub>2</sub> durch LPS

Abbildung 23 zeigt die Zunahme der TXB<sub>2</sub>-Konzentration nach Stimulierung von Vollblut mit 1 ng LPS. Aufgrund fehlender Verdünnungen konnten die Konzentrationen oberhalb 1 ng LPS bei einer Inkubationszeit von 6 h nicht gemessen werden.



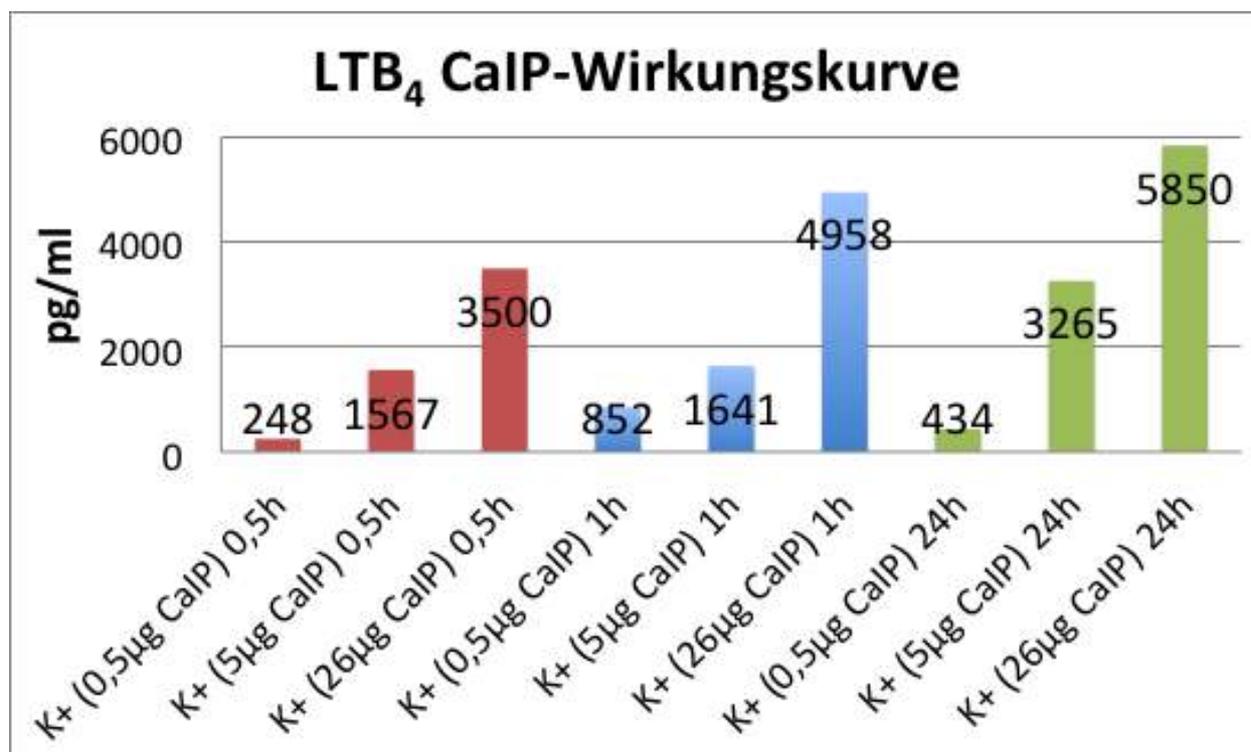
**Abb. 23** TXB<sub>2</sub>-Konzentrationskurve, stimuliert durch LPS

Gemessene TXB<sub>2</sub>-Konzentration, im Überstand, mit dem Cayman ELISA Kit, an einem Probanden. Für jeden Ansatz wurden 800 µl RPMI-Medium, versetzt mit 2,5 IU/ml Heparin sowie 200 µl Vollblut verwendet und für 4 h vorinkubiert. Dargestellt sind die TXB<sub>2</sub>-Konzentrationen nach Stimulierung mit 0,3 ng und 1 ng LPS mit anschließender 6-stündiger Inkubation, bei 37°C und 10% CO<sub>2</sub>.

### 1.2.3. Stimulation von LTB<sub>4</sub> durch CaIP

Es ist eine Zunahme der LTB<sub>4</sub>-Konzentration bei zunehmender CaIP-Konzentration und gleichbleibender Inkubationszeit zu beobachten (s. Abb. 24). Die Steigerungen der LTB<sub>4</sub>-Konzentration waren je nach Wahl der CaIP-Konzentration und der Inkubationszeit unterschiedlich.

Abbildung 25 ist eine graphische Umwandlung der Abbildung 24, welche die LTB<sub>4</sub>-Konzentrationen im Verlauf steigender Inkubationszeiten, bei gleichbleibenden CaIP-Konzentrationen veranschaulicht.



**Abb. 24** LTB<sub>4</sub>-Konzentrationen, stimuliert durch CaIP

Gemessen wurden die LTB<sub>4</sub>-Konzentrationen im Überstand, mit dem Cayman ELISA Kit, an einem Probanden. Für jeden Ansatz wurden 800 µl RPMI-Medium, versetzt mit 2,5 IU/ml Heparin sowie 200 µl Vollblut verwendet und für 4 h vorinkubiert. Dargestellt sind die LTB<sub>4</sub>-Konzentrationen nach Stimulierung mit 0,5 µg, 5 µg und 26 µg CaIP und anschließender Inkubation von 0,5 h (rot), 1 h (blau) und 24 h (grün), bei 37°C und 10% CO<sub>2</sub>.

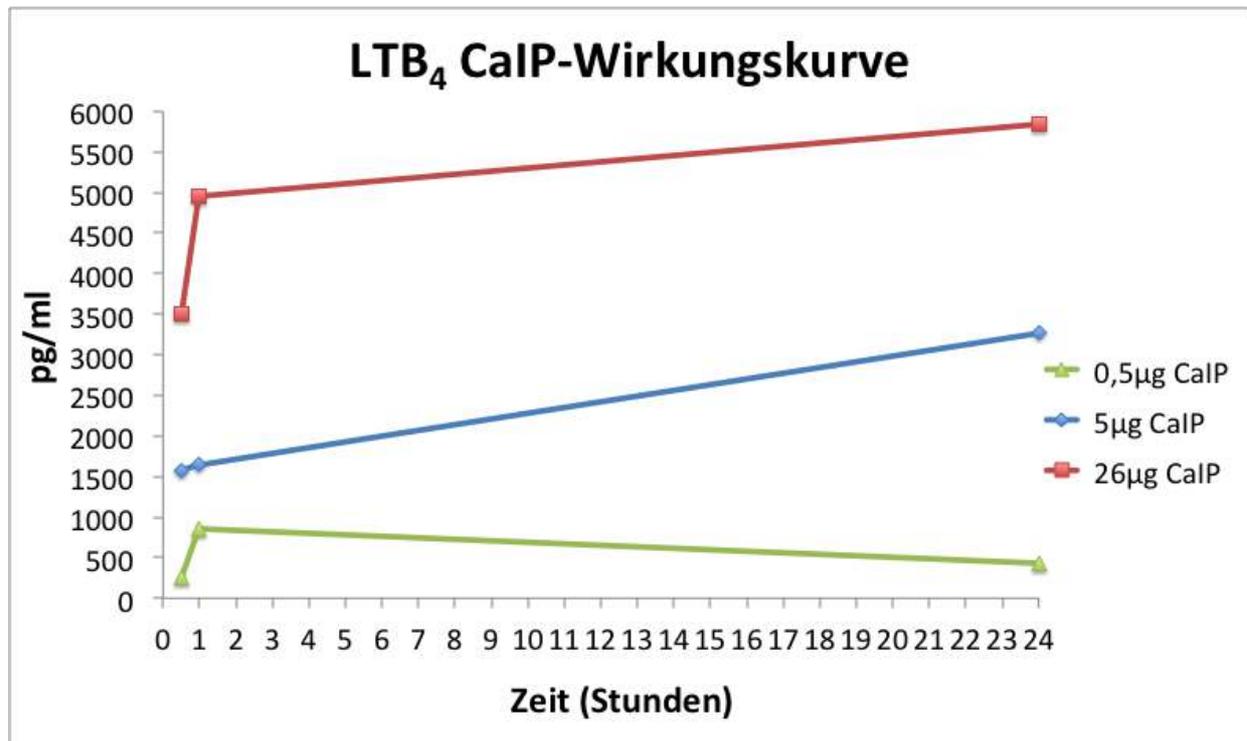
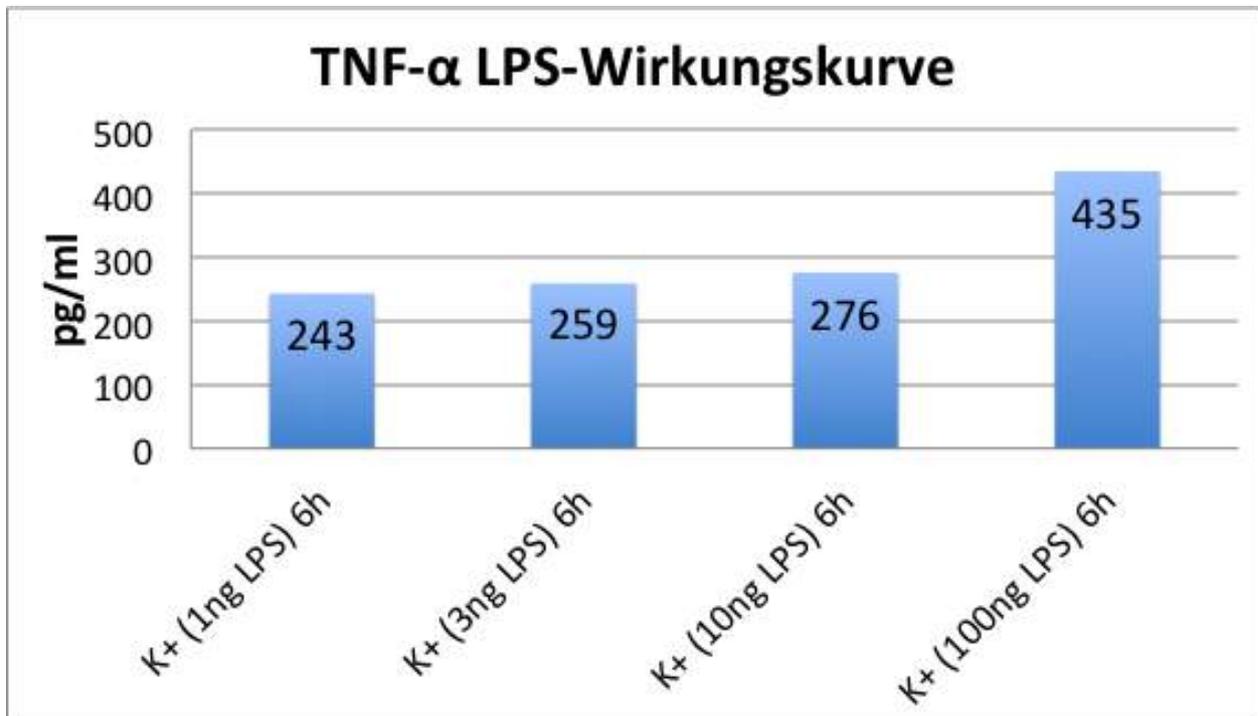


Abb. 25 Grafische Umwandlung der LTB<sub>4</sub>-Konzentrationskurve aus Abb. 24

Gemessen wurden die LTB<sub>4</sub>-Konzentrationen im Überstand, mit dem Cayman ELISA Kit, an einem Probanden. Für jeden Ansatz wurden 800 µl RPMI-Medium, versetzt mit 2,5 IU/ml Heparin sowie 200 µl Vollblut verwendet und für 4 h vorinkubiert. Dargestellt sind die LTB<sub>4</sub>-Konzentrationen nach Stimulierung mit 0,5 µg, 5 µg und 26 µg CaIP und anschließender Inkubation von 0,5 h, 1 h und 24 h, bei 37°C und 10% CO<sub>2</sub>. In dieser Abbildung sind die jeweiligen Stimulierungsmengen im Inkubationsverlauf sichtbar.

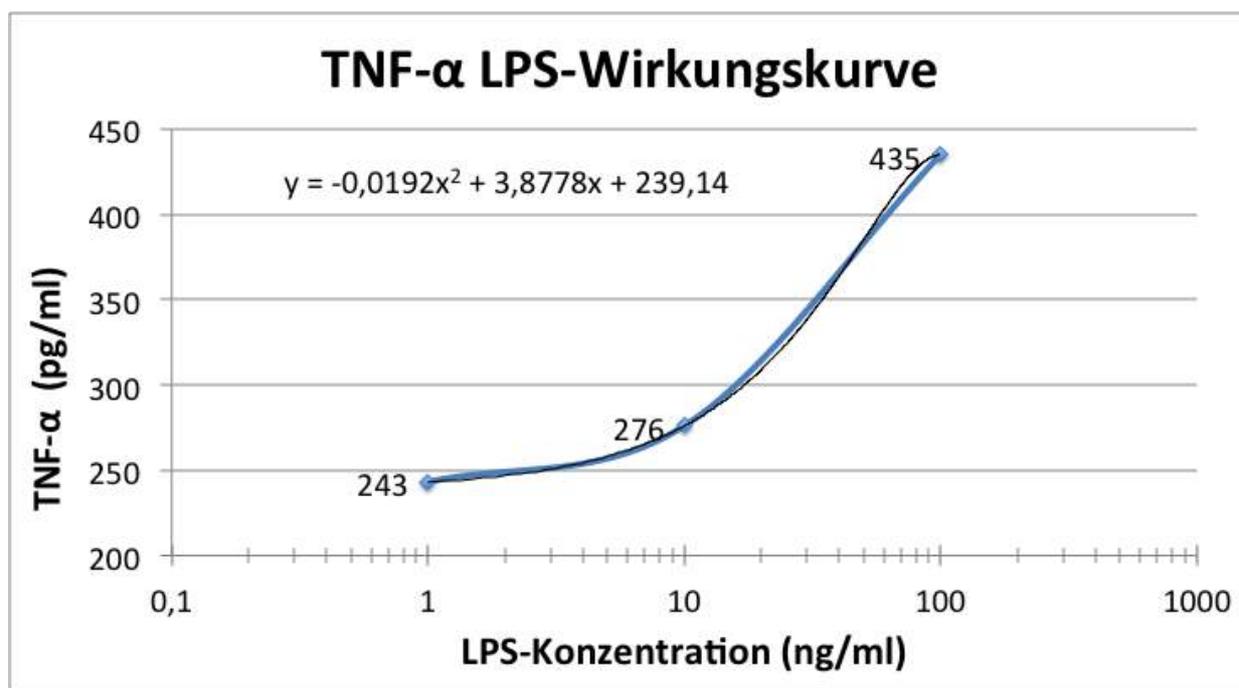
#### 1.2.4. Stimulation von TNF- $\alpha$ durch LPS

Es ist eine zunehmende TNF- $\alpha$ -Konzentration bei zunehmender LPS-Stimulierung zu verzeichnen (s. Abb. 26 und 27).



**Abb. 26** TNF- $\alpha$ -Konzentrationskurve, stimuliert durch LPS

Gemessen wurde die TNF- $\alpha$ -Konzentration im Überstand mit dem US Biomol ELISA Kit, an einem Probanden. Für jeden Ansatz wurden 800  $\mu$ l RPMI-Medium, versetzt mit 2,5 IU/ml Heparin sowie 200  $\mu$ l Vollblut verwendet und für 4 h vorinkubiert. Dargestellt sind die TNF- $\alpha$ -Konzentrationen nach Stimulierung mit 1 ng, 3 ng, 10 ng und 100 ng LPS und anschließender 6-stündiger Inkubation, bei 37°C und 10% CO<sub>2</sub>.



**Abb. 27 Kurvenanpassung der Daten aus Abb. 26**

Gemessen wurde die TNF- $\alpha$ -Konzentration im Überstand mit dem US Biomol ELISA-Kit, an einem Probanden. Für jeden Ansatz wurden 800  $\mu$ l RPMI-Medium, versetzt mit 2,5 IU/ml Heparin sowie 200  $\mu$ l Vollblut, verwendet und für 4 h vorinkubiert. Dargestellt sind die TNF- $\alpha$ -Konzentrationen nach Stimulierung mit 1 ng, 3 ng, 10 ng und 100 ng LPS und anschließender 6-stündiger Inkubation, bei 37°C und 10% CO<sub>2</sub>. Zusätzlich eingefügte Trendlinie in schwarz.

### 1.2.5. Zusammenfassung der Stimulationsversuche

Die optimalen Bedingungen für die Stimulation der Entzündungsmediatoren sind der nachfolgenden Tabelle (Tab. 10) zu entnehmen. Die folgenden Studien orientieren sich an dieser Tabelle. Im Folgenden sind diese Stimulierungen als K+ Probe für die jeweiligen Entzündungsmediatoren anzusehen.

*Tabelle 10 Übersicht der optimalen Stimulations-Konzentration und Inkubationszeit der Entzündungsmediatoren*

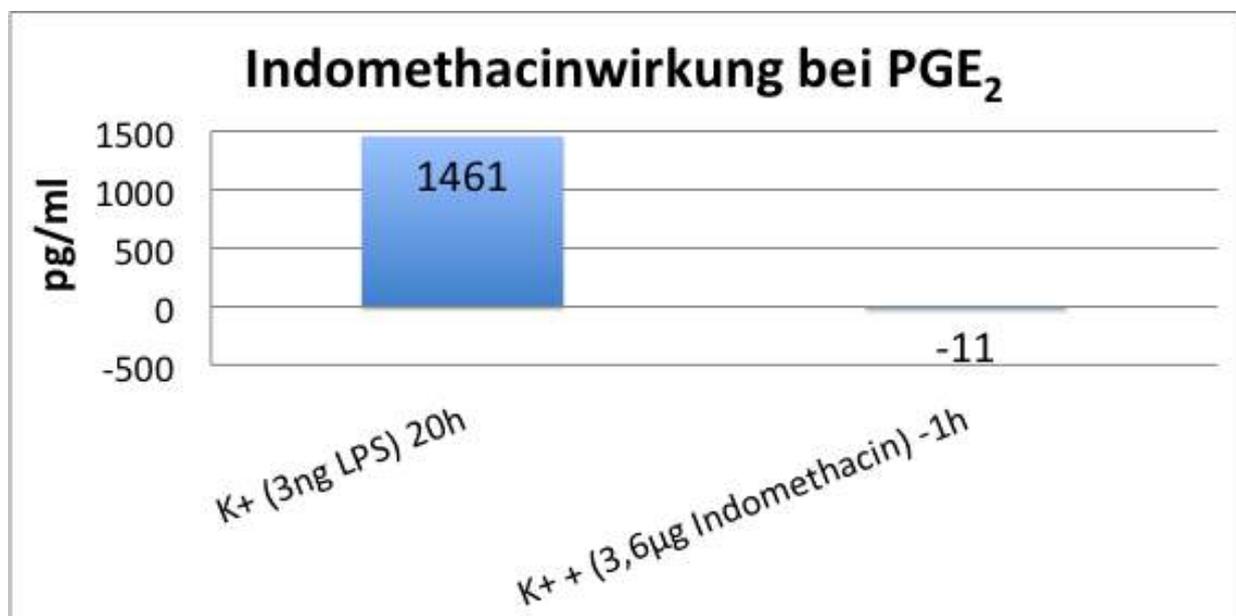
Entzündungsmediator	Stimulator	Stimulator-Konzentration bei 1 ml Ansatz-Gesamtvolumen	Zeit (h)
PGE <sub>2</sub>	LPS	3 ng	20
TXB <sub>2</sub>	LPS	1 ng	6
LTB <sub>4</sub>	CaIP	5 $\mu$ g	1
TNF- $\alpha$	LPS	1 ng	6

### 1.3. Hemmung der PGE<sub>2</sub>-, TXB<sub>2</sub>- und LTB<sub>4</sub>-Freisetzung aus Vollblut durch Indomethacin oder Zileuton

Von den erhaltenen Zytokinkonzentrationen nach Stimulation (K+ Probe) wurden die Basiswerte ohne Stimulation (K0 Probe) abgezogen, um die Werte trotz Tagesschwankungen vergleichbar zu machen. Die verwendete Inkubationszeit nach der Stimulierung ist der Beschriftung in den Abbildungen zu entnehmen. Die Hemmsubstanzen wurden den Ansätzen zu einer bestimmten Zeit vor der jeweiligen Stimulation hinzupipettiert (s. Tab. 11), sodass in den Abbildungen diese Zugabezeit mit einem Minus vorab (-h) gekennzeichnet wurde. Die gemessenen Konzentrationen wurden nur an einem Probanden ermittelt und dienen lediglich zur Orientierung.

#### 1.3.1. Hemmung der PGE<sub>2</sub>-Konzentration durch Indomethacin

Durch 3,6 µg Indomethacin erfolgte eine komplette Hemmung der LPS induzierten PGE<sub>2</sub>-Freisetzung sowie eine Reduktion von 11 pg der spontanen PGE<sub>2</sub>-Freisetzung von der im Vorfeld abgezogenen K0-Probe (s. Abb. 28). Derselbe Proband zeigte im Vergleich zum Vorversuch (s. Abb. 22) bei derselben Testdurchführung eine über dreifach höhere Konzentration von PGE<sub>2</sub>. Es zeigte sich, dass die Ausgangsentzündungswerte im Blut vom Tageszustand abhängig sind.

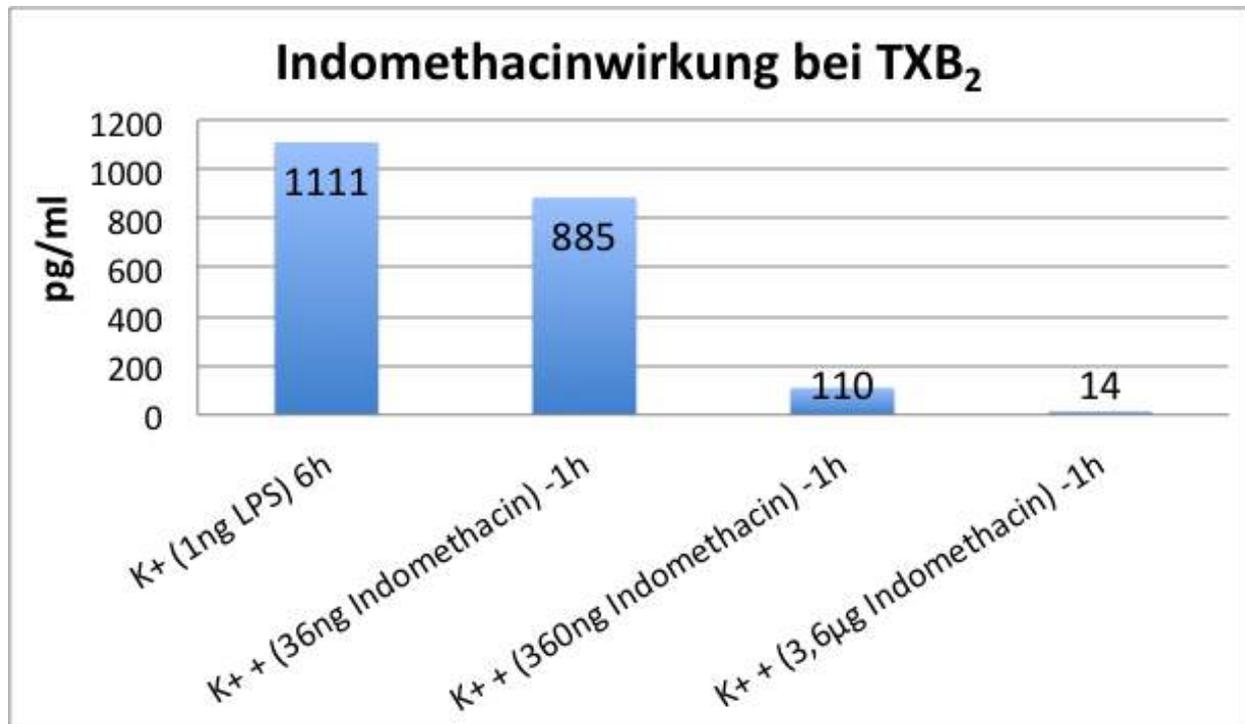


**Abb. 28** Wirkungskurve von Indomethacin bezogen auf die PGE<sub>2</sub>-Konzentration

Für jeden Ansatz wurden 800 µl RPMI-Medium, versetzt mit 2,5 IU/ml Heparin sowie 200 µl Vollblut verwendet und für 4 h vorinkubiert. Bei der K++ Probe wurde dem Ansatz (Gesamtvolumen 1 ml) 1 h vor Stimulierung 3,6 µg Indomethacin hinzupipettiert. Anschließend erfolgte die Stimulierung mit 3 ng LPS und weiterer 20-stündiger Inkubation bei 37°C und 10% CO<sub>2</sub>. Gemessen wurden die PGE<sub>2</sub>-Konzentrationen im Überstand mit dem Cayman ELISA Kit.

### 1.3.2. Hemmung der TXB<sub>2</sub>-Konzentration durch Indomethacin

Es zeigte sich eine konzentrationsabhängige Hemmung der TXB<sub>2</sub>-Produktion, durch 0,36 µg Indomethacin bereits um 90% (s. Abb. 29).

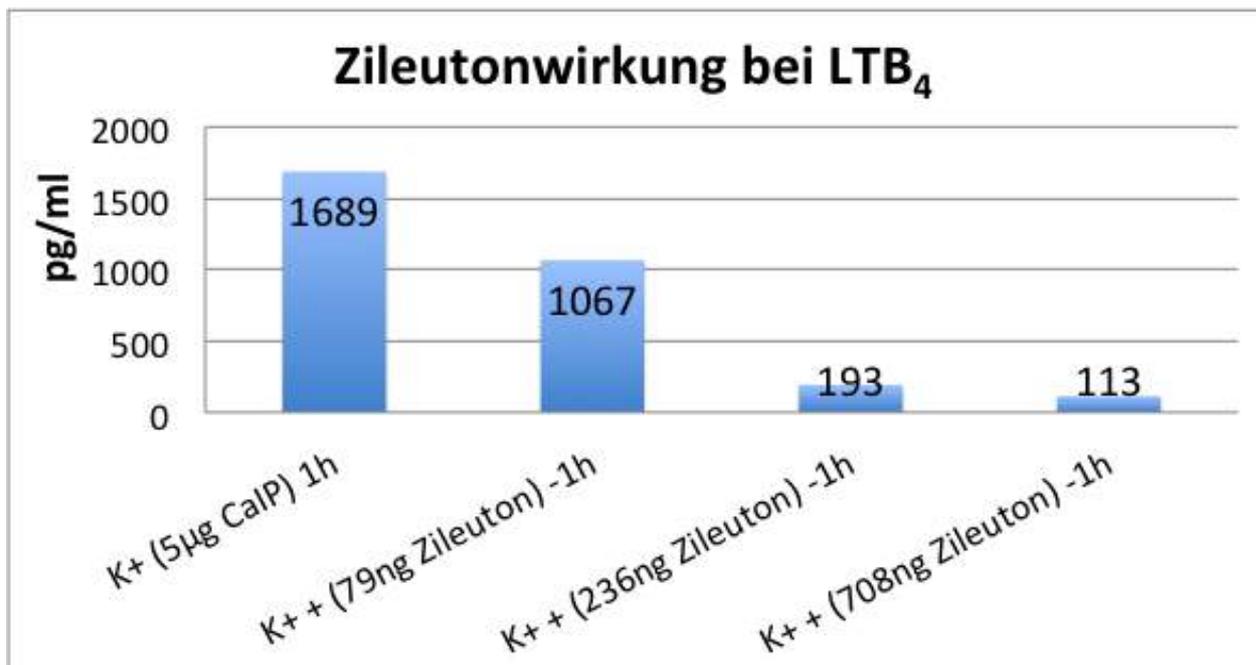


**Abb. 29** Wirkungskurve von Indomethacin bezogen auf die TXB<sub>2</sub>-Konzentration

Für jeden Ansatz wurden 800 µl RPMI-Medium, versetzt mit 2,5 IU/ml Heparin sowie 200 µl Vollblut verwendet und für 4 h vorinkubiert. Bei den K++ Proben wurde den Ansätzen (Gesamtvolumen jeweils 1 ml) 1 h vor Stimulierung 36 ng, 360 ng bzw. 3,6 µg Indomethacin hinzupipettiert. Anschließend erfolgte die Stimulierung mit 1 ng LPS und weiterer 6-stündiger Inkubation bei 37°C und 10% CO<sub>2</sub>. Gemessen wurden die TXB<sub>2</sub>-Konzentrationen im Überstand mit dem Cayman ELISA Kit.

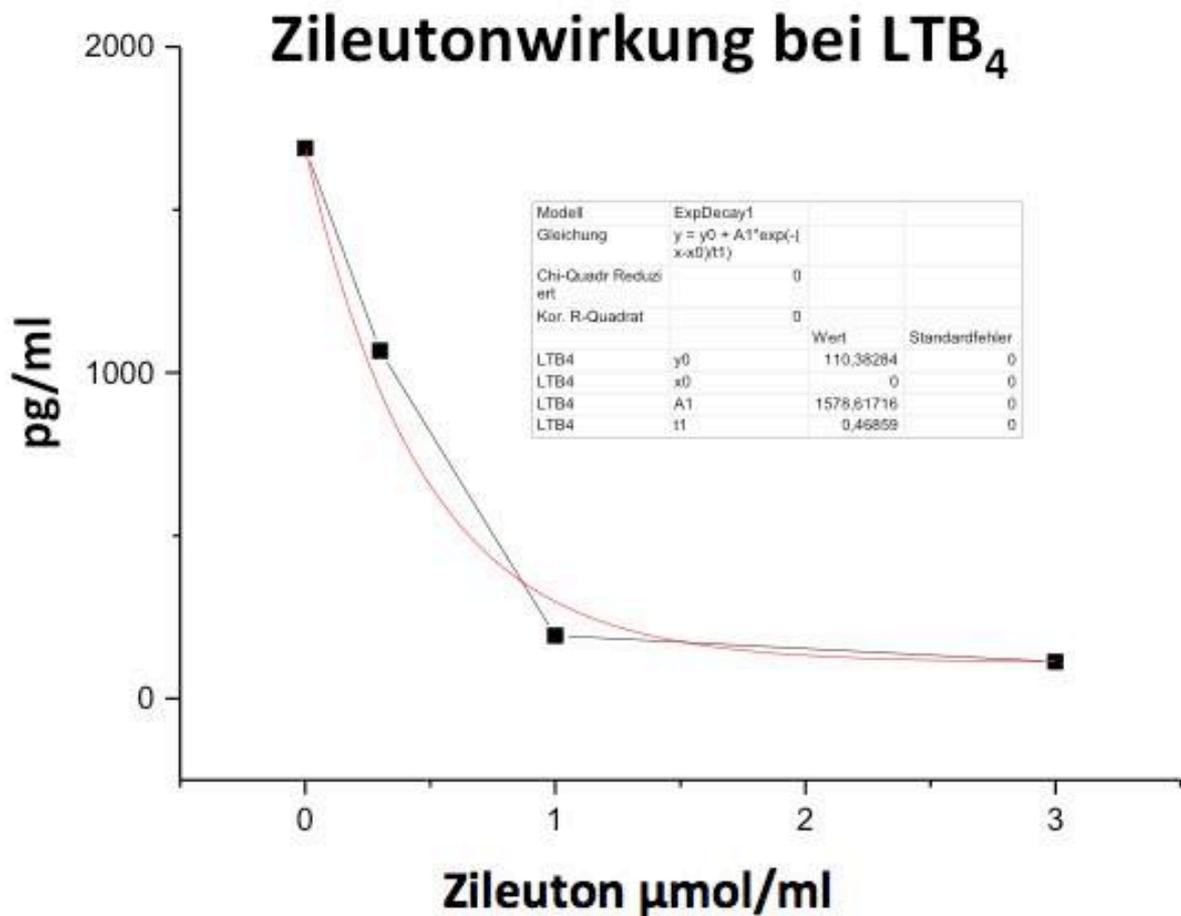
### 1.3.3. Hemmung der LTB<sub>4</sub> Konzentration durch Zileuton

Es zeigte sich eine konzentrationsabhängige Hemmung der LTB<sub>4</sub>-Produktion (s. Abb. 30). Wie aus der Abb. 31 hervorgeht, folgte die Hemmung in etwa einer Kinetik erster Ordnung, was aus dem exponentiellen Abfall der LTB<sub>4</sub>-Konzentration bei steigender Zileuton-Konzentration hervorgeht. Dieses bedeutet, dass die Komplexbildung zwischen Zileuton und dem Enzym Lipoxigenase dem Massenwirkungsgesetz unterliegt.



**Abb. 30 Wirkungskurve von Zileuton bezogen auf die LTB<sub>4</sub>-Konzentration**

Für jeden Ansatz (Gesamtvolumen 1 ml) wurden 800 µl RPMI-Medium, versetzt mit 2,5 IU/ml Heparin sowie 200 µl Vollblut verwendet und für 4 h vorinkubiert. Bei den K<sup>++</sup> Proben wurde den Ansätzen 1 h vor Stimulierung 79 ng, 236 ng bzw. 790 ng Zileuton hinzupipettiert. Anschließend erfolgte die Stimulierung mit 5 µg CalP und weiterer einstündiger Inkubation bei 37°C und 10% CO<sub>2</sub>. Gemessen wurden die LTB<sub>4</sub>-Konzentrationen im Überstand mit dem Cayman ELISA Kit.



**Abb. 31 Exponentielle Kurvenanpassung der Daten aus Abb. 30**

Für jeden Ansatz (Gesamtvolumen 1ml) wurden 800  $\mu$ l RPMI-Medium, versetzt mit 2,5 IU/ml Heparin sowie 200  $\mu$ l Vollblut verwendet und für 4 h vorinkubiert. Bei den K<sup>++</sup> Proben wurde den Ansätzen 1 h vor Stimulierung 79 ng, 236 ng bzw. 790 ng Zileuton hinzupipettiert, sodass finale Konzentrationen von 0,3  $\mu$ mol/ml, 1  $\mu$ mol/ml und 3  $\mu$ mol/ml Zileuton vorlagen. Anschließend erfolgte die Stimulierung mit 5  $\mu$ g CaIP und weiterer einstündiger Inkubation bei 37°C und 10% CO<sub>2</sub>. Gemessen wurden die LTB<sub>4</sub>-Konzentrationen im Überstand mit dem Cayman ELISA Kit.

### 1.3.4. Zusammenfassungen der Hemmstoff-Versuche

Die optimalen Bedingungen für die Hemmungen der Stimulation der Entzündungsmediatoren sind der nachfolgenden Tabelle (Tab. 11) zu entnehmen.

*Tabelle 11 Übersicht der optimalen Hemmstoff-Konzentrationen und Inkubationszeiten vor der Stimulation der Entzündungsmediatoren aus Tab. 10*

Entzündungsmediator	Hemmstoff	Finale Hemmstoff-Konzentration bei 1ml Ansatz-Gesamtvolumen	Inkubationszeit vor der Stimulierung
PGE <sub>2</sub>	Indomethacin	3,6 µg	-1 h
TXB <sub>2</sub>	Indomethacin	360 ng	-1 h
LTB <sub>4</sub>	Zileuton	236 ng	-1 h

### 1.4. Bestimmung von PGE<sub>2</sub>-Standardkonzentrationen unter den Bedingungen des kompletten Assays

Um den möglichen Einfluss der Matrix des kompletten Ansatzes inklusive Vollblut auf die Bestimmung von PGE<sub>2</sub> zu ermitteln, wurden der fertigen Reaktionsmischung ohne LPS-Stimulierung (K0 Probe) unterschiedliche Mengen des PGE<sub>2</sub>-Standards zupipettiert. Die erhaltenen Extinktionen wurden mit den gleichen PGE<sub>2</sub>-Standards (ohne die Matrix und Vollblut) verglichen. Bis auf geringe Schwankungen entsprachen die gemessenen Extinktionen beider Ansätze einander. Es ist kein Verlust der PGE<sub>2</sub>-Mediatoren innerhalb von 24 h mit diesem Testverfahren zu vermerken (s. Tab. 12 und Abb. 32).

Tabelle 12 Inversverfahren anhand des Entzündungsmediators  $PGE_2$ 

Mengen von 12,5  $\mu\text{l}$  – 100  $\mu\text{l}$  der  $PGE_2$ -Standardlösung (10 ng/ml) wurden dem Vollblutansatz direkt hinzupipetiert, welches den Mengen der ersten 4 Standardkurvenwerten (S1-S4) entspricht. Nach 24 h Inkubation bei 37°C und 10%  $\text{CO}_2$  wurden die  $PGE_2$ -Konzentrationen mit dem Cayman ELISA Kit gemessen.

Vollblutansatz (K0) mit $PGE_2$ -Standard in $\mu\text{l}$	Extinktion des Vollblutansatzes	$PGE_2$ -Standardkurve (in $\mu\text{l}$ )	Extinktion der Standardkurve
100	0,1565	S1 (100)	0,156
50	0,18	S2 (50)	0,1755
25	0,201	S3 (25)	0,2135
12,5	0,253	S4 (12,5)	0,271

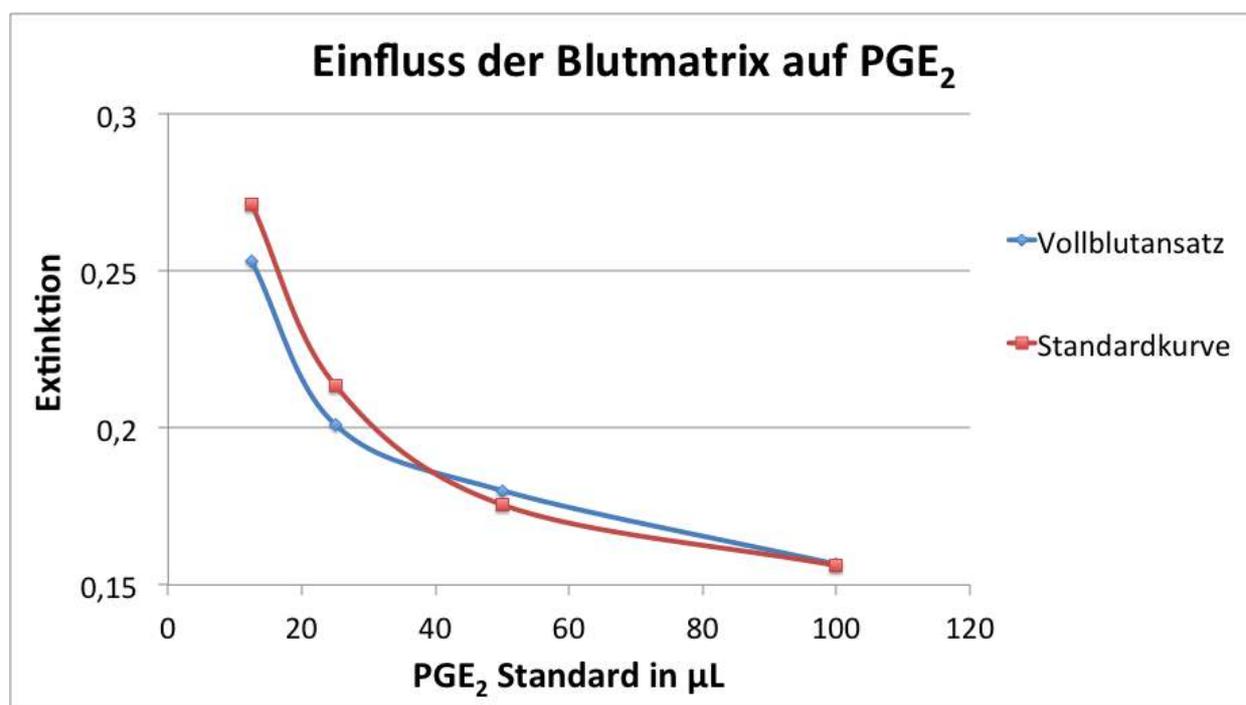


Abb. 32 Grafische Umwandlung der Tabelle 12

Mengen von 12,5  $\mu\text{l}$  – 100  $\mu\text{l}$  der  $PGE_2$ -Standardlösung (10 ng/ml) wurden dem Vollblutansatz direkt hinzupipetiert, welches den Mengen der ersten 4 Standardkurvenwerten (S1-S4) entspricht. Nach 24 h Inkubation bei 37°C und 10%  $\text{CO}_2$  wurden die  $PGE_2$ -Konzentrationen mit dem Cayman ELISA Kit gemessen.

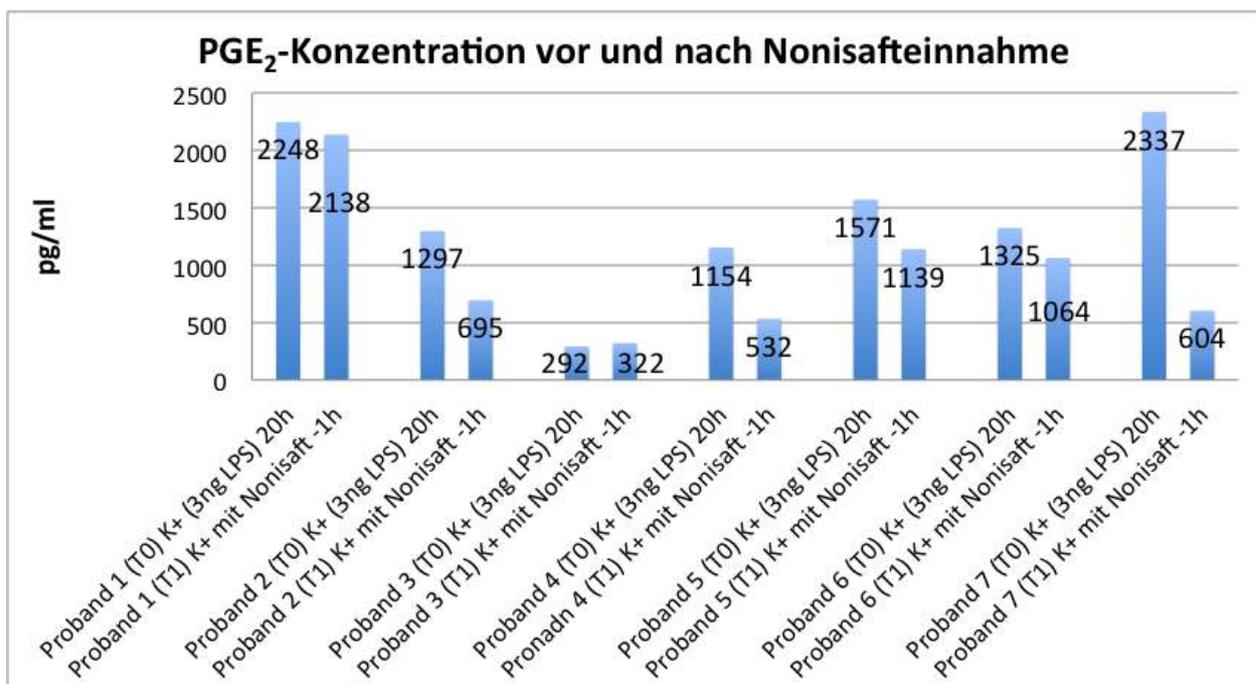
## 2. Ergebnisse der zu quantifizierenden ELISA Tests

Bei den folgenden Pilotstudien wurde bei jeder K+ Probe, der K0-Probenwert bei 0 h Inkubationszeit abgezogen, um die Ergebnisse aller Entzündungsmediatoren-Kits zueinander und untereinander aufgrund unterschiedlicher Ausgangsentzündungswerte vergleichbar zu machen.

### 2.1. *Ex vivo* - *in vitro* Pilotstudie-1: Untersuchung der Konzentrationen der Entzündungsmediatoren vor und nach Nonisafteinnahme

#### 2.1.1. Messung der PGE<sub>2</sub>-Konzentration vor und nach Nonisafteinnahme

Es ist zu vermerken, dass sich die Ausgangskonzentrationen des Entzündungsmediators von Individuum zu Individuum unterschieden. Bei sechs von sieben Probanden sank die PGE<sub>2</sub>-Konzentration, nach fünftägiger Einnahme von Nonisaft in unterschiedlichem Maße. Die Reduktion lag zwischen 5% (s. Proband 1, Abb. 33) und 74% (s. Proband 7, Abb. 33). Dabei war keine Korrelation zwischen der prozentualen Veränderung und der Ausgangskonzentration erkennbar.



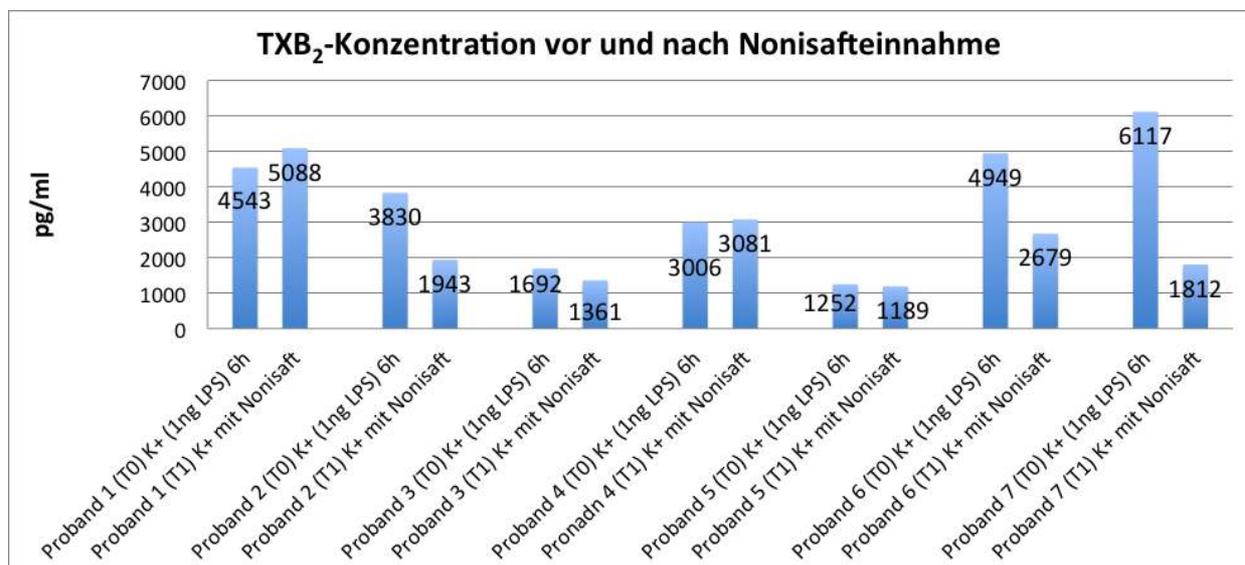
**Abb. 33** PGE<sub>2</sub>-Konzentration vor und nach Nonisafteinnahme

Die erste Blutentnahme (T0) erfolgte vor Einnahme von TNJ (Tahitian Noni® Juice) im nüchternen Zustand. Die zweite Blutentnahme (T1) wurde genau 1 h nach der fünften TNJ Tagesdosiseinnahme entnommen. Gemessen wurden die PGE<sub>2</sub>-Konzentrationen im Überstand mit dem Cayman ELISA Kit an sieben Probanden. Für jeden Ansatz wurden 800 µl RPMI-Medium, versetzt mit 2,5 IU/ml Heparin sowie 200 µl Vollblut verwendet und für 4 h vorinkubiert. Anschließend erfolgte die Stimulierung mit 3 ng LPS und weiterer 20-stündiger Inkubation bei 37°C und 10% CO<sub>2</sub>. Die tägliche Dosis an TNJ betrug 2 ml/kg KGW.

### 2.1.2. Messung der TXB<sub>2</sub>-Konzentration vor und nach Nonisafteinnahme

Die Ausgangskonzentrationen des Entzündungsmediators TXB<sub>2</sub> unterschieden sich wieder deutlich zwischen den Probanden.

Bei Proband 2, 6 und 7 sank die TXB<sub>2</sub>-Induktion nach der Einnahme von Nonisaft um 46-70%. Bei Proband 5 und 3 betrug die Reduktion 5% bzw. 20%, wogegen die Probanden 1 und 4 keine Reduktion aufwiesen (s. Abb. 34 und Tab. 13). Es ist wie bei dem Entzündungsmediator PGE<sub>2</sub> keine Korrelation zwischen der prozentualen Veränderung und der Ausgangskonzentration erkennbar gewesen.



**Abb. 34 TXB<sub>2</sub>-Konzentration vor und nach Nonisafteinnahme**

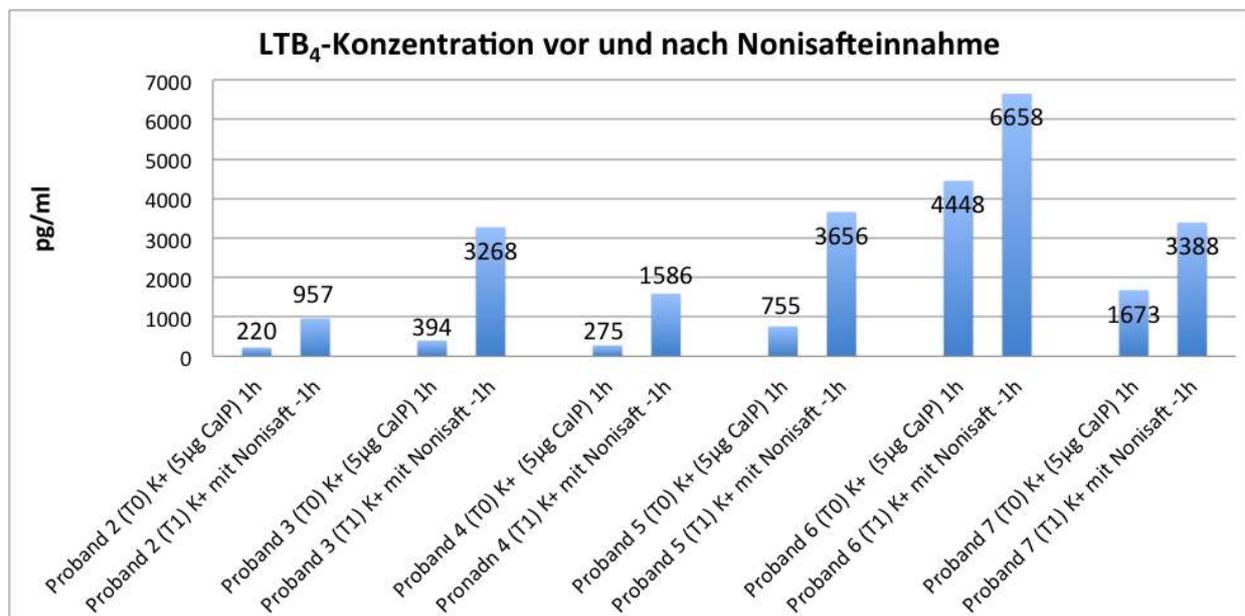
Die erste Blutentnahme (T0) erfolgte vor Einnahme von TNJ (Tahitian Noni® Juice) im nüchternen Zustand. Die zweite Blutentnahme (T1) wurde genau 1 h nach der fünften TNJ Tagesdosisaufnahme entnommen. Die TXB<sub>2</sub>-Konzentration im Überstand wurden mit dem Cayman ELISA Kit bestimmt. Für jeden Ansatz wurden 800 µl RPMI-Medium, versetzt mit 2,5 IU/ml Heparin, sowie 200 µl Vollblut verwendet und für 4 h vorinkubiert. Anschließend erfolgte die Stimulierung mit 1ng LPS und weiterer 6-stündiger Inkubation bei 37°C und 10% CO<sub>2</sub>. Die tägliche Dosis an TNJ-Nonisaft betrug 2 ml/kg KGW.

### 2.1.3. Messung der LTB<sub>4</sub>-Konzentration vor und nach Nonisafteinnahme

Die Daten für Proband 1 konnten wegen einer begrenzten Kapazität des ELISA Kits nicht ausgewertet werden. Die Anfangswerte der restlichen sechs Probanden für LTB<sub>4</sub> unterschieden sich wie im Fall der PGE<sub>2</sub>- und TXB<sub>2</sub>-Werte (s. Abb. 33 und 34) teilweise beträchtlich (s. Abb. 35).

Bei allen sechs Probanden war ein Anstieg der LTB<sub>4</sub>-Konzentrationen nach der Einnahme von Nonisaft zu erkennen. Die Faktoren, um welche die LTB<sub>4</sub>-Konzentrationen der einzelnen Probanden gestiegen waren, schwankten zwischen 1,5 bei Proband 6 bis 8,3 bei Proband 3.

Des Weiteren war zu beobachten, dass der Faktor bei Probanden mit höheren Ausgangskonzentrationen zum Zeitpunkt T0, eine geringere Konzentrationssteigerungen aufwies.



**Abb. 35 LTB<sub>4</sub>-Konzentration vor und nach Nonisafteinnahme**

Die erste Blutentnahme (T0) erfolgte vor Einnahme von TNJ (Tahitian Noni® Juice) im nüchternen Zustand. Die zweite Blutentnahme (T1) wurde genau 1 h nach der fünften TNJ Tagesdosisentnahme entnommen. Es wurden die LTB<sub>4</sub>-Konzentrationen im Überstand mit dem Cayman ELISA Kit bei sechs Probanden gemessen. Für jeden Ansatz wurden 800 µl RPMI-Medium, versetzt mit 2,5 IU/ml Heparin, sowie 200 µl Vollblut verwendet und für 4 h vorinkubiert. Anschließend erfolgte die Stimulierung mit 5 µg CaIP und weiterer einstündiger Inkubation bei 37°C und 10% CO<sub>2</sub>. Die tägliche Dosis an TNJ-Nonisaft betrug 2 ml/kg KGW.

### 2.1.4. Die Entzündungsmediatoren PGE<sub>2</sub>, TXB<sub>2</sub> und LTB<sub>4</sub> im Vergleich

Es war eine Verschiebung im Metabolismus der Arachidonsäure nach fünftägiger Nonisafteinnahme zu erkennen. Die LTB<sub>4</sub>-Produktion stieg bei gleichzeitiger Reduktion der PGE<sub>2</sub>- und teilweiser Reduktion der TXB<sub>2</sub>-Konzentrationen. Dieses deutete auf eine Hemmung der Cyclo-

oxygenasen COX-1 und COX-2 hin, wogegen die Lipoxygenasen nicht oder deutlich schwächer gehemmt wurden. Die bei der *in vitro* Stimulation freigesetzte Arachidonsäure wurde daher vorwiegend in Leukotriene umgesetzt, was sich im Anstieg der LTB<sub>4</sub>-Freisetzung zeigte (s. Abb. 36).

Aus Tabelle 13 wurde erkennbar, dass ein deutlicher Trend für eine Reduktion der Bildung der Cyclooxygenase-Reaktionsprodukte (PGE<sub>2</sub> und TXB<sub>2</sub>) vorhanden war. Im Falle von PGE<sub>2</sub> (p=0,05) und LTB<sub>4</sub> (p=0,0027) war die Veränderungen statistisch signifikant, nicht hingegen bei TXB<sub>2</sub> (p=0,12). Die Summe der verschiedenen Arachidonsäuremetabolite vor und nach der Nonisafteinnahme zeigte individuelle Unterschiede auf. Bildet man jedoch die Summe aller T0-Werte der sieben Probanden (43378 ng/ml) und vergleicht sie mit derjenigen der T1-Werte (43160 pg/ml), so ergab sich nahezu exakt der gleiche Wert.

Wie bereits erwähnt, hatten die Vortests erhebliche Tagesschwankungen der Spontanwerte der Entzündungsmediatoren (K0-Werte) erkennen lassen (s. Vergleich zwischen Abb. 22 und 28). Nach fünftägiger Nonisafteinnahme hingegen, reduzierten sich die Entzündungsmediator-Konzentrationen vor Stimulation (K0-Probe) im Blut oder blieben stabil, mit Ausnahme eines Probanden bezüglich des PGE<sub>2</sub>- und eines weiteren bezüglich des TXB<sub>2</sub>-Werts (s. Tab. 14). Auch wenn Reduktionen im Bereich der Probandengruppe statistisch nicht signifikant waren, ergab sich doch ein deutlicher numerischer Trend. Offensichtlich kam es unter dem Einfluss der Nonisafteinnahme *in vivo* zu einer verringerten Spontanbildung von Arachidonsäuremetaboliten, was auf einen verringerten Entzündungsstatus hinwies.

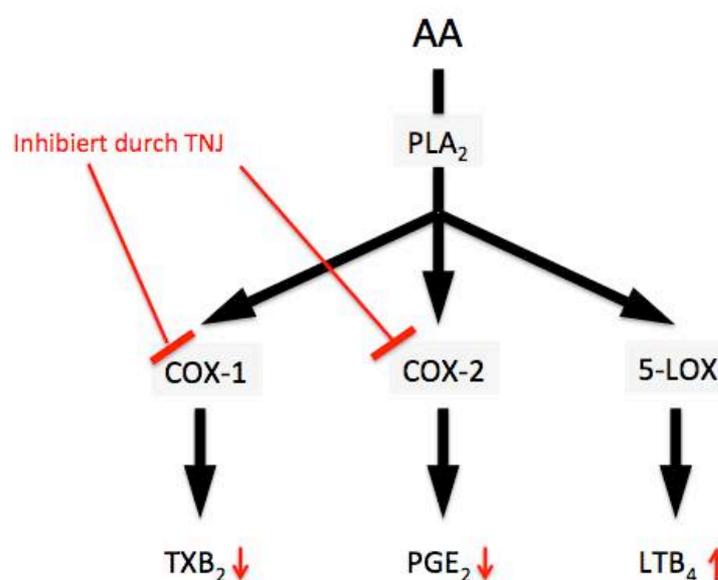


Abb. 36 AA-Metabolisierungsverschiebung nach fünftägiger Nonisafteinnahme bei den K+ Proben

Tabelle 13 Zusammenfassung der Ergebnisse von Abb. 33, 34 und 35

/ = konnte nicht ermittelt werden; (N) = nach Nonisaftaufnahme. Die Signifikanzwerte (p) der Differenzen T1-T0 (t-Test, 1 Stichprobe) befinden sich in der letzten Spalte

Proband	1	2	3	4	5	6	7	Mittelwert ±STAW
<b>PGE<sub>2</sub></b>								
T0 = K+ pg/ml	2248	1297	292	1154	1571	1325	2337	1461±644
T1 = K+ (N) pg/ml	2138	695	322	532	1139	1064	604	928±562
T1-T0 (pg/ml)	-110	-602	30	-622	-432	-261	-1733	<b>-533±539</b> <b>p=0,05</b>
Veränderung (%)	- 4,9	- 46,4	+10,3	- 53,9	- 27,5	- 19,7	- 74	-31±27
<b>TXB<sub>2</sub></b>								
T0 = K+ pg/ml	4543	3830	1692	3006	1252	4949	6117	3627±1630
T1 = K+ (N) pg/ml	5088	1943	1361	3081	1189	2679	1812	2450±1245
T1-T0 (pg/ml)	545	-1887	-331	75	-63	-2270	-4305	-1177±1602 p=0,12
Veränderung (%)	+ 12	- 49,3	- 19,6	+ 2,5	- 5	- 45,9	- 70,4	-25±28
<b>LTB<sub>4</sub></b>								
T0 = K+ pg/ml	/	220	394	275	755	4448	1673	1294±1494
T1 = K+ (N) pg/ml	/	957	3268	1586	3656	6658	3388	3252±1818
T1-T0 (pg/ml)	/	737	2874	1311	2901	2210	1715	<b>1958±792</b> <b>p=0,0027</b>
Veränderung (%)	/	+ 335	+ 729	+ 477	+ 384	+ 50	+ 103	346±228

Tabelle 14 Ausgangswerte der Entzündungsmediatorkonzentrationen im Vollblut (K0 Werte der K+ Proben aus Abb. 33, 34 und 35)

/ = konnte nicht ermittelt werden; (N) = nach Nonisafteinnahme. Die Signifikanzwerte (p) der Differenzen T1-T0 (t-Test, 1 Stichprobe) befinden sich in der letzten Spalte

Proband	1	2	3	4	5	6	7	Mittelwert ± STAW
<b>PGE<sub>2</sub></b>								
T0 = K0 pg/ml	36	31	17	32	23	43	33	31±8,5
T1 = K0 (N) pg/ml	47	22	16	25	23	34	22	27±10,3
T1-T0	11	-9	-1	-7	0	-9	-11	-4±7,7 p=0,25
Veränderung (%)	+30,6	-29	-5,9	-21,9	0	-21	-33,3	-12±22
<b>TXB<sub>2</sub></b>								
T0 = K0 pg/ml	3283	4626	291	1658	1093	5492	1708	2593±1924
T1 = K0 (N) pg/ml	2888	1935	727	798	898	1401	1364	1430±770
T1-T0 (pg/ml)	-395	-2691	436	-860	-195	-4091	-344	-1163±1620 p=0,1
Veränderung (%)	-12	-58,2	+150	-51,9	-17,8	-74,5	-20,1	-12±75
<b>LTB<sub>4</sub></b>								
T0 = K0 (pg/ml)	/	13	14	13	71	16	16	-24±23
T1 = K0 (N) (pg/ml)	/	11	13	12	16	14	16	14±2,1
T1-T0 (pg/ml)	/	-2	-1	-1	-55	-2	0	-10±22 p=0,3
Veränderung (%)	/	-15,4	-7,1	-7,7	-77,5	-12,5	0	-24±30

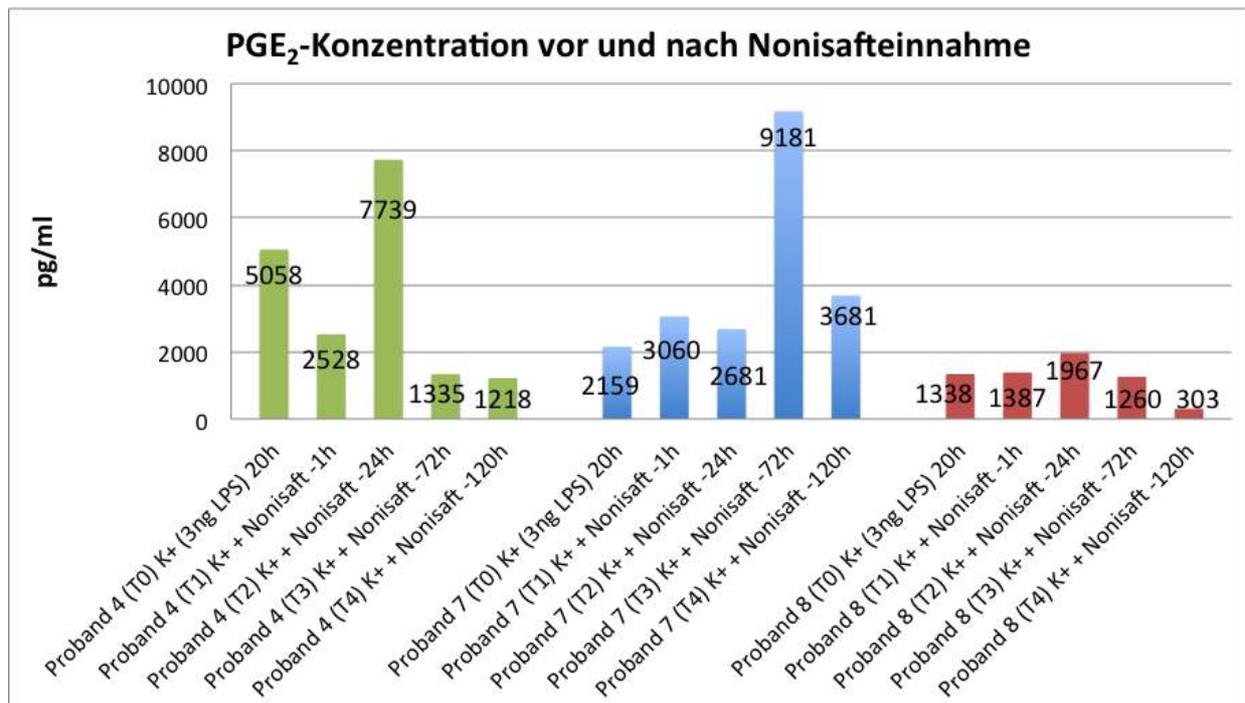
## **2.2. *Ex vivo* - *in vitro* Pilotstudie-2: Untersuchung der Konzentrationen der Entzündungsmediatoren vor und nach Nonisafteinnahme**

Die Zeitpunkte T0 - T4 bezeichnen die Tage, an denen die Blutentnahmen erfolgten (s. Tab. 5). Die Durchführung zum Zeitpunkt T0 und T1 entsprach dem gleichen Prinzip wie in Pilotstudie-1 mit dem Unterschied, dass bis T1 nur drei Tage Nonisaft vorab getrunken wurde. Die übrigen Blutentnahmen erfolgten nach einer Karenzzeit von 24 h, 72 h und 120 h nach der letzten Nonisafteinnahme. Des Weiteren sind in dieser Studie nur drei Probanden aus Kostengründen möglich gewesen, zwei davon waren ebenfalls in Pilotstudie-1 (Proband 4 und 7).

### **2.2.1. Messung der PGE<sub>2</sub>-Konzentration vor und nach Nonisafteinnahme**

Nur bei Proband 4 zeigte sich die gleiche sinkende Tendenz der Konzentration von PGE<sub>2</sub>, wie in Pilotstudie-1 (s. Abb. 37, T0 zu T1). Bei allen drei Probanden trat nach Beendigung der Nonisafteinnahme ein Reboundphänomen auf, ein innerhalb eines kurzen Zeitabschnitts große gegensätzliche Konzentrationsveränderung, welche zeitnah zur Ausgangskonzentration zurückkehrte. Es war zunächst eine kurzzeitige Konzentrationssteigerung zu vermerken, wenn auch bei Proband 7 zwei Tage später als bei Proband 4 und 8. Die Werte von Proband 8 waren verhaltener als die der anderen.

Bei allen drei Probanden waren die Konzentrationen bis zum Zeitpunkt T4 wieder vermindert. Bei Proband 4 und 8 erreichte die PGE<sub>2</sub>-Konzentration, im Vergleich zum Ausgangswert zum Zeitpunkt T0, einen niedrigeren Wert. Bei Proband 7 war auch eine erhebliche Reduktion nach dem Reboundphänomen erkennbar, welche aber über dem der Ausgangskonzentration zum Zeitpunkt T0 blieb.



**Abb. 37 PGE<sub>2</sub>-Konzentration vor und nach Nonisafteinnahme**

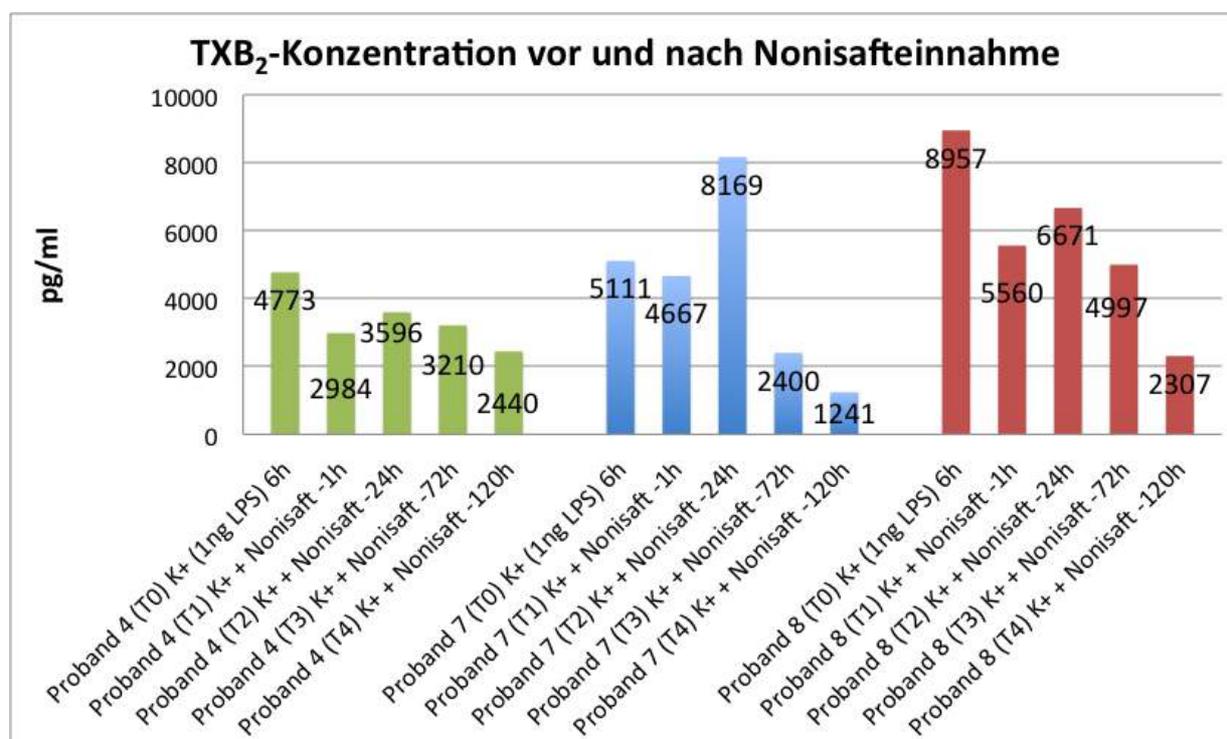
Gemessen wurde die PGE<sub>2</sub>-Konzentration im Überstand mit dem Cayman ELISA Kit, an drei Probanden (grün = Proband 4; blau = Proband 7; rot = Proband 8) zu unterschiedlichen Zeitpunkten (T0 - T4). Für jeden Ansatz wurden 800 µl RPMI-Medium, versetzt mit 2,5 IU/ml Heparin sowie 200µl Vollblut verwendet und für 4 h vorinkubiert. Anschließend erfolgte die Stimulierung mit 3 ng LPS und weiterer 20-stündiger Inkubation bei 37°C und 10% CO<sub>2</sub>. -h = Nonikarenz in Stunden; tägliche Dosis TNJ-Nonisafteinnahme = (2 ml/kg Körpergewicht); T0 - T4 sind Tab. 5 zu entnehmen.

### 2.2.2. Messung der TXB<sub>2</sub>-Konzentration vor und nach Nonisafteinnahme

Alle drei Probanden wiesen im Vergleich zu der Ausgangskonzentration zum Zeitpunkt T0 nach fünftägiger Nonisaftekarenz (Zeitpunkt T4) eine Verminderung der TXB<sub>2</sub>-Konzentration auf.

Des Weiteren wiesen alle drei Probanden nach 24-stündiger Nonisaftekarenz (Zeitpunkt T2) ein Reboundphänomen auf, wobei Proband 7 als einziger eine höhere TXB<sub>2</sub>-Konzentration im Vergleich zum Ausgangswert zum Zeitpunkt T0 erreichte (s. Abb. 38).

Alle drei Probanden zeigten, wie bei der ersten Pilotstudie, nach Stimulierung eine Senkung der TXB<sub>2</sub>-Konzentration zum Zeitpunkt T1 im Vergleich zu T0 (s. Abb. 38).



**Abb. 38 TXB<sub>2</sub>-Konzentration vor und nach Nonisafteinnahme**

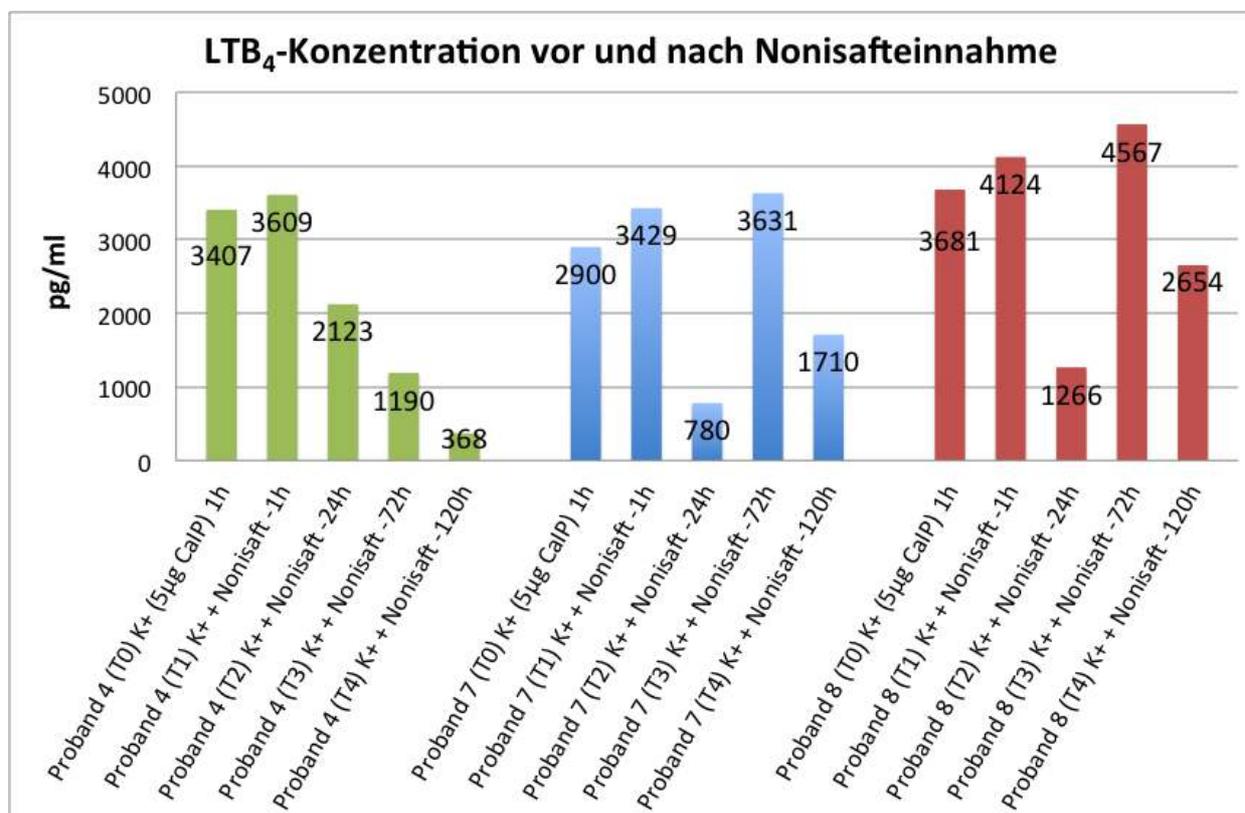
Gemessen wurde die TXB<sub>2</sub>-Konzentration im Überstand, mit dem Cayman ELISA Kit, an drei Probanden (grün = Proband 4; blau = Proband 7; rot = Proband 8) zu unterschiedlichen Zeitpunkten (T0 - T4). Für jeden Ansatz wurden 800 µl RPMI-Medium, versetzt mit 2,5 IU/ml Heparin sowie 200 µl Vollblut verwendet und für 4 h vorinkubiert. Anschließend erfolgte die Stimulierung mit 1 ng LPS und weiterer 6-stündiger Inkubation bei 37°C und 10% CO<sub>2</sub>. -h = Nonisaftekarenz in Stunden; tägliche Dosis TNJ-Nonisafteinnahme = (2 ml/kg Körpergewicht); T0 - T4 sind Tab. 5 zu entnehmen.

### 2.2.3. Messung der LTB<sub>4</sub>-Konzentration vor und nach Nonisafteinnahme

Alle drei Probanden zeigten, wie bei der ersten Pilotstudie, nach Stimulierung einen Anstieg der LTB<sub>4</sub>-Konzentration zum Zeitpunkt T1 im Vergleich zum Zeitpunkt T0 (s. Abb. 39).

Auch hier war ein Reboundphänomen zu erkennen. Bei allen drei Probanden war ein direkter Konzentrationsabfall nach 24-stündiger Nonisaftekarenz, zum Zeitpunkt T2 zu vermerken. Zwei Tage später (Zeitpunkt T3) war bei Proband 7 und 8 ein erneuter Anstieg zu sehen. Zum Zeitpunkt T4 war wieder eine deutliche Konzentrationsminderung zu ersehen, wobei Proband 4 seit Beginn der Nonisaftekarenz (Zeitpunkt T2) stetig niedrigere LTB<sub>4</sub>-Konzentrationen aufwies.

Alle drei Probanden wiesen nach spätestens fünf Tagen (Zeitpunkt T4) eine niedrigere LTB<sub>4</sub>-Konzentration im Vergleich zum Anfang (Zeitpunkt T0) auf.



**Abb. 39** LTB<sub>4</sub>-Konzentration vor und nach Nonisafteinnahme

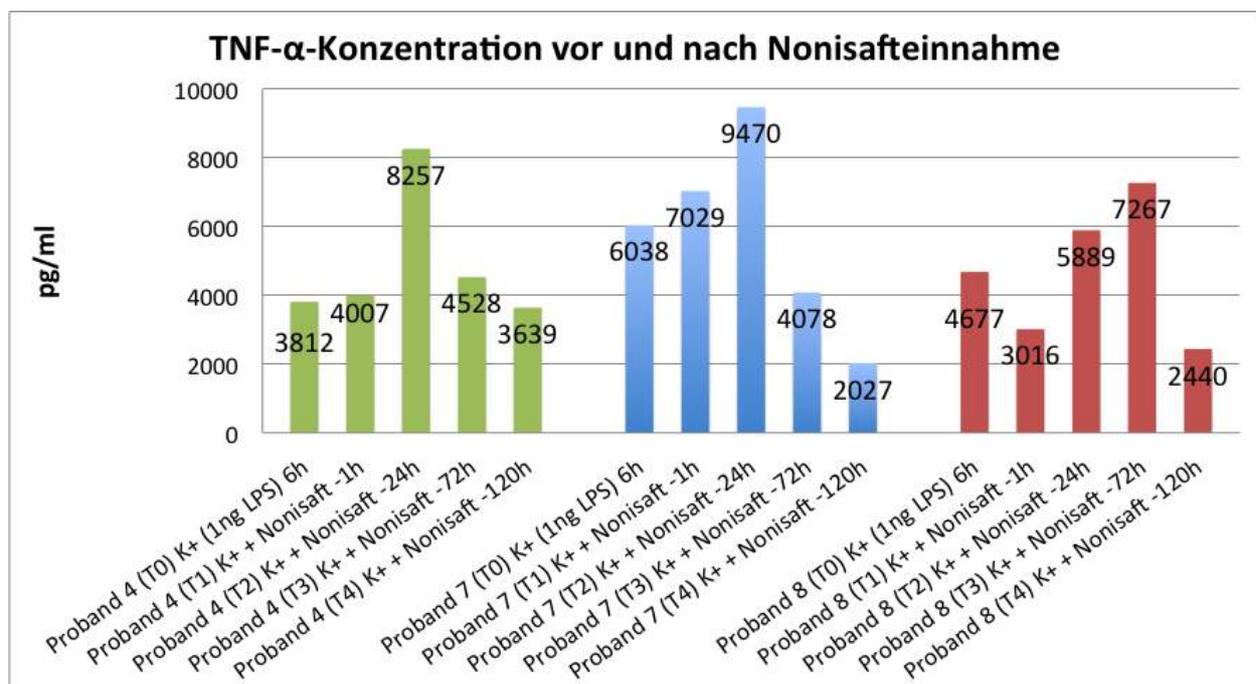
Gemessen wurde die LTB<sub>4</sub>-Konzentration, im Überstand mit dem Cayman ELISA Kit, an drei Probanden (grün = Proband 4; blau = Proband 7; rot = Proband 8) zu unterschiedlichen Zeitpunkten (T0 - T4). Für jeden Ansatz wurden 800 µl RPMI-Medium, versetzt mit 2,5 IU/ml Heparin sowie 200 µl Vollblut verwendet und für 4 h vorinkubiert. Anschließend erfolgte die Stimulierung mit 5 µg CaIP und weiterer 1-stündiger Inkubation bei 37°C und 10% CO<sub>2</sub>. -h = Nonikarenz in Stunden; tägliche Dosis TNJ-Nonisaft = (2 ml/kg Körpergewicht); T0 - T4 sind Tab. 5 zu entnehmen.

### 2.2.4. Messung der TNF- $\alpha$ -Konzentration vor und nach Nonisafteinnahme

Im Unterschied zur ersten Pilotstudie wurde in dieser Studie auch der Entzündungsparameter TNF- $\alpha$  untersucht. Dieses Zytokin ist kein Metabolit der Arachidonsäure, fungiert aber als multifunktionaler Signalstoff des Immunsystems und ist an vielen Entzündungsreaktionen beteiligt.

In erster Linie war zu vermerken, dass bei allen Probanden, im Vergleich zwischen der Ausgangskonzentration zum Zeitpunkt T0 und der letzten Blutentnahme zum Zeitpunkt T4, eine Reduktion der TNF- $\alpha$ -Konzentration ersichtlich ist.

Bei allen Probanden ist ein Reboundphänomen ersichtlich: Bei Proband 4 und 7 bereits nach 24-stündiger Nonisaftekarenz (Zeitpunkt T2), bei Proband 8 ist dieser maximale Peak erst nach 72-stündiger Nonisaftekarenz (Zeitpunkt T3) ersichtlich (s. Abb. 40).



**Abb. 40** TNF- $\alpha$ -Konzentration vor und nach Nonisafteinnahme

Gemessen wurde die TNF- $\alpha$ -Konzentration, im Überstand mit dem Cayman ELISA Kit, an drei Probanden (grün = Proband 4; blau = Proband 7; rot = Proband 8) zu unterschiedlichen Zeitpunkten (T0 - T4). Für jeden Ansatz wurden 800  $\mu$ l RPMI-Medium, versetzt mit 2,5 IU/ml Heparin sowie 200  $\mu$ l Vollblut verwendet und für 4 h vorinkubiert. Anschließend erfolgte die Stimulierung mit 1 ng LPS und weiterer 6-stündiger Inkubation bei 37°C und 10% CO<sub>2</sub>. -h = Nonikarenz in Stunden; tägliche Dosis TNJ-Nonisaft = (2 ml/kg Körpergewicht); T0 - T4 sind Tab. 5 zu entnehmen.

### 2.2.5. Die Entzündungsmediatoren PGE<sub>2</sub>, TXB<sub>2</sub>, LTB<sub>4</sub> und TNF- $\alpha$ im Vergleich

Es war eine Verschiebung im Metabolismus der Arachidonsäure nach dreitägiger Nonisaft-einnahme zu erkennen (s. Abb. 37 - 40, Zeitpunkt T0 zu T1), ebenso im weiteren Verlauf bei anhaltender Nonisaftkarenz (s. Abb. 37 - 40, Zeitpunkt T2 bis T4). Wurden ausschließlich die Werte der Entzündungsmediatoren PGE<sub>2</sub>, TXB<sub>2</sub> und LTB<sub>4</sub> zum Zeitpunkt T0 und T1 betrachtet, war ein direkter Vergleich zur ersten Pilotstudie möglich, mit dem Unterschied einer drei- statt fünftägigen Nonisafteinnahme. In dieser Studie stieg bei allen Probanden die LTB<sub>4</sub>-Produktion bei gleichzeitiger Reduktion der TXB<sub>2</sub>-Konzentration (s. Tab. 15). Die PGE<sub>2</sub>-Konzentration reduzierte sich nur bei Proband 4, somit reproduzierte dieser Proband die Ergebnisse der ersten Pilotstudie am besten. Verglich man die erste Pilotstudie mit der zweiten, so fiel auf, dass die prozentuale LTB<sub>4</sub>-Steigung in der zweiten Studie verhaltener vorlag (s. Tab. 13 und Tab. 15).

Wie bereits in der ersten Studie so zeigte sich auch hier, dass sich bei keinem der Probanden allein eine quantitative Umverteilung der drei AA-Metabolite erzielen lässt (s. Tab. 15). Eine veränderte Arachidonsäurefreisetzung bzw. -bildung weiterer Metabolite müssen in Betracht gezogen werden, konnten jedoch nicht den Werten aus diesem Test entnommen werden. Es war zudem erkennbar, dass die Konzentrationsveränderungen sich individuell unterschieden.

Wie in der ersten Pilotstudie blieben erneut, sogar bei allen Probanden, nach bereits dreitägiger Nonisafteinnahme die Entzündungsmediator-Konzentrationen im Blut ohne zusätzliche Stimulation (K0-Werte) stabil bzw. reduzierten sich (s. Tab. 16).

Die TNF- $\alpha$ -Konzentrationen aller Probanden wiesen keinen direkten Bezug zu den Entzündungsmediatoren PGE<sub>2</sub>, TXB<sub>2</sub> und LTB<sub>4</sub> auf. Trotz gleicher Stimulator-Konzentration und gleicher anschließender Inkubationszeit wie TXB<sub>2</sub>, lies sich kein Zusammenhang zwischen den AA-Metaboliten und TNF- $\alpha$  finden (s. Abb. 38 und 40)

Nur bei Proband 4 zeigte sich ein zeitgleiches Reboundphänomen der Entzündungsmediatoren TNF- $\alpha$ , PGE<sub>2</sub> und TXB<sub>2</sub> (s. Abb. 37, 38 und 40 zum Zeitpunkt T2). Bei Proband 7 fand sich der höchste TNF- $\alpha$  Wert ebenfalls zum Zeitpunkt T2, jedoch vor dem maximalen PGE<sub>2</sub>-Wert, welcher erst zum Zeitpunkt T3 vorlag. Bei Proband 8 trat das TNF- $\alpha$ -Reboundphänomen erst zum Zeitpunkt T3 auf, während das Reboundphänomen PGE<sub>2</sub> schon zum Zeitpunkt T2 vorlag.

*Tabelle 15 Vergleich der Entzündungsmediatorkonzentrationen der Pilotstudie-2 zu den Zeitpunkten T0 und T1 Ergebnisse von Abb. 37, 38 und 39, nach Abzug der Ausgangskonzentration K0; (N) = mit Nonisafteinnahme; Die Zeitpunkte T0 und T1 sind Tab. 5 zu entnehmen. Wegen der geringen Probandenzahl ist eine statistische Behandlung der Werte nicht möglich.*

	<b>Proband 4</b>	<b>Proband 7</b>	<b>Proband 8</b>
<b>PGE<sub>2</sub>:</b>			
T0 = K+ pg/ml	5058	2159	1338
T1 = K+ (N) pg/ml	2528	3060	1387
Veränderung (%)	- 50%	+41,7%	+3,7%
<b>TXB<sub>2</sub>:</b>			
T0 = K+ pg/ml	4773	5111	8957
T1 = K+ (N) pg/ml	2984	4667	5560
Veränderung (%)	- 37,5%	- 8,7%	- 38%
<b>LTB<sub>4</sub>:</b>			
T0 = K+ pg/ml	3407	2900	3681
T1 = K+ (N) pg/ml	3609	3429	4124
Veränderung (%)	+ 6%	+18,2%	+ 12%

Tabelle 16 Ausgangswerte (K0) der Entzündungsmediatorkonzentrationen im Vollblut aus Abb. 37, 38 und 39  
 Zum Zeitpunkt T0 und T1; (N) = mit Nonisafteinnahme; Die Zeitpunkte T0 und T1 sind Tab. 5 zu entnehmen.  
 Wegen der geringen Probandenzahl ist eine statistische Behandlung der Werte nicht möglich.

	<b>Proband 4</b>	<b>Proband 7</b>	<b>Proband 8</b>
<b>PGE<sub>2</sub>:</b>			
T0 = K0 pg/ml	42	21	32
T1 = K0 (N) pg/ml	32	20	23
Veränderung (%)	- 23,8%	- 4,8%	- 28,1%
<b>TXB<sub>2</sub>:</b>			
T0 = K0 pg/ml	1834	689	2044
T1 = K0 (N) pg/ml	792	479	1358
Veränderung (%)	- 56,8%	- 30,5%	- 33,6%
<b>LTB<sub>4</sub>:</b>			
T0 = K0 pg/ml	53	30	59
T1 = K0 (N) pg/ml	31	21	26
Veränderung (%)	- 41,5%	- 30%	- 56%

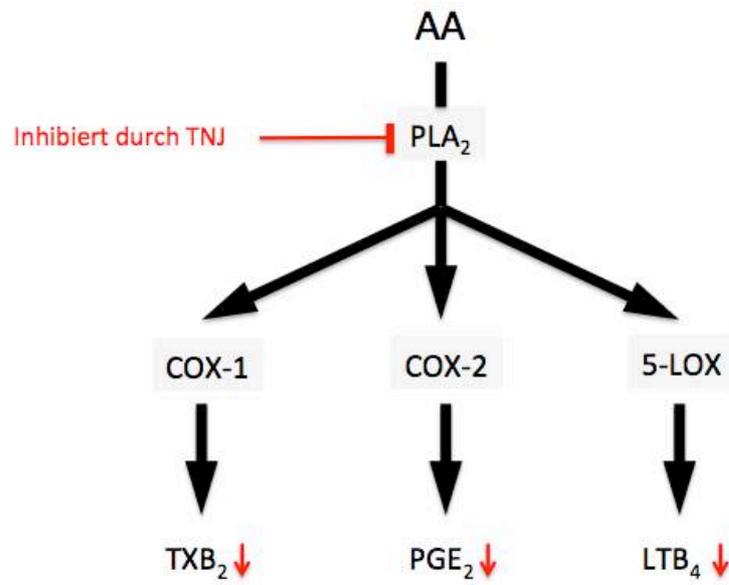


Abb. 41 AA-Metabolisierungsverschiebung nach dreitägiger Nonisafeinnahme bei den K0-Proben

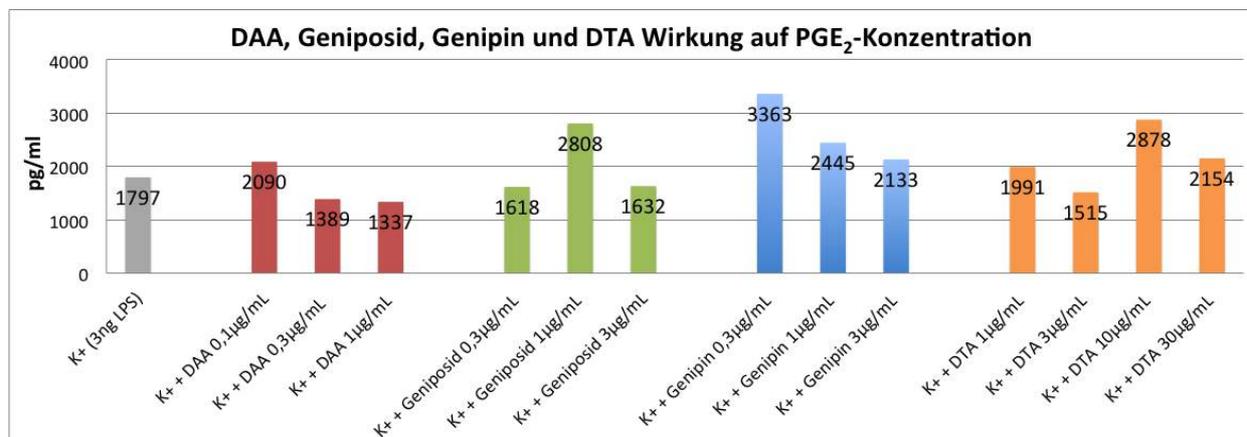
### 2.3. Untersuchung der Entzündungsmediatorkonzentrationen im Vollblut, bei *in vitro* Vorbehandlung mit DAA, Geniposid, Genipin oder DTA

Alle Proben eines Entzündungsmediators wurden unabhängig von der Iridoid- oder Fettsäuren-Vorbehandlung immer gleich stimuliert, wie bereits in Tabelle 5 hinterlegt. Aufgrund der Tatsache, dass Proband 4 die Ergebnisse der Pilotstudie-1 in der zweiten Pilotstudie am besten reproduziert hatte, wurde dessen Vollblut für die Tests verwendet.

#### 2.3.1. Messung der PGE<sub>2</sub>-Konzentration

Eine Reduzierung der PGE<sub>2</sub>-Konzentration im Vergleich zur Ausgangskonzentration war bei 0,3 µg/ml und 1 µg/ml DAA, 0,3 µg/ml und 3 µg/ml Geniposid und 3 µg/ml DTA zu erkennen, jedoch wiesen Geniposid und DTA keine konzentrationsabhängige Wirkung auf.

DAA und Genipin bewirkten in geringeren Konzentrationen eine Zunahme der PGE<sub>2</sub>-Konzentration. Bei höheren Konzentrationen der Iridoide sank die PGE<sub>2</sub>-Konzentration, wobei der Wert für Genipin, im Vergleich zur K<sup>+</sup> Probe, kontinuierlich über der PGE<sub>2</sub>-Ausgangskonzentration lag.

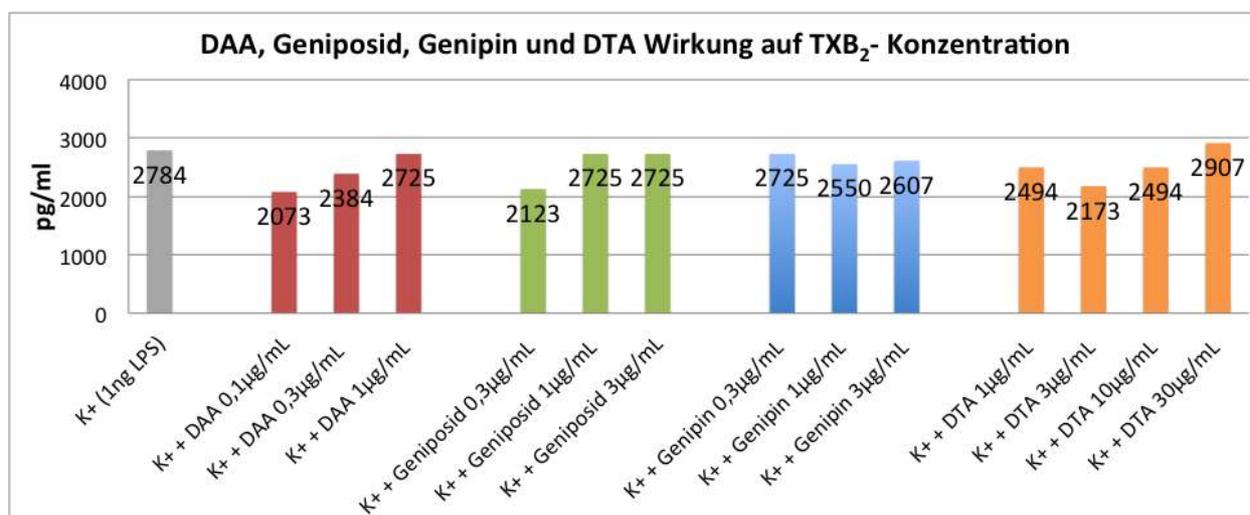


**Abb. 42** PGE<sub>2</sub>-Konzentrationsveränderungen durch DAA, Geniposid, Genipin oder DTA

Gemessene PGE<sub>2</sub>-Konzentration im Überstand mit dem Cayman ELISA Kit an Proband 4. Für jeden Ansatz wurden 800 µl RPMI-Medium, versetzt mit 2,5 IU/ml Heparin sowie 200 µl Vollblut verwendet und jeweils mit einem der oben genannten Substanzen für 4 h vorinkubiert. Anschließend Stimulierung mit 3 ng LPS und weiterer 20-stündiger Inkubation bei 37°C, 10% CO<sub>2</sub>.

### 2.3.2. Messung der TXB<sub>2</sub>-Konzentration

Bis auf die DTA-Konzentration von 30 µg/ml waren Reduzierungen der TXB<sub>2</sub>-Konzentration erkennbar. DAA zeigte in niedrigeren Konzentrationen hemmende Effekte, bezogen auf die TXB<sub>2</sub>-Produktion, welche mit zunehmender DAA-Konzentration abnahmen. Geniposid zeigte ein ähnliches Verhalten wie DAA, jedoch schien die reduzierte TXB<sub>2</sub>-Hemmung bei zunehmender Konzentration hier bereits bei 1 µg/ml zu stagnieren. Genipin und DTA wiesen keine konzentrationsabhängigen Wirkungen auf (s. Abb. 43).



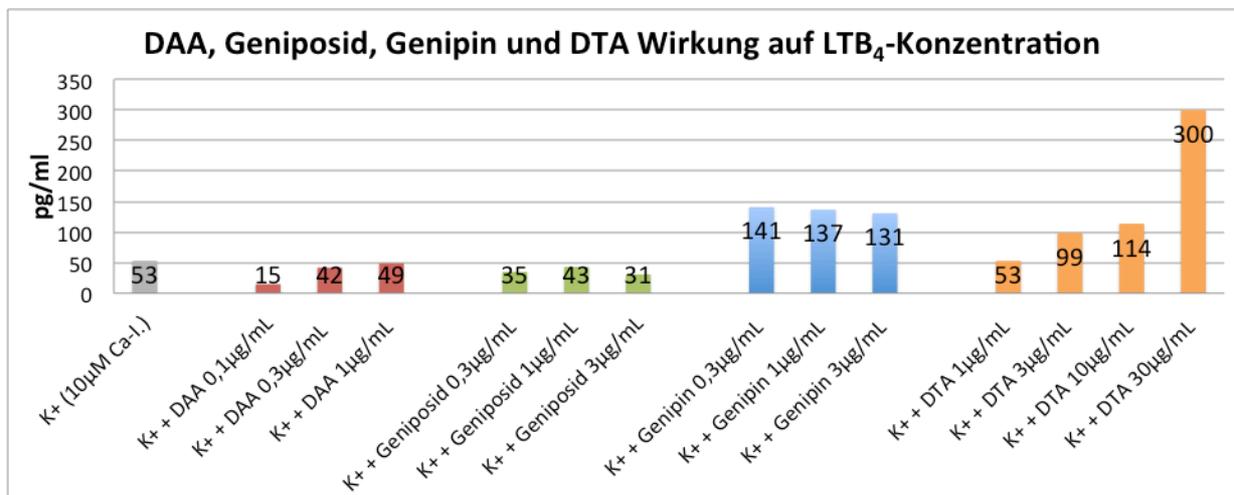
**Abb. 43 TXB<sub>2</sub>-Konzentrationsveränderungen durch DAA, Geniposid, Genipin oder DTA**

Gemessene TXB<sub>2</sub>-Konzentration im Überstand mit dem Cayman ELISA Kit an Proband 4. Für jeden Ansatz wurden 800 µl RPMI-Medium, versetzt mit 2,5 IU/ml Heparin sowie 200 µl Vollblut verwendet und jeweils mit einem der oben genannten Substanzen für 4 h vorinkubiert. Anschließend Stimulierung mit 1 ng LPS und weiterer 6-stündiger Inkubation bei 37°C, 10% CO<sub>2</sub>.

### 2.3.3. Messung der LTB<sub>4</sub>-Konzentration

Durch Abbildung 44 wurde gezeigt, dass geringe DAA-Konzentrationen auf LTB<sub>4</sub> reduzierend wirkten. Die LTB<sub>4</sub>-Reduktion nahm mit zunehmender DAA-Konzentration ab. Das Iridoid Geniposid wies keine konzentrationsabhängige Wirkung auf. Im Vergleich zur Ausgangskonzentration waren bei Genipin bei allen Konzentrationen erhöhte LTB<sub>4</sub>-Konzentrationen messbar (s. Abb. 44). Dosisabhängige Änderungen zeigten sich hingegen nicht.

Die ungesättigte Fettsäure DTA erzeugte eine dosisabhängige Steigerung der LTB<sub>4</sub>-Konzentration, im Bereich von 3 - 30 µg/ml (s. Abb. 44).



**Abb. 44** LTB<sub>4</sub>-Konzentrationsveränderungen durch DAA, Geniposid, Genipin oder DTA

Gemessene LTB<sub>4</sub>-Konzentration im Überstand mit dem Cayman ELISA Kit an Proband 4. Für jeden Ansatz wurden 800 µl RPMI-Medium, versetzt mit 2,5 IU/ml Heparin sowie 200 µl Vollblut verwendet und jeweils mit einem der oben genannten Substanzen für 4 h vorinkubiert. Anschließend Stimulierung mit 5 µg CaIP und weiterer einstündiger Inkubation bei 37°C, 10% CO<sub>2</sub>.

### 2.3.4. Zusammenfassende Betrachtung der Wirkung von isolierten Nonibestandteilen auf den Arachidonsäuremetabolismus *in vitro*

Tabelle 17 Zusammenfassung der %-Konzentrationsveränderung aus den Abb. 42, 43 und 44

Vergleich der Proben mit einer Vorbehandlung gegenüber der dazugehörigen K+ Probe (ohne Vorbehandlung).

prozentuale Veränderung	PGE <sub>2</sub>	TXB <sub>2</sub>	LTB <sub>4</sub>
DAA 0,1µg/ml	+16%	- 25,5%	- 71,7%
DAA 0,3µg/ml	- 22%	- 14,4%	- 20,8%
DAA 1µg/ml	- 25,6%	- 2,1%	- 7,5%
Geniposid 0,3µg/ml	- 10%	- 23,7%	- 34%
Geniposid 1µg/ml	+56,3%	-2,1%	- 18,9%
Geniposid 3µg/ml	- 9,2%	-2,1%	- 41,5%
Genipin 0,3µg/ml	+87,2%	- 2,1%	+166%
Genipin 1µg/ml	+36,1%	- 8,4%	+159%
Genipin 3µg/ml	+18,7%	- 6,4%	+147%
DTA 1µg/ml	+10,8%	- 10,4%	+/- 0%
DTA 3µg/ml	- 15,7%	- 21,9%	+86,8%
DTA 10µg/ml	+60,2%	- 10,4%	+115%
DTA 30µg/ml	+19,9%	+4,4%	+466%

#### 2.3.4.1. Konzentrationsveränderungen durch DAA

Im direkten Vergleich der Entzündungsmediator-Konzentrationen (s. Tab. 17) zeigte sich, dass alle getesteten Konzentrationen von DAA hemmende Effekte aufwiesen, abgesehen von der 0,1 µg/ml DAA-Konzentration beim Entzündungsmediator PGE<sub>2</sub>.

Es war zu erkennen, dass geringere DAA-Konzentrationen auf LTB<sub>4</sub> und TXB<sub>2</sub> reduzierend wirken. Diese Reduktionen nahmen mit zunehmender DAA-Konzentration ab. Dabei war ein Abfallen der PGE<sub>2</sub>-Konzentration, nach kurzem Anstieg bei 0,1 µg/ml, bei gleichzeitigem Steigen der LTB<sub>4</sub>- und TXB<sub>2</sub>-Konzentration zu vermerken.

Die Verschiebung der Entzündungsmediator-Konzentrationen erfolgte nicht in äquimolaren Mengen (s. Tab. 17).

#### 2.3.4.2. Konzentrationsveränderungen durch Geniposid

Bei der Betrachtung der Entzündungsmediatoren PGE<sub>2</sub>, TXB<sub>2</sub> und LTB<sub>4</sub> waren weder separat, noch im Gesamtbild konzentrationsabhängige Wirkungen durch das Iridoid Geniposid erkennbar (s. Tab. 17).

#### 2.3.4.3. Konzentrationsveränderungen durch Genipin

Genipin, ein Aglykon des Geniposids, rief Steigerungen der Produktion von PGE<sub>2</sub> und LTB<sub>4</sub> hervor, wogegen marginale Abnahmen der TXB<sub>2</sub>-Konzentrationen zu verzeichnen waren. Im Falle des PGE<sub>2</sub> waren die Abnahmen reziprok dosisabhängig, bei LTB<sub>4</sub> verharrten sie auf konstantem gesteigerten Niveau (s. Tab. 17).

#### 2.3.4.4. Konzentrationsveränderungen durch DTA

Auffällig war, dass DTA eine deutliche konzentrationsabhängige Steigerung der LTB<sub>4</sub>-Konzentration hervorrief. Im Gegensatz zu den *ex-vivo* Untersuchungen der Pilotstudien-1 und -2, war dieser Anstieg nicht von einem gleichzeitigen Abfall der Cyclooxygenase-Metaboliten der AA begleitet (s. Tab. 17). Im Gegenteil, die Konzentration von PGE<sub>2</sub> stieg ebenfalls an, wenn gleich weniger stark, wogegen die TXB<sub>2</sub>-Konzentration zunächst abfiel und im Verlauf wieder anstieg. Die Veränderungen konnten daher nicht durch Hemmeffekte des DTA auf die Cyclooxygenasen des Arachidonsäurestoffwechsels erklärt werden. Eine mögliche Erklärung wäre, dass DTA, ähnlich wie LPS und CaIP, eine Freisetzung von Arachidonsäure hervorrief, die dann von den Cyclooxygenasen und Lipoxygenasen in die entsprechenden Zytokine umgewandelt wurden. Bei DTA handelt es sich um eine dreifach ungesättigte Fettsäure, die strukturell den ω-3-Fettsäuren,

wie z.B. Linolensäure, zugerechnet werden kann. Sie besitzt eine beträchtliche Lipophilie und kann daher leicht in die Zellmembranen eindringen. Dort könnte sie über eine Aktivierung der PLA<sub>2</sub> zu einer Freisetzung von Arachidonsäure führen oder eventuell vorhandene freie Arachidonsäure verdrängen.

#### **2.3.4.5. Konzentrationsveränderungen durch Noni-Extrakte**

Verwendete Lösungsmittel wie DMSO, Ethanol und Methanol erwiesen sich bei Detektion der Cayman ELISA Kits, in Kombination mit den Überständen des humanen Vollbluts, als ungeeignet.

Die Daten der Püree-Extrakte, Hexanextrakte, Ethylacetatextrakte und Iridoide, welche mit o.g. Lösungsmitteln aufgenommen wurden, mussten verworfen werden.

Es zeigten sich Phasentrennungen beim hinzupipettieren in die Vollblutprobe und zytotoxische Effekte, schwarze Zellklumpen am Grund der 6-Well Petrischalen oder Unverträglichkeit mit dem Cayman ELISA Kits, wie anhand des Beispiels DMSO in der K0 Probe versucht wurde zu verdeutlichen (s. Abb. 19 und 20).

Aus diesem Grund wurden die Daten nicht in den Ergebnisteil eingepflegt.

## IV Diskussion

*Morinda citrifolia* L., bekannt unter seinem polynesischen Namen „Noni“, ist eine tropische Pflanze, die besonders im Bereich der pazifischen Inselwelt verbreitet ist. Von den Völkern Polynesiens wurde sie bereits seit den frühen Zeiten ihrer Ausbreitungen vor etwa 3000 Jahren in ihren Booten mitgeführt und auf jeder neu besiedelten Insel eingebürgert. Die Polynesier schätzten die Pflanze wegen ihrer vielseitigen Verwendungsmöglichkeiten als Farbstofflieferant, zur Stärkung und Gesunderhaltung und vor allem als Heilpflanze.<sup>[15][18]</sup> Sie verwendeten alle Teile der Pflanze, besonders aber die Blätter zur Wundheilung und den Saft der Früchte gegen die unterschiedlichsten Krankheiten. Die Tradition hat sich in Polynesien, Hawaii und Ostasien bis heute erhalten. Im Jahre 1996 begann die Vermarktung des Nonifruchtsaftes als Wellnessgetränk, zunächst in den USA und Kanada, bald aber auch in Europa und vielen anderen Ländern weltweit.

Ende der 1990iger Jahre begann sich auch die Wissenschaft vermehrt für die Wirkungen der Nonipflanze und besonders seines Fruchtsaftes zu interessieren, was bis heute zu mehr als 500 Publikationen geführt hat. Etliche Arbeiten sind der entzündungshemmenden Wirkung gewidmet, da diese bereits von den Polynesiern intensiv genutzt wurde und auch heute ein wichtiger Grund für die Anwendung des Nonisaftes ist. Im Jahre 2005 erschien eine epidemiologische Studie aus dem Bereich der Fidschi Inseln, bei der die traditionelle Anwendung des Nonisaftes beschrieben wurde. Die meisten Anwendungen geschahen wegen der entzündungshemmenden Wirkungen des Nonisaftes.<sup>[42]</sup> Eine von Westendorf und Mettlich durchgeführte epidemiologische Studie zur Verwendung des Nonisaftes in Europa ergab, dass 15-20% der Nonisaftkonsumenten (die meisten fallen in die Altersgruppe zwischen 40-65 Jahre) positive Wirkungen bei entzündlichen Gelenkerkrankungen verspürt hatten.<sup>[41]</sup> Bedenkt man, dass der Anteil der Personen in der entsprechenden Altersgruppe, die unter entzündlichen Erkrankungen der Gelenke und des Rückens leiden etwa bei 20% liegt, dann ist die Erfolgsquote sehr hoch. Schmerzlindernde Wirkungen von Nonifrucht Extrakten konnten in einer hawaiianischen Studie an Krebspatienten im Endstadium ihrer Erkrankung festgestellt werden.<sup>[57]</sup> Die schmerzhemmende Wirkung von Nonisaft konnte auch im Tierversuch (Hot Plate Test an Mäusen) nachgewiesen werden.<sup>[58]</sup>

Da an der Entstehung von Schmerzen und Entzündungen Metabolite der Arachidonsäure, besonders Prostaglandine, beteiligt sind, haben sich einige Autoren mit der Wirkung des Nonisaftes auf die Aktivitäten der Cyclooxygenasen (COX-1 und COX-2) beschäftigt.<sup>[45][59]</sup> Bei den *in vitro* durchgeführten Versuchen konnten hemmende Wirkungen auf beide Cyclooxy-

genasen, besonders aber auf COX-2, gemessen werden. *In vitro* Untersuchungen mit isolierten Enzymen, denen ein komplexes Stoffgemisch, wie Nonisaft, zugesetzt wird, sind sehr artifiziell und bilden die *in vivo* Situation nur unzureichend ab. Unberücksichtigt bleiben Vorgänge der Resorption und Verteilung der verschiedenen Inhaltsstoffe, sowie deren metabolischen Veränderungen im Organismus. Auch können Matrixbestandteile wie Fruchtsäuren, Gerbstoffe, Mineralbestandteile etc. störende Einflüsse auf das System ausüben. Untersuchungen mit Einzelbestandteilen des Nonisaftes wären weniger Störungen ausgesetzt, liegen aber bislang nicht vor.

In dieser Arbeit wurde daher ein System verwendet, welches der realen Situation näher kommt. Freiwillige Probanden tranken über mehrere Tage Nonisaft, worauf ihnen Blutproben entnommen wurden. Dem frischen Vollblut wurden Substanzen wie Lipopolisaccharid (LPS) oder Calcium-Ionophor (CaIP) zugesetzt, die Monozyten veranlassen, unter anderem die Entzündungsmediatoren Thromboxan-B<sub>2</sub> (TXB<sub>2</sub>), Prostaglandin-E<sub>2</sub> (PGE<sub>2</sub>) und Leukotrien-B<sub>4</sub> (LTB<sub>4</sub>) zu sezernieren. Die Arachidonsäuremetabolite konnten dann im Serum bestimmt werden. Zwar handelt es sich letztlich auch um einen *in vitro* Versuch, die entscheidenden Reaktionen, die zur Hemmung der Bildung der Arachidonsäuremetabolite führen, finden aber *in vivo* statt.

Die erste durchgeführte Pilotstudie zeigt, dass der Nonisaft in *in vitro* Vollblutansätzen eine Verschiebung in der Zusammensetzung der Arachidonsäuremetabolite bewirkt. Vorrangig ist eine Abnahme der PGE<sub>2</sub>- und TXB<sub>2</sub>-Konzentrationen zu erkennen, was entweder einer Hemmung der Enzyme COX-1 und COX-2 oder aber einer Abnahme ihrer Expression entspricht. Gleichzeitig nimmt die Konzentration von LTB<sub>4</sub> zu. Offenbar wird das Enzym 5-LOX, welches für die Entstehung dieses Leukotriens verantwortlich ist, weniger stark gehemmt als die Cyclooxygenasen oder seine Expression wird weniger stark beeinflusst. Die durch den Stimulus freigesetzte Arachidonsäure wird daher vermehrt in Leukotriene verwandelt. Die quantitativen Verschiebungen im Muster der Arachidonsäuremetaboliten unterscheiden sich dabei individuell von Proband zu Proband (s. Tab. 13).

Ein interessanter Befund ergibt sich aus der Bestimmung der Zytokine im Vollblut vor der Zugabe der Stimulatoren LPS oder CaIP. Dieses spiegelt die reale Situation *in vivo* wieder. Vergleicht man die Werte vor der Einnahme von Nonisaft mit derjenigen nach der Einnahme, ergibt sich, dass die Konzentrationen aller drei Zytokine durch die Nonisafteinnahme verringert wurden. Dieser Effekt ist trotz der geringen Zahl der Probanden (7) statistisch signifikant. Der Befund lässt den Schluss zu, dass der Nonisaft *in vivo* eine entzündungshemmende Wirkung ausübt, die sich auf alle Arachidonsäuremetabolite auswirkt. Entweder ist dafür eine duale

Hemmung der Zykloxygenasen und Lipoxygenase verantwortlich, oder die Hemmung erfolgt bereits auf der Stufe der Phospholipase A<sub>2</sub>, wodurch die Bildung der Arachidonsäure gehemmt würde.

In der zweiten Pilotstudie wurde der Versuch unternommen, den zeitlichen Verlauf der Verschiebungen im Muster der Arachidonsäuremetaboliten sichtbar zu machen. Außerdem wurde auch das an Entzündungen beteiligte Zytokin TNF- $\alpha$  mit untersucht. Hierzu erhielten die Probanden drei Tage lang Nonisaft. Blutproben wurden sowohl direkt vor als auch nach Ende der Einnahme sowie einige Tage darüber hinaus entnommen. Wegen des größeren experimentellen Aufwandes konnten die Untersuchungen nur mit drei Probanden durchgeführt werden. Zwei dieser Probanden hatten bereits an der ersten Studie teilgenommen. Die geringe Anzahl der Probanden ließ eine statistische Behandlung der Messergebnisse nicht zu.

Betrachtet man die Veränderungen in der Konzentration der Zytokine im unbehandelten Blut der Probanden nach dreitägiger Einnahme von Nonisaft, so zeigt sich erneut, was bereits in der ersten Pilotstudie aufgefallen war. Die Konzentrationen aller drei gemessenen Arachidonsäuremetabolite verringerten sich gegenüber dem Ausgangswert. Damit erhärtet sich die Hypothese, dass der Nonisaft *in vivo* zu einer dualen Hemmung der Bildung von Arachidonsäuremetaboliten führt. Hierfür könnte eine gleichzeitige Hemmung von Cyclooxygenasen und Lipoxygenasen verantwortlich sein, es könnte aber auch eine Hemmung der Phospholipase A<sub>2</sub> vorliegen, wodurch die Bildung der Arachidonsäure aus ihrer Vorstufe, den Phospholipiden, gehemmt wird.

Veränderungen in der Stimulierbarkeit der Arachidonsäuremetabolite durch LPS oder CaIP treten weniger deutlich hervor als in der ersten Pilotstudie. Nur bei einem von drei Probanden nimmt die Stimulierbarkeit von PGE<sub>2</sub> deutlich ab. Zwar verringert sich die Ausschüttung von TXB<sub>2</sub> im Vollblut nach Behandlung mit LPS bei allen drei Probanden, jedoch ist dieser Effekt nur gering ausgeprägt. Auch tritt die Zunahme der LTB<sub>4</sub>-Bildung nach Stimulation mit CaIP wesentlich schwächer hervor als dies in der ersten Studie der Fall war. Dieses mag daran liegen, dass im ersten Fall eine fünftägige, im zweiten Fall aber nur eine dreitägige Einnahme von Nonisaft erfolgte. Auch bezüglich der TNF- $\alpha$ -Konzentration im Blut war kein eindeutiger Unterschied zwischen dem Wert vor und unmittelbar nach der dreitägigen Nonisafteinnahme zu erkennen.

Blutentnahmen ein, drei und fünf Tage nach Beendigung der Nonisafteinnahme sollten zeigen, ob die Effekte persistieren oder gar Reboundphänomene auftauchen. Letzteres war tatsächlich zu beobachten. Zwei Probanden zeigten einen starken Anstieg der PGE<sub>2</sub>-Konzentration im Vollblut nach *in vitro* Stimulation mit LPS ein bzw. drei Tage nach Absetzen des Nonisafts. Bei dem

dritten Probanden war der Effekt deutlich schwächer ausgeprägt. Bezüglich der TXB<sub>2</sub>-Konzentration war nur bei einem Probanden ein deutlicher Effekt zu sehen. Die Ergebnisse der LTB<sub>4</sub>-Stimulation sind uneinheitlich. Bei zwei Probanden fiel die Konzentration einen Tag nach Absetzen des Nonisaftes stark ab, um danach wieder anzusteigen, wogegen beim dritten Probanden ein stetiger Abfall vom ersten bis zum fünften Tag nach der Nonisafteinnahme erfolgte. Die TNF- $\alpha$ -Konzentrationen stiegen bis zum ersten bzw. dritten Tag nach der Nonieinnahme an, um danach wieder abzufallen.

Insgesamt sind die Ergebnisse wenig geeignet, um daraus weitgehende Rückschlüsse zu ziehen. Am eindeutigsten verhielten sich die Konzentrationen von proinflammatorischen Zytokinen der Arachidonsäurekaskade im unbehandelten Vollblut. Alle Probanden reagierten mit einer Abnahme, was die entzündungshemmende Wirkung des Nonisaftes belegt. Die Stimulierbarkeit der Zytokine im Vollblut *ex vivo* nimmt nach Absetzen des Nonisaftes kurzfristig zu, um danach wieder abzusinken. Dieses könnte für einen Reboundeffekt sprechen. Es ist denkbar, dass eine kurzfristige Erhöhung der Expression von Enzymen der Arachidonsäurekaskade erfolgt, um Hemmungen der Enzyme durch Bestandteile des Nonisaftes zu kompensieren. Nach Ausbleiben der Hemmung fällt diese jedoch rasch wieder ab, um sich danach sogar unter dem Anfangsniveau einzupendeln. Es ist anzunehmen, dass die Enzymaktivitäten längerfristig zu ihren Ausgangswerten zurückkehren werden, wenn die Nonieinnahme unterbleibt. Wie lange dieses dauert kann aus diesen Untersuchungen nicht geschlossen werden. Ebenso bleibt unklar, wie sich die entzündungshemmenden Effekte bei langfristiger Einnahme von Nonisaft verhalten. Aus einer Befragung von etwa 2000 Nonisaftkonsumenten ging hervor, dass Personen mit entzündlichen Gelenkbeschwerden die Symptome durch tägliche Einnahme von mindestens 100 ml Nonisaft jahrelang unter Kontrolle halten können.<sup>[41]</sup> In einer Versuchsreihe aus der Arbeitsgruppe, die mit isolierten humanen Monozyten *in vitro* durchgeführt wurden, hatte sich gezeigt, dass bei Behandlung mit Nonisaft Extrakten auch eine Hemmung der Ausschüttung von Metalloproteinasen (MMP-9) erfolgte.<sup>[58]</sup> Es ist bekannt, dass dieses Enzym bei Patienten, die an Arthritiden leiden, eine destruktive Wirkung auf den Gelenkknorpel ausübt.<sup>[60]</sup> Diese Effekte passen auch zu den traditionellen Verwendungszwecken der Nonifrukt bei Anwendungen gegen Schmerzen<sup>[33]</sup> sowie als antiphlogistisches- und antiinflammatorisches Mittel.<sup>[29]</sup>

Einige Anwendungen, wie die Gabe der Nonifrukt zur Linderung von Asthma<sup>[34]</sup> stehen mit der gesteigerten LTB<sub>4</sub>-Konzentration der ersten Pilotstudie nicht im Einklang. LTB<sub>4</sub> ist ein chemotaktischer Faktor, der vor allem auf Granulozyten, Monozyten, Makrophagen und Lymphozyten wirkt, wobei er entzündliche Erkrankungen, wie Asthmaanfälle, rheumatische

Arthritis, Psoriasis und entzündliche Darmerkrankungen fördert. Bisher wurden jedoch in der Praxis keine zunehmenden Beschwerden dieser Art nach Nonisafteinnahme beobachtet. Im Gegenteil, es gibt zahlreiche Berichte von Patienten, deren Symptome bei solchen Erkrankungen durch Einnahme von Nonisaft gelindert wurden.<sup>[41]</sup> Diese Diskrepanz mag sich aber dadurch erklären, dass die gesteigerten LTB<sub>4</sub>-Konzentrationen im Blut nach *in vitro* Stimulation mit CaIP dadurch zustande kommen, dass Lipoxxygenasen weniger stark gehemmt werden als Cyclooxygenasen, was dazu führt, dass die freigesetzte Arachidonsäure vermehrt in Leukotriene umgewandelt wird. Betrachtet man dagegen die Konzentrationen der Zytokine im Vollblut nach Nonisafteinnahme vor der *in vitro* Behandlung mit LPS oder CaIP, wird ersichtlich, dass sowohl die Konzentrationen von PGE<sub>2</sub> und TXB<sub>2</sub>, als auch von LTB<sub>4</sub> gegenüber dem entsprechenden Wert vor der Nonisafteinnahme verringert sind. Das spricht dafür, dass die beobachtete LTB<sub>4</sub>-Erhöhung nach *in vitro* Stimulation ein Artefakt ist, welches *in vivo* nicht auftritt. Eine *in vivo* Auslösung von Entzündungen beim Menschen verbietet sich aus ethischen Gründen. An Ratten durchgeführte Versuche haben aber gezeigt, dass sich ein durch Injektion von Carrageenan in die Hinterpfote erzeugtes Ödem durch vorherige Verabreichung von Nonisaft deutlich reduzieren lässt.<sup>[12]</sup>

Um den Substanzen auf die Spur zu kommen, die für die geschilderten Effekte des Nonisafte verantwortlich sind, sollten zunächst verschiedene Extrakte und danach isolierte chemische Bestandteile der Nonifrukt in dem verwendeten Entzündungsmodell untersucht werden. Diese Versuche konnten nur *in vitro* durchgeführt werden, da eine Verabreichung dieser Stoffe an Probanden aufgrund von ungeklärten Verträglichkeiten ethisch nicht vertretbar sind.

Extrakte von Pflanzen oder Pflanzenteilen mit verschiedenen Lösungsmitteln werden in der Phytotherapie häufig eingesetzt. Je nach den Eigenschaften des Lösungsmittels und der wirksamen Bestandteile der Pflanze erhält man dadurch angereicherte Fraktionen. Ein weiterer Vorteil ist, dass man nach Bestimmung der Konzentration bestimmter Leitsubstanzen in dem Extrakt diesen durch Verdünnen mit Füllstoffen auf einen definierten Gehalt an Wirksubstanzen einstellen kann. Auf diese Weise umgeht man die natürlichen Schwankungen im Wirkstoffgehalt einer Heilpflanze und erhält ein Präparat mit zuverlässiger Wirksamkeit.

Im vorliegenden Fall wurden drei Nonifrukt-Extrakte gewonnen. Bei den Lösungsmitteln handelte es sich um Hexan, Ethylacetat und Ethanol. Demnach sollten die Extrakte Bestandteile der Nonifrukt in absteigender Lipophilie bzw. aufsteigender Hydrophilie enthalten. Beispielsweise sollten sich die Fettsäuren hauptsächlich in der Hexanfraktion befinden, Flavonoide und

ähnliche Inhaltsstoffe überwiegend in der Ethylacetatfraktion, wogegen die Iridoidglykoside sich überwiegend in der Ethanolfraktion anreichern sollten.

Leider zeigte sich, dass Matrixbestandteile der Extrakte den *in vitro* Versuchsansatz derart störten, dass keine brauchbaren Ergebnisse gewonnen werden konnten. Es wurden daher zwei der bekannten Inhaltsstoffe als Reinsubstanzen eingesetzt, von denen vermutet werden kann, dass sie entzündungshemmende Wirkungen ausüben. Dabei handelte es sich um das Iridoid DAA und die ungesättigte Fettsäure DTA.

Wie alle komplex zusammengesetzten biologischen Strukturen, so enthält auch Nonisaft eine Fülle von Bestandteilen, von denen mittlerweile etwa 200 identifiziert werden konnten.<sup>[61][62][63]</sup> Zu den aussichtsreichsten Kandidaten für eine entzündungshemmende Wirkung gehören die Iridoide. Es wurden insgesamt 15 Iridoide in der Nonipflanze identifiziert (s. Abb. 11.1 und 11.2), wovon allerdings nur zwei über 90% der Gesamtmenge an Iridoiden ausmachen.<sup>[64]</sup> Diese sind die Glykoside Desoxyasperulasäure (DAA) und Asperulasäure (ASPA), deren chemische Formeln in Abb. 11.1 und 11.2 dargestellt sind.

Anti-inflammatorische Wirkungen von Iridoiden konnten unter Verwendung von Carrageenan-induzierten Ödemen an Rattenpfoten und Mäuseohren demonstriert werden. Dabei erhielten die Ratten die Substanzen per os, während diese bei den Mäusen lokal auf die Haut der Ohren appliziert wurden.<sup>[47]</sup> Am Beispiel der Loganinsäure und seines Methylesters, dem Loganin, zeigte sich, dass der lipophile Ester Loganin im transdermalen Mäuseohr-Test eine potentere Wirkung entfaltete als nach peroraler Verabreichung im Rattenpfotenödem-Test, während es bei der hydrophileren Säure genau umgekehrt war. Wegen der strukturellen Verwandtschaft zwischen dem DAA zur Loganinsäure kann man vermuten, dass DAA ebenfalls eine entzündungshemmende Wirkung nach peroraler Verabreichung entfalten sollte. Dieses konnte in der vorliegenden Arbeit allerdings *in vivo* nicht überprüft werden, da nur wenige Milligramm der Substanz zur Verfügung standen, was zur Durchführung eines entsprechenden Tierversuches nicht ausreichte.

Bei *in vitro* Versuchen, die mit dem Iridoid Geniposid an LPS-stimulierten menschlichen Zelllinien (HEL-Zellen) und Makrophagenzelllinien (RAW 264.7) durchgeführt wurden, zeigte sich, dass die entzündungshemmenden Effekte des Iridoids gesteigert wurden, wenn dem Ansatz das Enzym  $\beta$ -Glykosidase zugesetzt wurde, wobei es zur Spaltung des Glykosids in sein Aglykon Genipin kommt.<sup>[47][50]</sup> Sowohl aufgrund der strukturellen Verwandtschaft zwischen Geniposid und DAA, als auch der Verfügbarkeit von Geniposid und seinem Aglykon Genipin, wurden diese beiden Substanzen in die Untersuchungen einbezogen.

Es zeigte sich, dass DAA *in vitro* in niedrigen Konzentrationen senkend auf die LTB<sub>4</sub>- und TXB<sub>2</sub>-Produktion wirkt, in hohen Konzentrationen aber eher die Bildung von PGE<sub>2</sub> reduziert wird (s. Tab. 17). Das Ergebnis steht mit der Aussage von Song *et al.*<sup>[48]</sup> im Einklang, dass Methanolextrakte aus der Nonifrukt, welche unter anderem die Iridoide ASPA und DAA enthalten, antiinflammatorische Wirkungen aufweisen. Sie reduzieren die weitere AA-Freisetzung und somit die Bildung von Entzündungsmediatoren der Arachidonsäurekaskade durch Hemmung der cPLA<sub>2</sub>. Daher müssen auch Variationen in der Gesamtmenge freigesetzter AA durch Nonisafteinnahme in Betracht gezogen werden. Auch stimmen diese Vermutungen mit der Beobachtung überein, dass es im unbehandelten Vollblut der Probanden nach Einnahme von Nonisaft zu einer gleichzeitigen Reduktion von PGE<sub>2</sub>, TXB<sub>2</sub> sowie LTB<sub>4</sub> kommt.

Geniposid zeigte nur in der Konzentration von 0,3 µg/ml eine reduzierende Wirkung auf alle Entzündungsmediatoren. Im Vergleich mit DAA bei identischer Konzentration sind ähnliche Effekte bezogen auf die Veränderung der Entzündungsmediatorkonzentrationen sichtbar (s. Tab. 17). Es sind dabei unterschiedliche Effekte auf die Enzyme COX-1 und COX-2 zu erkennen, wobei die Reduktion der 5-LOX und der gesamten Entzündungsmediatorkonzentrationen fast gleich ist. Bei einer Konzentration von 1 µg/ml sieht man deutlich, dass sich die Effekte bezogen auf PGE<sub>2</sub> unterscheiden. Während DAA noch eine Reduktion von PGE<sub>2</sub> bewirkt, ist bei der vorhandenen Geniposid-Konzentration eine Förderung der PGE<sub>2</sub>-Bildung sichtbar. Dementsprechend verändert sich auch die Gesamtmenge vorliegender Entzündungsmediatoren, sodass die beiden Iridoide trotz ähnlicher Struktur ein unterschiedliches Verhalten bezogen auf die einzelnen Entzündungsmediatoren zeigen. Interessanterweise zeigen die Versuche mit isoliert vorliegendem Genipin bei direkter Zugabe zu humanem Vollblut eher entzündungsfördernde Effekte (s. Tab. 17), während bisherige Publikationen ausschließlich auf fehlende Entzündungshemmungen hinwiesen.<sup>[50]</sup>

Pflanzen produzieren Iridoidglykoside als Phytoalexine. Das heißt, dass diese Stoffe eine Abwehrfunktion gegenüber Fressfeinden ausüben sollen. Die eigentlichen toxischen Stoffe sind dabei die Aglyka, die durch die Wirkung von Glykosidasen aus den Glykosiden freigesetzt werden. Je nach Struktur besitzen diese Aglyka eine mehr oder weniger hohe Reaktivität. Genipin ist als Aglykon wesentlich reaktiver als das entsprechende Glykosid Geniposid. Die Verbindung reagiert z.B. spontan mit Aminosäuren unter Bildung blau gefärbter Produkte.<sup>[65]</sup> Die beobachtete entzündungsfördernde Wirkung des Genipins kann daher als Ausdruck der erhöhten Reaktivität und gewebeschädigenden Wirkung des Genipins angesehen werden.

Interessant sind ferner die Ergebnisse mit der ungesättigten Fettsäure DTA. Nach Zugabe zum *in vitro* Vollblutansatz zeigte sich eine starke dosisabhängige Erhöhung der Produktion von LTB<sub>4</sub>, ohne dass es zu einer gleichzeitigen Verringerung der Bildung von TXB<sub>2</sub> oder PGE<sub>2</sub> kam. Die Produktion von PGE<sub>2</sub> wurde ebenfalls erhöht, allerdings weniger stark und nicht bei allen Konzentrationen von DTA. Die vermehrte LTB<sub>4</sub>-Bildung ist daher nicht als kompensatorische Reaktion einer Hemmung der Cyclooxygenasen anzusehen, wie es im Falle der Pilotstudien vermutet wurde. Da die Steigerung der Summe der Arachidonsäuremetabolite gegenüber der Kontrolle beträchtlich ist, kommt als Erklärung am ehesten eine Erhöhung der Arachidonsäurefreisetzung durch DTA in Frage. Dies könnte z.B. die Folge einer Verdrängung von freier Arachidonsäure aus der Speicherung in der Zellmembran durch die lipophile Fettsäure sein. Es sollten allerdings nur sehr geringe Mengen an Arachidonsäure in freier Form gespeichert sein. Der überwiegende Anteil liegt als Phospholipid gebunden in der Zellmembran vor. Damit daraus freie Arachidonsäure gebildet werden kann, muss es zu einer Aktivierung des Enzyms Phospholipase-A<sub>2</sub> kommen. Dies kann z.B. durch Vermittlung der Zytokine IL-1, IL-6 und TNF- $\alpha$  geschehen, die ihrerseits als Folge eines Entzündungsreizes aus Makrophagen ausgeschüttet werden. Auch eine Erhöhung der intrazellulären Calcium-Konzentration kommt als Auslöser in Frage.

DTA konnte von unserer Arbeitsgruppe erstmals in der Nonipflanze nachgewiesen werden.<sup>[24]</sup> Durch ihre drei Doppelbindungen hat sie Ähnlichkeit mit Linolensäure, unterscheidet sich aber von dieser durch die Anzahl der C-Atome (10 anstatt 18).  $\alpha$ -Linolensäure ist eine essentielle Fettsäure, die zum Aufbau der Arachidonsäure dient. Sie fungiert auch selbst als Substrat der Lipoxygenasen, wobei sich eine ganze Reihe von oxidierten Produkten bildet, denen entzündungshemmende Wirkungen nachgesagt werden.<sup>[66]</sup> Ob die Steigerung der LTB<sub>4</sub>-Freisetzung durch DTA sich *in vivo* beobachten lässt und welche biologischen Konsequenzen sich daraus ergeben, kann aus diesen Versuchen nicht abgeleitet werden. Es wäre aber denkbar, dass es bei längerfristiger Einnahme von Nonisaft zu einer Speicherung von DTA in den Membranen von Zellen kommt, die an Entzündungsprozessen beteiligt sind, wodurch letztlich eine Depletion der Arachidonsäure und als Folge eine Hemmung von Entzündungsreaktionen erfolgen könnte. Derartige Mechanismen wurden für die  $\omega$ -3-Fettsäure  $\alpha$ -Linolensäure beschrieben.<sup>[67]</sup> Eine solche Hypothese würde auch zu der häufig gemachten Beobachtung von Nonikonsumenten passen, dass vorhandene Entzündungssymptome sich nach Nonieinnahme zunächst verstärken, um nach einiger Zeit in einen Zustand der Hemmung überzugehen.<sup>[41]</sup>

Keine der betrachteten Reinsubstanzen spiegelt die duale COX-Inhibition mit zunehmender 5-LOX Produktion der Pilotstudien wieder. Es sind vereinzelt hemmende Effekte bei der AA-Metabolisierung erkennbar, wobei die Iridoide DAA und Geniposid eher eine LTB<sub>4</sub>-Senkung hervorrufen. Es ist daher eher unwahrscheinlich, dass DAA für die beobachteten Verschiebungen im Arachidonsäuremetabolismus der *ex vivo* Versuche verantwortlich ist.

Es können aber andere Inhaltsstoffe, die im Rahmen dieser Arbeit nicht getestet werden konnten, für die beobachteten Effekte der Pilotstudien verantwortlich sein oder ein Mischeffekt vorliegen. Ein Dogma der Phytotherapie besagt, dass die komplette Zusammensetzung einer Pflanze oder eines Pflanzenteils entscheidend für die Wirkung ist. Bei der Betrachtung von isolierten Substanzen können fehlende Co-Faktoren ausreichen, um entsprechende Wirkungen nicht mehr zu messen. Durch die isolierte Betrachtungsweise konnte auch nicht ermittelt werden, inwieweit sich die einzelnen Inhaltsstoffe eventuell gegenseitig beeinflussen. Des Weiteren müssen mögliche metabolische Umwandlungsprozesse der Substanzen, welche durch die *in vitro* Tests umgangen werden, in Betracht gezogen werden.

Aufgrund der Ergebnisse dieser Arbeit entstehen konkrete Vorschläge für weiterführende experimentelle Versuche. Neben der Möglichkeit weitere isoliert vorliegende Bestandteile der Nonipflanze auf ihre anti-inflammatorische Wirkung zu testen, wäre es wichtig mittels PCR zu klären, ob die Enzyme COX-1 und COX-2 direkt oder die Expression der Enzyme gehemmt werden. Ebenfalls von Interesse wäre, wie sich die beobachteten Effekte des Nonisaftes auf die Zytokinkonzentrationen im Blut über einen längeren Einnahmezeitraum verhalten. Nehmen sie zu, bleiben sie gleich oder lässt die Wirkung mit der Zeit nach? In der vorliegenden Arbeit konnte nur ein geringer Ausschnitt des Entzündungsgeschehens untersucht werden. Es wäre aber vorteilhaft, die Wirkung von Nonisaft auf möglichst viele am Entzündungsgeschehen beteiligte Parameter zu untersuchen. Dieses wurde in einer Dissertation aus unserer Arbeitsgruppe (Florian Schöne, 2008) im Ansatz bereits versucht, wobei insgesamt 16 pro- und anti-inflammatorisch wirkende Zytokine im Blut von Patienten mit schmerzhaften chronischen Entzündungserkrankungen vor und nach Verabreichung von Nonisaft untersucht wurden. Leider waren die Ergebnisse wegen der begrenzten Zahl der Patienten wenig aussagekräftig. Schließlich wäre es wünschenswert, die Wirkungsweise der  $\omega$ -3-Fettsäure DTA genauer zu betrachten. Um herauszufinden, worauf die starke Steigerung der LTB<sub>4</sub>-Produktion beruht, könnten die *in vitro* Versuche ohne Beteiligung des Stimulators CaIP durchgeführt werden. Diese Versuche könnten zeigen, ob DTA selbst eine entzündungsauslösende Wirkung zukommt. Durch Extraktion von Nonisaft mit Hexan lässt sich DTA vollständig entfernen, ohne dass es zu einem größeren

Verlust an anderen Bestandteilen kommt.<sup>[24]</sup> Setzt man nun einen abgereicherten Saft in Untersuchungen an Tieren oder Menschen ein, ließe sich die Frage klären, ob DTA für die beobachteten entzündungshemmenden Wirkungen verantwortlich ist.

## V Zusammenfassung

Noni (*Morinda citrifolia*) ist eine traditionelle polynesische Heilpflanze, deren Gebrauch bis in Zeiten vor unserer Zeitrechnung zurückgeht. Seit knapp zwanzig Jahren hat sich Nonisaft vor allem in Form von Fruchtsäften als Wellness-Getränk über den gesamten Globus ausgebreitet. Von den Konsumenten werden mannigfache positive Wirkungen bei vielen Erkrankungen beschrieben, wobei entzündungshemmende Wirkungen im Vordergrund stehen.

Im Rahmen dieser Arbeit wurde der Nonifruchtsaft auf seine entzündungshemmende Wirkung in einem *ex vivo* Assay untersucht. Zu diesem Zweck tranken Probanden über einen Zeitraum von fünf bzw. drei Tagen ein Nonifruchtsaft-Präparat aus dem Handel. Es wurde der Einfluss des Saftes auf die Konzentration der Entzündungsmediatoren PGE<sub>2</sub>, TXB<sub>2</sub> und LTB<sub>4</sub> im Blut mit Hilfe von ELISA-Tests bestimmt. Sowohl nach fünftägiger als auch dreitägiger Einnahme von 2 ml Nonisaft pro kg Körpergewicht und Tag kam es zu einer Reduktion der Konzentration aller drei Zytokine im Blut der Probanden. Dies deutet auf eine duale Hemmung von Cyclooxygenasen und Lipoxygenasen hin.

Durch *in vitro* Stimulation der Blutproben der Probanden mit Lipopolysaccharid oder Calcium-Ionophor, welche eine Ausschüttung von Arachidonsäure hervorrufen, wurde eine Hemmung der Bildung der Cyclooxygenaseprodukte PGE<sub>2</sub> und TXB<sub>2</sub> erreicht, wogegen die Produktion des Lipoxygenase vermittelten LTB<sub>4</sub> deutlich zunahm. Dies deutet auf eine stärkere Hemmung von COX-1 und COX-2 gegenüber LOX-5 hin, was den Metabolismus der freigesetzten Arachidonsäure in Richtung des Leukotriens lenkt. Es scheint sich um eine Erscheinung der *in vitro* Bedingungen zu handeln, da der Effekt *in vivo* nicht zu beobachten ist.

Das in der Nonifrucht enthaltene Iridoid DAA und die ungesättigte Fettsäure DTA sowie das nicht in der Nonipflanze vorkommende Iridoid Geniposid und sein Aglykon Genipin wurden *in vitro* dem Vollblut eines unbehandelten Probanden zugesetzt und der Einfluss auf die LPS oder CaIP stimulierte Bildung von PGE<sub>2</sub>, TXB<sub>2</sub> und LTB<sub>4</sub> gemessen. Dabei zeigte das Iridoid DAA in geringen Konzentrationen LTB<sub>4</sub>- und TXB<sub>2</sub>-Produktionssenkungen; in höheren Konzentrationen reduzierte es eher PGE<sub>2</sub>. Bei allen DAA-Konzentrationen lag eine Reduzierung der Gesamtmenge der untersuchten Entzündungsmediatoren vor. Trotz ähnlicher Strukturen wiesen Geniposid und DAA unterschiedliche Effekte auf.

Die dreifach ungesättigte Fettsäure DTA, die strukturell zu den  $\omega$ -3-Fettsäuren gehört, aber nur 10 C-Atome besitzt, ruft *in vitro* eine bemerkenswerte, dosisabhängige Steigerung der LTB<sub>4</sub>-Konzentration hervor, die nicht von einer gleichzeitigen Reduktion von PGE<sub>2</sub> oder TXB<sub>2</sub> begleitet ist. Als mögliche Erklärung bietet sich an, dass die Substanz selbst als Stimulator der Freisetzung von Arachidonsäure fungiert, oder die Wirkung des Stimulators CaIP verstärkt.

Die Ergebnisse sind als Tendenzen aufzufassen und weisen die Notwendigkeit auf, weitere experimentelle und klinische Studien, mit größeren Probandenzahlen und häufigeren Blutabnahmen in engmaschigeren Zeitabständen, durchzuführen.

## VI Summary

Noni (*Morinda citrifolia*) is a traditional medicinal plant of Polynesian people. Its use goes back more than 2000 years. Since about 20 years ago, noni fruit juice became popular as a wellness drink worldwide. Consumers of noni juice often report beneficial effects at a variety of diseases, especially those accompanied with inflammatory symptoms.

In the present work, the effect of noni juice was investigated in two pilot studies with respect to its anti-inflammatory activity in an ex vivo model. For this purpose seven (three) volunteers received 2 ml/kg bodyweight and day of noni juice over a period of five (three) days. The influence of the juice on the concentration of the proinflammatory cytokines PGE<sub>2</sub>, TXB<sub>2</sub> and LTB<sub>4</sub> in the blood was investigated using Elisa assays specific for the respective cytokines. Reductions of all three cytokines were observed after treatment of the volunteers with noni juice for five as well as those for three days. This is indicative of a dual inhibition of cyclooxygenases and lipoxygenases.

Ex vivo stimulation of the blood samples with LPS and CaIP, which stimulate the formation of arachidonic acid (AA) with subsequent transformation to the investigated cytokines, resulted in a reduction of the prostaglandines PGE<sub>2</sub> and TXB<sub>2</sub>, whereas the concentration of the leukotriene LTB<sub>4</sub> was increased. This indicates a preferential inhibition of COX<sub>1</sub> and COX<sub>2</sub> over LOX<sub>5</sub>, which directs the metabolism of AA more to LTB<sub>4</sub>. It seems, however, that this phenomenon is unique for the in vitro situation, since it was not observed in vivo.

The iridoid DAA, occurring in noni fruits and the unsaturated fatty acid DTA, as well as the iridoid geniposid and its aglycone genipin, which do not occur in the noni plant, were added to blood samples of one volunteer, who was not pretreated with noni juice. The influence of the isolated compounds on the formation of the three AA-metabolites after stimulation of the blood with LPS and CaIP was investigated. The iridoid DAA at low concentrations showed a slight reduction in the formation of LTB<sub>4</sub> and TXB<sub>2</sub>, whereas at higher concentrations the formation of PGE<sub>2</sub> was preferentially reduced. The total amount of liberated AA-metabolites was reduced at all DAA concentrations investigated. Despite the structural similarities between DAA and geniposid, both compounds exerted different effects.

The triple unsaturated fatty acid DTA, which depends structurally to ω-3-fatty acids, in spite of having only 10 instead of 18 carbon atoms, exerts in vitro a remarkable increase of the concentration of LTB<sub>4</sub>, which is not accompanied by a reduction of the formation of PGE<sub>2</sub> and TXB<sub>2</sub>. Possible explanations are that the compound itself stimulates the formation of AA with its further transformation to LTB<sub>4</sub>, or an enhancement of the stimulatory effect caused by CaIP.

The results should be understood as preliminary. Further experimental and clinical investigations are necessary to confirm the results and provide more details of the mechanism responsible for the observed effects.

## VII Abkürzungsverzeichnis

5-HETE	5-Hydroxyeicosatetraensäure
AA	Arachidonsäure
BE	Blutentnahme
CaIP	Calcium-Ionophor
COX	Cyclooxygenase
DAA	Decatylasperulasäure
DC	Dünnschichtchromatographie
ddH <sub>2</sub> O	doppelt destilliertes Wasser
DMSO	Dimethylsulfoxid
DTA	2 <i>E</i> ,4 <i>Z</i> ,7 <i>Z</i> - Decatriensäure
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EIA	Enzymimmunoassay -> immunologisches Nachweisverfahren
ELISA	Enzym-linked immunoassay = Enzym gekoppelter Immunoassay
EtOH	Ethanol
h	hour = Stunde
IFN	Interferone
IU	Internationale Units
K0	Kontrollprobe ohne zusätzlicher Stimulierung
K+	Kontrollprobe mit zusätzlicher Stimulierung
K++	Kontrollprobe mit Stimulierung und zusätzlichem Hemmer
KGW	Körpergewicht
LOX	Lipoxygenase
LPS	Lipopolysaccharid
LT	Leukotrien
LTB <sub>4</sub>	Leukotrien B <sub>4</sub>
M	Molar (mol/l)
mM	millimolar (mmol/l)
NSAID	Non-steroidal anti-inflammatory drug
μM	mikromolar (μmol/l)
PAF	platelet activating factor -> Plättchen aktivierender Faktor
PAMP	pathogen-associated molecular pattern
PG	Prostaglandin
PGE <sub>2</sub>	Prostaglandin E <sub>2</sub>

PGG <sub>2</sub>	Prostaglandin G <sub>2</sub>
PGH <sub>2</sub>	Prostaglandin H <sub>2</sub>
PGHS	Prostaglandin H - Synthase
PLA <sub>2</sub>	Phospholipase A <sub>2</sub>
PUFA	Poly-unsaturated fatty acids ( mehrfach ungesättigte Fettsäuren )
RPM	Rounds per minute = Umdrehungen pro Minute
RT	Raumtemperatur
TNF	Tumornekrosefaktor
TXB <sub>2</sub>	Thromboxan B <sub>2</sub>

## VIII Abbildungsverzeichnis

Abb. 1 Der humorale und zelluläre Anteil des Immunsystems im Überblick .....	3
Abb. 2 Schematische Darstellung der Metabolisierung von Eikosa-Säuren .....	5
Abb. 3 Übersicht der PLA <sub>2</sub> -Aktivierung .....	7
Abb. 4 Hydrolytische Spaltung .....	8
Abb. 5 Biosynthese der Eikosanoide PGE <sub>2</sub> und TXB <sub>2</sub> aus der Arachidonsäure .....	9
Abb. 6 Biosynthese des Leukotriens LTB <sub>4</sub> aus Arachidonsäure .....	12
Abb. 7 Strukturformel von Indomethacin .....	13
Abb. 8 Strukturformel von Zileuton .....	14
Abb. 9 Nonipflanzen im Labor (Ursprungsort Hawaii), sowie die Blüte und Frucht in unreifem Stadium .....	16
Abb. 10 Strukturformel von DTA .....	17
Abb. 11.1 Chemische Strukturformeln der Iridoide 1 -7 in der Nonifrucht .....	18
Abb. 11.2 Chemische Strukturformeln der Iridoide 8 - 15 in der Nonifrucht .....	19
Abb. 12 Vergleich der beiden Iridoid-Strukturen DAA und Geniposid sowie des nach $\beta$ -glykosylierung stabil vorliegenden Aglykons Genipin .....	24
Abb. 13 Der verwendete Nonisaft: Tahitian Noni Juice (TNJ) .....	25
Abb. 14 Befüllung der 6-Well Petrischale mit humanem Vollblut .....	33
Abb. 15 Standardkurve eines PGE <sub>2</sub> -Kits .....	40
Abb. 16 Standardkurve eines TXB <sub>2</sub> -Kits .....	41
Abb. 17 Standardkurve eines LTB <sub>4</sub> -Kits .....	41
Abb. 18 Standardkurve eines TNF- $\alpha$ -Kits .....	42
Abb. 19 PGE <sub>2</sub> K0-Zeitkurve .....	43
Abb. 20 TXB <sub>2</sub> K0-Zeitkurve .....	43
Abb. 21 LTB <sub>4</sub> K0-Zeitkurve .....	44
Abb. 22 PGE <sub>2</sub> -Konzentrationskurve, stimuliert durch LPS .....	45
Abb. 23 TXB <sub>2</sub> -Konzentrationskurve, stimuliert durch LPS .....	46
Abb. 24 LTB <sub>4</sub> -Konzentrationskurve, stimuliert durch CaIP .....	47
Abb. 25 Grafische Umwandlung der LTB <sub>4</sub> -Konzentrationskurve aus Abb. 24 .....	48
Abb. 26 TNF- $\alpha$ -Konzentrationskurve, stimuliert durch LPS .....	49
Abb. 27 Kurvenanpassung der Daten aus Abb. 26 .....	50
Abb. 28 Wirkungskurve von Indomethacin bezogen auf die PGE <sub>2</sub> -Konzentration .....	51
Abb. 29 Wirkungskurve von Indomethacin bezogen auf die TXB <sub>2</sub> -Konzentration .....	52
Abb. 30 Wirkungskurve von Zileuton bezogen auf die LTB <sub>4</sub> -Konzentration .....	53

---

<b>Abb. 31 Exponentielle Kurvenanpassung der Daten aus Abb. 30</b> .....	54
<b>Abb. 32 Grafische Umwandlung der Tabelle 12</b> .....	56
<b>Abb. 33 PGE<sub>2</sub>-Konzentration vor und nach Nonisafteinnahme</b> .....	57
<b>Abb. 34 TXB<sub>2</sub>-Konzentration vor und nach Nonisafteinnahme</b> .....	58
<b>Abb. 35 LTB<sub>4</sub>-Konzentration vor und nach Nonisafteinnahme</b> .....	59
<b>Abb. 36 AA-Metabolisierungsverschiebung nach fünftägiger Nonisafteinnahme bei den K+ Proben</b> .....	60
<b>Abb. 37 PGE<sub>2</sub>-Konzentration vor und nach Nonisafteinnahme</b> .....	64
<b>Abb. 38 TXB<sub>2</sub>-Konzentration vor und nach Nonisafteinnahme</b> .....	65
<b>Abb. 39 LTB<sub>4</sub>-Konzentration vor und nach Nonisafteinnahme</b> .....	66
<b>Abb. 40 TNF-<math>\alpha</math>-Konzentration vor und nach Nonisafteinnahme</b> .....	67
<b>Abb. 41 AA-Metabolisierungsverschiebung nach dreitägiger Nonisafteinnahme bei den K0-Proben</b> .....	71
<b>Abb. 42 PGE<sub>2</sub>-Konzentrationsveränderungen durch DAA, Geniposid, Genipin oder DTA</b> .....	72
<b>Abb. 43 TXB<sub>2</sub>-Konzentrationsveränderungen durch DAA, Geniposid, Genipin oder DTA</b> .....	73
<b>Abb. 44 LTB<sub>4</sub>-Konzentrationsveränderungen durch DAA, Geniposid, Genipin oder DTA</b> .....	74

## IX Tabellenverzeichnis

Tabelle 1	verwendete Chemikalien .....	27
Tabelle 2	Verbrauchsmaterialien .....	28
Tabelle 3	Testmaterialien .....	28
Tabelle 4	Übersicht der Probenbenennung .....	31
Tabelle 5	Trink- und Blutentnahmeverhalten der Probanden .....	34
Tabelle 6	Aus der Verdünnung resultierende Konzentrationen der Standardkurve S1-S8 .....	36
Tabelle 7	Erläuterung der Parameter für den Cayman ELISA.....	37
Tabelle 8	Schematisch dargestellte ELISA Platte.....	37
Tabelle 9	Auftragsschema, wie viel wovon in welches Well zu pipettieren ist.....	37
Tabelle 10	Übersicht der optimalen Stimulation-Konzentration und Inkubationszeit der Entzündungsmediatoren .....	50
Tabelle 11	Übersicht der optimalen Hemmer-Konzentrationen und Inkubationszeiten vor der Stimulation der Entzündungsmediatoren aus Tab. 10.....	55
Tabelle 12	Inversverfahren anhand des Entzündungsmediators PGE <sub>2</sub> .....	56
Tabelle 13	Zusammenfassung der Ergebnisse von Abb. 33, 34 und 35 .....	61
Tabelle 14	Ausgangswerte der Entzündungsmediatorkonzentrationen im Vollblut (K0 Werte der K+ Proben aus Abb. 33, 34 und 35).....	62
Tabelle 15	Vergleich der Entzündungsmediatorkonzentrationen der Pilotstudie-2 zu den Zeitpunkten T0 und T1.....	69
Tabelle 16	Ausgangswerte (K0) der Entzündungsmediatorkonzentrationen im Vollblut aus Abb. 37, 38 und 39.....	70
Tabelle 17	Zusammenfassung der %-Konzentrationsveränderung aus den Abb. 42, 43 und 44.....	75

## **X Literaturverzeichnis**

- [1] Egger, G. (2005) Die Akute Entzündung - Grundlagen, Pathophysiologie und klinische Erscheinungsbilder der Unspezifischen Immunität 1. Auflage, Springer Wien New York
- [2] Rassow, J., Hauser, K., Metzger, R., Deutzmann, R. (2008) Duale Reihe Biochemie 2. Auflage, Thieme, Stuttgart
- [3] [www.caymanchem.com/pdfs/514010.pdf](http://www.caymanchem.com/pdfs/514010.pdf) (am 8.10.12 um 00:43Uhr) PGE<sub>2</sub> ELISA KIT von Cayman
- [4] Löffler, G., Betribes, P. E., Heinrich, P. C. (2006) Biochemie und Pathobiochemie 8. Auflage, Springer, Berlin, Heidelberg
- [5] Laufer, S., Gay, S., Burne, K. (2002) Rheumatische Erkrankungen und Entzündungen 1. Auflage, Thieme, Stuttgart
- [6] Spencer, A. G., Woods, J. W., Arakawa, T., Singer, I.I., Smith, W. L. (1998) Subcellular localization of prostaglandin endoperoxide H synthases-1 and -2 by immunoelectron microscopy. *Journal of Biological Chemistry*, Vol. 273, pp. 9886-9893
- [7] Bos, C. L., Richel, D. J., Ratsame, T., Peppelenbosch M. P., Versteeg, H. H. (2004) Prostanoids and prostanoid receptors in signal transduction. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, Vol. 36, pp. 1187-1205
- [8] Samuelson, B. (1983) Leukotriens: Mediators of Immediate Hypersensitivity Reaktion and Inflammation. *Science*, Vol. 220, pp. 568-575
- [9] Dixon, R. A. F., Diehl, R. E., Opas, E., Rands, E., Vickers, P. J., Evans, J. F., Gillard, J. W., Miller, D. K. (1990) Requirement of a 5-lipoxygenase-activating protein for leukotriene synthesis. *Nature* Vol. 343, pp. 282-284
- [10] Yokomizo, T., Takashi, I., Kyungho, C., Yoh, T., Takao, S. (1997) A G-protein-coupled receptor for leukotriene B, that mediates chemotaxis. *Nature*, Vol. 387, pp. 620-624

- [11] Karrow, T., Lang-Roth, R. (2012) Allgemeine und Spezielle Pharmakologie und Toxikologie 20. Auflage, Dr. med. Thomas Karow, S.539ff
- [12] Dussossoy, E., Brat, P., Bony, E., Boudard, F., Poucheret, P., Merzt, C., Giaimis, J., Michel, A. (2011) Characterization anti-oxidative and anti-inflammatory effects of Costa Rican noni juice (*Morinda citrifolia* L.). *Journal of Ethnopharmacology*, Vol. 133, pp. 108-155
- [13] Cartner, G. W., Young, P. R., Albert, D. H., Bouska, J., Dyer, R., Bell, R. L., Summers, J. B., Brooks, D. W. (1991) 5-Lipoxygenase Inhibitory Activity of Zileuton. *The Journal of Pharmacology and experimental Therapeutics*, Vol. 256(3)
- [14] Härtel, U., Volger, E. (2004) Inanspruchnahme und Akzeptanz klassischer Naturheilverfahren und alternativer Heilmethoden in Deutschland - Ergebnisse einer repräsentativen Bevölkerungsstudie. *Forschende Komplementärmedizin Klassische Naturheilkunde*, Vol. 11, pp. 327-334
- [15] Abbott, I., Shimizu, C. (1985). The geographic origin of the plants most commonly used for medicine by Hawaiians. *Journal of Ethnopharmacology*, Vol. 14, pp. 213-222
- [16] Morton, J.F. (1992). The ocean-going noni, or Indian Mulberry (*Morinda citrifolia*, Rubiaceae) and some of its „colorful“ relatives. *Economic Botanik*, Vol. 46 (3); pp.241-256
- [17] Ross, I.A., (2001). *Medicinal Plants of the World Chemical Constituents, Traditional and Modern Medicinal Uses* Vol. 2 Humana Press; Totowa, New Jersey, pp. 309-317
- [18] Whistler, W. A., (1992) *Polynesian herbal medicine*. Honolulu, Hawaii: National Tropical Botanical Garden. Section on Polynesian Medical Practices Today.
- [19] Dixon, A.R., McMillen, Etkin, N.L. (1998). The transformation of noni, a traditional Polynesia medicine (*Morinda citrifolia*, Rubiaceae). *Economic Botany*, Vol. 53 (1), pp. 51-68.
- [20] Westendorf, J., Mettlich, C. (2008) *Noni Morinda citrifolia: Altes Wissen und neue Erkenntnisse* 1. Auflage, pp.12

- [21] Baker, J.G. (1970). Flora of Mauritius and the Seychelles, J. Cramer and H.K.Swann (eds), Verlag J.Cramer, New York, NY, USA.
- [22] Clatchey, W.M., (2002). From Polynesian Healers to Health Food Stores: Changing Perspectives of *Morinda citrifolia* (Rubiaceae). Integrative Cancer Therapies, Vol. 1(2), pp. 110-120
- [23] EFSA (2009). Scientific Opinion of the Panel on Dietetic Products, Nutrition and Allergies on a request from European Commission on the safety of Tahitian Noni „*Morinda citrifolia* (noni) fruit puree and concentrate“ as a novel food ingredient. The EFSA Journal, Vol. 998, pp.1-16
- [24] Basar, S., Westendorf, J., (2010). Identification of (2E,4Z,7Z)-Decatrienoic Acid in Noni Fruit and Its Use in Quality Screening of Commercial Noni Products. Food Anal. Methods
- [25] Ghisalberti, E.L. (1998) Biological and pharmacological activity of naturally occurring iridoids and secoiridoids. Phytomedicine, Vol. 5 (2), pp.147-163
- [26] Deng, S., West, B.J., Palu, A.K., Jensen, C.J. (2011). Determination and Comparative Analysis of Major Iridoids in Different Parts and Cultivation Sources of *Morinda citrifolia*. Phytochemical Analysis, Vol. 22, pp. 26-30
- [27] Hirazumi, A.,Furusawa, E., Chou, S.C., Hokama, Y. (1994) Anticancer Activity of *Morinda citrifolia* (Noni) on Intraperitoneally Implanted Lewis Lung Carcinoma in Syngeneic Mice. Proc. West. Pharmakon. Soc., Vol. 37(1), pp. 145-146
- [28] Locher, C.P., Witvrouw, M., De Bethune, M.-P., Bruch, M.T., Howard F. M., Davis, H., Lasure, A., Pauwels, R., De Clerck, E., Vlietinck, A.J. (1996) Antiviral activity of Hawaiian medicinal plants against human immunodeficiency Virus Type-1 (HIV-1). Phytomedicine Vol. 2(3), pp. 259-264
- [29] McClatchey, W. (1996) The ethnopharmacopoeia of Rotuma. Journal of Ethnopharmacology, Vol. 50, pp. 147-156

- [30] Oakes, A. J., Morris, M. P., (1958) The West Indian weedwoman of the United States Virgin Islands. Bull Hits eMd, Vol. 32, pp. 164-170
- [31] Haji Mohiddin, M. Y. B., Chin, W., Holdsworth, D. (1992) Traditionell Medizinball planst of Brunei, Darussalam Part. 3 Sengkurong. Int J Pharmakon, Vol. 30(2), pp. 105-108
- [32] Weiner, M. A. In Secrets of Fijian Medicien. University of California, Berkeley. 1970
- [33] Whistler, W. A. (1985) Traditional and herbal medicine in the Cook Islands. J. Ethnopharmacol, Vol. 13(3), pp. 239-280
- [34] McKoy, M.-L. G., Thomas, E. A., Simon, O. R. (2002) Preliminary Investigation of the Anti-inflammatory Properties of an Aqueous Extract from *Morinda citrifolia* (Noni). Proc. West. Pharmacol. Soc., Vol. 45, pp. 76-78
- [35] Dittmar, A. (1993) *Morinda citrifolia* L. – Use in Indigenous Samoan Medicine. Journal of Herbs, Spices & Medicinal Plants, Vol. 1(3)
- [36] Rasal, V. P., Sinnathambi, A., Ashok, P., Yeshmaina, S. (2008) Wound Healing and Antioxidant Activities of *Morinda citrifolia* Leaf Extract in Rats. Iranian Journal of Pharmacology & Therapeutics, Vol. 7, pp. 49-52
- [37] Paul, A., Su, Chen., Zhou, B.-N., West, B., Jensen J. (2010) Wound Healing Effects of Noni (*Morinda citrifolia* L.) Leaves: A Mechanism Involving its PDGF/A2A Receptor Ligand Binding and Promotion of Wound Closure. Phytotherapy Research, Vol. 24, pp. 1437-1441
- [38] Cambie, R. C., Ash, J. In Fijian Medial Planst. Australia. Csiro pub. 1994
- [39] Heinicke, R.M. (1985). The pharmacologically active ingredient of Noni. Pacific Tropical Botanical Garden Bulletin, Vol. 15, pp. 10-14

- [40] European Commission. (2003) Commission Decision of 5 June 2003 authorising the placing on the market of „noni juice“ (Juice of the fruit of *Morinda citrifolia* L.) as a novel food ingredient under Regulation (EC) No 258/97 of the European Parliament and of the Council. {Online im Internet} URL: [http://eur-lex.europa.eu/Result.do?arg0=morinda+citrifolia&arg1=&arg2=&titre=titre&chlang=de&RechType=RECH\\_mot&Submit=Suche](http://eur-lex.europa.eu/Result.do?arg0=morinda+citrifolia&arg1=&arg2=&titre=titre&chlang=de&RechType=RECH_mot&Submit=Suche) , (am 6.10.2012, 11.10Uhr)
- [41] Westendorf, J., Mettlich, C. (2009) The benefits of noni juice: an epidemiological evaluation in Europe. *Journal of Medicinal Food Plants* Vol. 1(2), pp. 64 - 79
- [42] Pande, M., Mills, G., Singh, N., Voro, T., Naiker, M. (2005) The Kura Files: Qualitative Social Survey. *Pacific Health Surveillance and Response* Vol. 12(2)
- [43] Glang, J. (2009). Untersuchung zum Einfluss von *Morinda citrifolia* L. Fruchtsaft auf Infektions- und Entzündungsstatus einer Gingivitis/Parodontitis. Dissertation aus dem Institut für Experimentelle und Klinische Pharmakologie und Toxikologie des Zentrums für Experimentelle Medizin des Universitätsklinikums Hamburg-Eppendorf.
- [44] Schöne, T.F. (2008). Experimentelle und klinische Untersuchung zur analgetischen und entzündungshemmenden Wirkung von Fruchtextrakten aus *Morinda citrifolia* (Noni). Dissertation aus dem Institut für Experimentelle und Klinische Pharmakologie und Toxikologie des Zentrums für Experimentelle Medizin des Universitätsklinikums Hamburg-Eppendorf.
- [45] Darien, B. J., Xu, J., McSloy, A. C., Anderson, B. K., Godbee, R. G., Peek, S.F. (2006) Tahitian Noni® Equine Essentials™: A novel antiinflammatory and a COX-2 inhibitor, which regulates LPS-Induced Inflammatory Mediator Expression in Equine Neonatale Monocytes. In the *Proceedings of ACVIM Forum*, USA.
- [46] Li, R. W., Myers, S. P., Leach, D. N., Lin, G. D., Leach, G. (2003) A cross-cultural study: anti-inflammatory activity of Australian and Chinese plants. *Journal of Ethnopharmacology*, Vol. 85, pp. 25-32
- [47] Reich, D.L.M., Manez, S., Rios, J.H. (1994) Structural considerations on the iridoide as anti-inflammatory agents. *Planta Med.*, Vol.60, pp. 232-234

- [48] Song, H. S., Park, S. H., Ko, M. S., Jeong, J. M., Sohn, U. D., Sim, S. S. (2010) *Morinda citrifolia* Inhibits Both Cytosolic Ca<sup>2+</sup> -dependent Phospholipase A<sub>2</sub>. Korean J Physiol Pharmacol, Vol. 14, pp. 163-167
- [49] Ling, S.K., Tanaka T., Kouno I. (2003). Effets of Iridoids on Lipoxygenase and Hyaluronidas Activities and their activation by β-Glycosidase in the Presence of Amino Acids. Biol. Pharm. Bull., Vol. 26 (3), pp. 352-356
- [50] Park, K.S., Kim, B.H. and Chang I.M. (2007). Inhibitory Potencies of Several Iridoids on Cyclooxygenase-1, Cyclooxygenase-2 Enzymes Activities, Tumor Necrosis facto-alpha and Nitrit Oxide Production In Vitro. eCAM, Vol.1, pp. 41-45
- [51] [www.caymanchem.com/pdfs/520111.pdf](http://www.caymanchem.com/pdfs/520111.pdf) (am 8.10.12 um 00:46Uhr) LTB4 ELISA KIT von Cayman
- [52] [www.caymanchem.com/pdfs/519031.pdf](http://www.caymanchem.com/pdfs/519031.pdf) (am 8.10.12 um 00:49Uhr) TXB2 ELISA KIT von Cayman
- [53] Luttmann, W., Bratke, K., Kupper, M., Myrtek, D. (2008) Der Experimentator Immunologie 3. Auflage, Spektrum Akademischer Verlag, S. 109 /110/115/119
- [54] Martina, M., Kilic, G., Cherubini, E. (1994) The Effect of Intrazellular Ca<sup>2+</sup> on GABA-activated Currents in Cerebellar Granule Cells in Culture. J. Membrane Biol., Vol. 142, pp. 209-216
- [55] Aulock, S., Hermann, C., Hartung, T. (2003) Determination of the eicosanoid response to inflammatory stimuli in whole blood and its pharmacological modulation ex vivo. Journal of Immunological Methods, Vol. 277, pp. 53-63
- [56] Maltzan K., Pruett, S.B. (2011) ELISA Essays and alcohol: increasing carbon chain length can interfere with detection of cytokines. Alcohol, Vol. 45, pp. 1-9

- [57] Issell, B.F., Gotay, C., Pagano, I., Franke, A. (2005) Quality of life measures in a phase I trial of noni. *Journal of Clinical Oncology*, 2005 ASCO Annual Meeting Proceedings. Vol. 23(16S), Part I of II, 8217.
- [58] Basar, S., Uhlenhut, K., Högger, P., Schöne, F., Westendorf, J. (2010) Analgesic and Antiinflammatory Activity of *Morinda citrifolia* L. (Noni) Fruit. *Phytotherapy Research*, Vol. 24, pp. 38-42
- [59] Su, C.X., Jensen, C.J., Wang, M.Y., Fritz, J.W., Jensen, S. (2001) A new selective COX-2 inhibitor: *Morinda citrifolia* (Noni). In *Proceedings of 7th International Conference of Eicosanoids and other Bioactive Lipids in Cancer, Inflammation and Related Diseases, Nashville, Tennessee, USA*.
- [60] Nagase, H., Kashiwagi, M. (2003) Aggrecanases and cartilage matrix degradation. *Arthritis Research & Therapy*, Vol. 5, pp. 94–103
- [61] Pawlus, A.D., Kinghorn, A.D. (2007) Review of the ethnobotany, chemistry, biological activity and safety of the botanical dietary supplement *Morinda citrifolia* (noni). *Journal of Pharmacy and Pharmacology*, Vol. 59, pp.1587-1609
- [62] Potterat, O., Hamburger, M. (2007) *Morinda citrifolia* (noni) Fruit – Phytochemistry, Pharmacology, Safty. *Planta Med*, Vol. 73, pp. 191-199
- [63] Farine, J.P., Legal, L., Moreteau, B., Le Quere, J.L. (1996) Volatile components of ripe fruits of *Morinda citrifolia* and their effects on *Drosophila*. *Phytochemistry*, Vol. 41(2), pp. 433-438
- [64] Deng, S., West, B.J., Palu, A.K., Jensen, C.J. (2010) Determination and Comparative Analysis of Major Iridoids in Different Parts and Cultivation Sources of *Morinda citrifolia*. *Phytochemical Analysis*, Vol.22, pp. 26-30
- [65] Paik, Y.S., Lee, C.M., Cho, M.H., Hahn, T.R. (2001) Physical Stability of the Blue Pigments Formed from Geniposide of Gardenia Fruits: Effects of pH, Temperature, and Light. *J. Agric. Food Chem.*, Vol. 49, pp. 430-432

[66] Kaithwas, G., Mukherjee, A., Chaurasia, A.K., Majumdar, D.K. (2011) Anti-inflammatory, analgesic and antipyretic activities of *Linum usitatissimum* L. (flaxseed/linseed) fixed oil. Indian Journal of Experimental Biology, Vol. 49, pp. 922-938

[67] Calder, P.C. (2006) Long-chain polyunsaturated fatty acids and inflammation. Scandinavian Journal of Food and Nutrition, Vol. 50(S2), pp. 54 -61

## **XI Lebenslauf**

Aus datenschutzrechtlichen Gründen entfernt.

## **XII Danksagung**

Als erstes gebührt meinem Doktorvater Hr. Prof. J. Westendorf mein Dank, dass ich meine Doktorarbeit am Institut für Pharmakologie und Toxikologie machen durfte.

Sehr herzlich bedanke ich mich für das in mich gesetzte Vertrauen sowie dafür an seinem Wissen teilhaben zu dürfen.

Ich bedanke mich bei meinen Eltern Corina und Samir Hamzeh, welche mich auf meinem Weg stets begleitet haben sowie durch finanziellen Rückhalt mir ermöglichten mich auf die Doktorarbeit zu konzentrieren und nicht weniger bei meiner Freundin Sheila-Marie Fedtke.

Meiner gesamten Arbeitsgruppe gebührt ein großer Dank, denn die Zeit, die ich dort im Labor verbracht habe, wäre ohne dieses Team nur halb so schön gewesen.

Für Rat und Tat und die familiäre Atmosphäre bin ich sehr dankbar und möchte mich an dieser Stelle bei Sabine Schröder, Dr. Simla Basar und Klaus Söhren ganz herzlich bedanken.

Bei Dr. Simla Basar möchte ich mich nochmals separat für die isolierten Iridoide bedanken, welche ich durch ihre Arbeit zu Verfügung gestellt bekommen habe.

Bei dieser Gelegenheit möchte ich nicht versäumen, meinen besonderen Dank an Pascal Holey und Ginnie Bekoe auszurichten.

Vielen Dank!

### **XIII Eidesstattliche Versicherung**

Ich versichere ausdrücklich, dass ich die Arbeit selbständig und ohne fremde Hilfe verfasst, andere als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel nicht benutzt und die aus den benutzten Werken wörtlich oder inhaltlich entnommenen Stellen einzeln nach Ausgabe (Auflage und Jahr des Erscheinens), Band und Seite des benutzten Werkes kenntlich gemacht habe.

Ferner versichere ich, dass ich die Dissertation bisher nicht einem Fachvertreter an einer anderen Hochschule zur Überprüfung vorgelegt oder mich anderweitig um Zulassung zur Promotion beworben habe.

Ich erkläre mich einverstanden, dass meine Dissertation vom Dekanat der Medizinischen Fakultät mit einer gängigen Software zur Erkennung von Plagiaten überprüft werden kann.

Unterschrift: .....