

Aus dem Universitätsklinikum Münster

Zentrale Tierexperimentelle Abteilung

-Direktor: Dr. med.vet. M.Lücke-

Begleitende Hochdosisbehandlung mit
Echinacea pallida Trockenextrakt bei der Radiotherapie eines
experimentell induzierten Sarkoms der immunkompetenten Ratte.

INAUGURAL-DISSERTATION

zur

Erlangung des doctor rerum medicinalium

der Medizinischen Fakultät

der Westfälischen Wilhelms-Universität Münster

vorgelegt von

Ruepp, Robin Vigilius

aus Köln

2007

Gedruckt mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät der
Westfälischen Wilhelms-Universität Münster

Dekan: Univ.-Prof. Dr. med. V. Arolt

1. Berichterstatter: Prof. Dr. U. Hacker-Klom

2. Berichterstatter: Univ. - Prof. Dr. N. Willich

Tag der mündlichen Prüfung: 16.4.2007

Aus dem Universitätsklinikum Münster
- Zentrale Tierexperimentelle Abteilung -
Direktor: Dr. med. vet. M. Lücke
Referent: Prof. Dr. rer. nat. U. Hacker-Klom,
Koreferent: Univ. - Prof. Fr. N. Willich

ZUSAMMENFASSUNG:

Begleitende Hochdosisbehandlung mit *Echinacea pallida* Trockenextrakt bei der Radiotherapie eines experimentell induzierten Sarkoms der immunkompetenten Ratte.

Robin V. Ruepp
Tag der mündlichen Prüfung: 16.04.07

Einleitung: In der vorliegenden Studie wurde *in vitro* sowie *in vivo* die Wirkung eines hochdosierten standardisierten Trockenextraktes aus *Echinacea pallida* Wurzeln auf die Bildung von Tumoren der Ratte nach subkutaner Injektion von Walker-256-Sarkomzellen in Verbindung mit Radiotherapie untersucht.

Material und Methoden: *In vitro* wurde der Effekt von Bestrahlung und EPT an isolierten Walker-Sarkomzellen untersucht. Die darauf folgende *in vivo* Studie (genehmigter Tierversuchsantrag G4/99) gliederte sich in vier Arme mit jeweils 9 Tieren: unbehandelte Kontrolle, Strahlentherapie, *Echinacea pallida* Trockenextrakt (EPT) und die Kombination aus Bestrahlung und EPT. Erfasst wurden hierbei als Endpunkte das Tumorgewicht zum Zeitpunkt der Sektion, das Körpergewicht, klinisch-chemische sowie immunologische Parameter (Leukozyten und deren Differenzierung) und die Histologie des Tumors.

Ergebnisse: Die *in vitro* Bestrahlungsversuche zeigten eine deutliche Strahlenempfindlichkeit der Zellen, während die Kultivierung mit EPT in verschiedenen Dosierungen keine messbaren direkten zytostatischen Effekte zeigte. *In vivo* zeigte sich, dass die Anzahl der bei Sektion gefundenen Tumoren in den allein mit EPT behandelten Tieren deutlich niedriger war. Des Weiteren konnte gezeigt werden, dass es in den EPT-Gruppen zu einer signifikanten Stimulation der Natürlichen Killer- (NK-) Zellen kam. In Verbindung damit zeigten die Tiere der Gruppen, welche EPT erhielten, deutlich weniger klinische und immunologische Auffälligkeiten, besonders im Vergleich zu der Gruppe der bestrahlten Tiere. Insgesamt führte die adjuvante wie die alleinige Gabe von EPT bei den tumortragenden Tieren zu einer Verbesserung des Allgemeinzustandes, insbesondere zu einer Unterdrückung der tumorassoziierten Kachexie und Verbesserung der Immunlage. In der vorliegenden Arbeit wurden diese Effekte eines hochdosierten *Echinacea pallida* Wurzelextraktes erstmalig im Zusammenhang mit einem syngenen Tumor an einer immunkompetenten Ratte untersucht.

Diskussion: Die Ergebnisse bestätigen zum einen die bisherigen Daten zur Immunstimulation durch *Echinacea pallida*, zum anderen konnten Effekte gezeigt werden, welche zuvor eher unbekannt waren und in Verbindung mit einem immunogenen Tumor bei der Ratte auf eine bessere Prognose hinweisen.

INHALTSVERZEICHNIS

Abkürzungsverzeichnis.....	7
1 Einleitung.....	8
1.1 Stand der Forschung: Immuntherapie.....	9
1.2 Stand der Forschung: Echinacea Extrakte	12
1.2.1 Historie	12
1.2.2 Systematik und botanische Betrachtung	16
1.2.3 Inhaltsstoffe von <i>Echinaceae pallidae radix</i>	19
1.2.4 Pharmakologie	24
1.3 Mechanismen der Tumorabwehr.....	29
1.3.1 Reaktionen des Immunsystems.....	29
1.3.2 Immunantwort auf Tumorzellen.....	33
1.3.3 Immunologischer „Escape“	38
1.3.4 Rolle des Lymphatischen Systems	40
1.4 Ziele der Arbeit.....	44
2 Material und Methoden	45
2.1 Echinacea pallida Trockenextrakt (EPT).....	45
2.1.1 Spezifikation der Droge	45
2.1.2. Eingesetzter Extrakt.....	46
2.1.3 Methoden zur Charakterisierung des Extraktes.....	47
2.2 Tierspezies	51
2.3 In vitro-Versuche.....	53
2.3.1 Walker Sarkom.....	53
2.3.2 Aufzucht der Walker 256 Sarkomzellen.....	54
2.3.3 Bestrahlung der Zellkulturen.....	55
2.3.4 Messung von Zellzahl, Zellzyklus	55
2.3.5 Bestimmung von Mikrokernen	55
2.3.6 Klonogenitäts-Assay.....	56
2.3.7 Apoptose-Assay.....	58
2.4 In vivo – Versuche	58
2.4.1 Spezies und Haltungsbedingungen.....	59
2.4.2 Formulierung der Prüfsubstanzen.....	60
2.4.3 Experimentelles Design: Behandlungsgruppen und Applikation.....	60
2.4.4 Klinische Untersuchungen.....	61
2.4.5 Blutanalytik	61
2.4.6 Histologie	66
2.4.7 Sektion mit makroskopischer Befunderhebung.....	66
2.4.8 Statistik.....	67
3 Ergebnisse.....	69
3.1 Charakterisierung des Extraktes.....	69
3.2 Ergebnisse der in vitro- Untersuchungen:	73
3.2.1 Apoptose.....	73
3.2.2 Mikrokernbildung	77
3.2.3 Strahlenempfindlichkeit der W256 - Zellen.....	81
3.2.4 Klonogenität.....	83

3.3 Ergebnisse der <i>in vivo</i> -Untersuchungen.....	85
3.3.1 Klinische Beobachtungen.....	85
3.3.2 Makromorphologische Befunderhebung	87
3.3.3 Mikromorphologische / histologische Befunde.....	91
3.3.4 Hämatologie und klinisch- chemische Daten.....	94
3.3.5 Immunologie.....	103
3.3.6 Zusammenfassung der Ergebnisse der <i>in vivo</i> Versuche	107
4. Diskussion.....	109
4.1 Bisherige Erfahrungen mit Echinacea Extrakten.....	109
4.1.1 Präklinik.....	109
4.1.2 Klinik.....	115
4.2 Diskussion der Ergebnisse	121
4.2.1 Diskussion der <i>in vitro</i> Ergebnisse.....	121
4.2.2 Diskussion der <i>in vivo</i> Ergebnisse	122
5 Wertung und Schlussfolgerungen	126
6 Literatur.....	127

Abkürzungsverzeichnis

BCG	Bacillus Calmette-Guerin
DAB	Deutsches Arzneibuch
DAPI	4, 6-Diamidino-2-phenylindol
EPT	Echinacea-Pallida-Trockenextrakt
EUAB	Europäisches Arzneibuch
FCS	Fetal Calf Serum
GALT	Gut Associated Lymphatic Tissue
G-CSF	Granulocyte Colony Stimulating Factor
GMCSF	Granulocyte-Makrophage Colony Stimulating Factor
IGF α / β	Insulin-like Growth-Factor
IGM	Immunglobulin M
MALT	Mucosa Associated Lymphatic Tissue
MEM	Minimum Essential Medium
MHC	Main Histocompatibility Complex (Haupthistokompatibilitäts-Komplex)
NK-Zellen	Natürliche Killer - Zellen
PALS	Periarterielle lymphatische Scheide (Milz)
TNF α	Tumor-Nekrosefaktor alpha

1 Einleitung

Die gegenwärtige Vorgehensweise in der Therapie von malignen Tumoren begründet sich traditionell auf den drei Therapiekonzepten von "Stahl", "Strahl" und "Chemie", also chirurgische Entfernung des malignen Gewebes, Radiotherapie und Chemotherapie. Wirklich durchgreifende Erfolge der letzten beiden Therapiekonzepte sind hier jedoch nur im Bereich der Leukämien und einiger solider Tumorentitäten zu verzeichnen. Obwohl bekannt ist, dass sich Tumorzellen von Ihrer Beschaffenheit her meist deutlich von gesunden Zellen unterscheiden und demnach vom Immunsystem erkannt werden können, reicht die „normale“ körpereigene Immunabwehr nicht immer aus, um die Bildung von Tumoren und deren weiteres unkontrolliertes Wachstum zu verhindern.

Ein großes Problem stellt zudem die Kontrolle der Nebenwirkungen dar, sowohl der strahlen - als auch der chemotherapiebedingten. Die häufigsten Nebenwirkungen sind Leukozytopenie, Granulozyto - und Lymphozytopenie, wobei es meist zu einer völligen Verschiebung der physiologischen Immunlage kommt. Gerade ein intaktes Immunsystem ist aber von großer Bedeutung für die Abwehr von neoplastisch veränderten Zellen, sofern diese vom Immunsystem erkannt werden können. Auch unter der Therapie selber auftretende Infektionen in Folge der Immunsuppression stellen einen großen Risikofaktor dar, der bei manchen Patienten zu lebensbedrohenden Krisen führt. Einen Ansatz bietet hier die Immuntherapie, bei der additiv zur Basistherapie Substanzen verabreicht werden, die eine Verbesserung der Immunlage zum Ziel haben. Hierbei muss man eine deutliche Unterscheidung machen zwischen den Stoffen, die eine spezifische Stimulation einer immunologischen Zellspezies bewirken, und den Substanzen,

die das Immunsystem eher unspezifisch auf mehr oder weniger allen Ebenen stimulieren. Zu diesen unspezifischen Stimulanzen gehören unter anderem Echinacea-Extrakte, die seit langem in der Vorbeugung und Therapie von Erkältungskrankheiten verwendet werden [1]. Die vorliegende Arbeit beschreibt in Verbindung mit der aktuellen Literatur und eigenen experimentellen Studien die Effekte eines solchen Extraktes auf einen syngenen Tumor der Ratte, welcher in der vorliegenden Arbeit simultan radiologisch behandelt wird.

1.1 Stand der Forschung: Immuntherapie

Zu der oben erwähnten Klasse der spezifischen Stimulanzen gehören z.B. die Interferone, Interleukine und koloniestimulierende Substanzen wie Granulozyten-Makrophagen-Kolonie-stimulierende (GM-CSF) -Faktoren. Durch Ihre Gabe wird meist eine überschießende Immunreaktion provoziert, was sich auch in den Nebenwirkungen (z.B. Fieber) äußert. Es kommt nach ihrer Applikation zu einer vermehrten Freisetzung bzw. erhöhten Proliferationsrate von Leukozyten-Subsets, u.a. einer beschleunigten Differenzierung von hämatopoetischen Stammzellen zu dendritischen Zellen sowie einer Induktion der Chemotaxis von Lymphozyten in Tumornähe. Die klinische Wirksamkeit und Unbedenklichkeit der Wachstumsfaktoren wie G-CSF und GM-CSF ist jedoch weiterhin nicht ausreichend gesichert und bedarf noch weiterer Forschungstätigkeit. Surrogat-Marker wie z.B. die Dauer einer Neutropenie verändern sich zwar messbar, dies scheint jedoch keine Auswirkung auf das klinische Gesamtergebnis und die Prognose zu haben [2]. Zu den unspezifischen Stimulanzen gehören hauptsächlich Naturstoffgemische wie etwa BCG (Bacillus Calmette- Guerin) , Lyophilisate aus

tierischem Nabelschnurblut, Thymuspeptide, Extrakte aus *Viscum* (Mistel) oder *Echinacea species*. Die Wirkung liegt hierbei in der unspezifischen Induktion der immunkompetenten Zellen durch Antigenstrukturen eines Erregers (BCG) sowie der Induktion der Phagozytose bei Makrophagen und zytotoxischen T-Zellen begründet.

Zu einer induzierten Proliferation kommt es hier jedoch nicht. Vielmehr ist es bei oraler Verabreichung das darmassoziierte Immunsystem (Mucosa Associated Lymphatic Tissue, MALT bzw. Gut Associated Lymphatic Tissue, GALT) welches durch die Agenzien stimuliert wird. Die Peyer'schen Plaques spielen in dem Zusammenhang eine wesentliche Rolle, da hier dem Immunsystem die neuen Antigen - bzw. Haptenstrukturen präsentiert werden.

In der Therapie haben sich jedoch eher die spezifisch wirkenden Substanzen etabliert, bei denen der Wirkmechanismus fast bis auf molekularer Ebene nachvollziehbar ist. Die unspezifischen Stimulanzen werden zögerlicher eingesetzt, da zum einen aufgrund der molekularen Strukturevielfalt ein eindeutiger Wirkmechanismus schwerer nachzuvollziehen ist, zum anderen möglicherweise unbekannte Neben- und Wechselwirkungen dieser Vielstoffgemische den Therapeuten verunsichern. Ein weiterer Punkt dürfte auch die "Positionierung" solcher Produkte sein, da diese eher mit alternativen Heilmethoden und der Selbstmedikation in Verbindung gebracht werden. Die neueren Literaturdaten zeigen allerdings, dass es sehr wohl Wirksamkeitsnachweise im Tierversuch und in kontrollierten klinischen Studien gibt. Da bereits Studien über die hämatologischen und immunologischen Effekte von EPT an gesunden Ratten [3] sowie umfangreiche *in vitro*- Untersuchungen

vorliegen, die u.a. die Zytokin-Induktion an Lymphozyten [4] belegen, liegt es nahe, *in vivo* eine derartige Kombination an einem Tumormodell zu testen. Dafür bietet sich das Walker-Sarkom 256 (W256) an, da hierüber Protokolle von Naturstoff-Screenings mit ähnlicher Fragestellung vorliegen [5], [6]. Zur Vorbereitung der *in vivo* -Studie waren auch *in vitro*- Untersuchungen nötig, in denen zum einen die Strahlenempfindlichkeit der W256 -Zellen und zum anderen die direkte Wirkung von EPT auf die Tumorzellen ermittelt wurden. Unter dem Aspekt der Immunstimulation gibt es nur wenig Daten über ein eindeutiges molekulares Wirkprinzip, da mit der Wirkung eine Vielzahl von Stoffen und damit eine Vielzahl von biochemischen Targets verbunden sind [1]. Die Wahl von *Echinacea pallida* für dieses Projekt liegt in der in vorangegangenen Tierstudien gefundenen ausgeprägteren Immunstimulation gegenüber anderen Arten der Gattung *Echinacea* begründet. Es kann aufgrund der oben beschriebenen Eigenschaften von EPT von einem möglichen Effekt im Sinne eines "Biological Response Modifiers" ausgegangen werden, der mit den Wirkungen bisher eingesetzter Immuntherapeutika vergleichbar ist. Im vorliegenden Projekt wurde nun geprüft, inwiefern diese in einzelnen Studien beschriebenen Effekte in einem Tierversuch valide Ergebnisse liefern können. Insbesondere fehlen für die Aussage einer adjuvanten Wirksamkeit von EPT bei den derzeitigen Therapiestrategien für Tumoren zur Zeit exakte, statistisch signifikante Angaben. Aus dem klinischen Bereich sind lediglich Einzelfallbeschreibungen von Patienten bekannt, die sowohl mit unterschiedlichen Zubereitungen von *Echinacea* als auch unterschiedlichen therapeutischen Strategien bei unterschiedlichen Tumorentitäten behandelt wurden [7] [8]. Sollten sich die oben beschriebenen Hinweise im vorliegenden

Tiermodell bestätigen, so könnten anschließend kontrollierte klinische Studien an Patienten ins Auge gefasst werden.

1.2 Stand der Forschung: Echinacea Extrakte

1.2.1 Historie

Der Name Echinacea leitet sich aus dem griechischen echinos = Igel ab und beschreibt den stachelig aussehenden Blütenkopf [9].

Die Pflanze Echinacea stammt aus Nordamerika. Ihre Wurzel wurde im südlichen Nebraska bei archäologischen Untersuchungen in einem Siedlungsgebiet gefunden, das von 1772 bis 1810 von einem Stamm der Pawnee-Indianer bewohnt wurde [10]. Die Pflanzenwurzel wurde von den Indianern gekaut, oder die Frischpflanzen wurden zu Brei bzw. Saft zerstoßen. Bemerkenswerterweise unterschieden die Omaha-Indianer zwischen einer weiblichen und einer männlichen Pflanze, von denen die weibliche als die wertvollere galt. Der Beschreibung zufolge handelte es sich bei der „weiblichen“ Pflanze um *Echinacea angustifolia* [11], während die Beschreibung der „männlichen“ Pflanze auf *Echinacea pallida* zutrifft. *Echinacea angustifolia* wurde zwar am häufigsten für medizinische Zwecke eingesetzt, doch auch *Echinacea pallida* und *purpurea* waren als Droge im Gebrauch. Die Anwendungsbereiche waren zahlreich und reichten von der rein topischen Anwendung bei Wunden, Verbrennungen, Lymphdrüenschwellungen (Mumps) und Insektenstichen über das Kauen der Wurzel bei Zahn- und Halsschmerzen bis hin zur innerlichen Anwendung bei Kopfschmerzen, Magenkrämpfen, Husten, Erkältung, Masern und Gonorrhö. Häufig wurde Echinacea als Antidot bei Bissen von Klapperschlangen und

anderen Vergiftungsfällen eingesetzt. Es liegen sogar Berichte über eine "Rauch-Therapie" vor, in der Echinacea offensichtlich als Inhalat gegen Kopfschmerzen verwandt wurde [12].

Erste Berichte von der Verwendung der Echinacea-Pflanze durch weiße Siedler Nordamerikas sind bei GRONOVIVS [13] zu finden. Zu Zeiten des Bürgerkrieges von 1777-1784 wurde *Echinacea angustifolia* vor allem gegen Schlangenbisse, Insektenstiche und als Antiseptikum verabreicht [14].

Für eine breitere medizinische Anwendung des Wurzelextraktes *Echinacea angustifolia* sorgte ein deutscher Mediziner, der "Meyers Blutreiniger" (s.Abb. 1) als Wundermittel auf den Markt brachte. Dieses Mittel sollte bei Rheumatismus, Neuralgien, Kopfschmerzen, Rotlauf, Dyspepsie, alten Geschwülsten und Geschwüren, offenen Wunden, Schwindel, schlimmen Augen und bei Vergiftungen durch Kräuter und bei Bissen von Klapperschlangen helfen, wie das Etikett (Abb. 8) anschaulich belegt [15].

In den nachfolgenden Jahren mehrten sich die Publikationen und Berichte über "Echinacea angustifolia", die therapeutische Erfolge bei Diphtherie- und Typhusfällen, aber auch bei cerebrospinaler Meningitis, Kindbettfieber, bei Gonorrhö, Ekzemen, Erysipelen, Vaginitis, Syphilis, Typhus, chronischer Laryngitis und Erkrankungen der Haut und Schleimhaut zum Inhalt hatten [1]. 1911 wurde die erste umfassende pharmakognostische Abhandlung zu Echinacea angustifolia veröffentlicht. Von 1916 bis 1950 wurde Echinacea angustifolia wie auch *Echinacea pallida* im National Formulary der Vereinigten Staaten geführt [1].

In Europa wurde Echinacea als Heilpflanze erstmals 1898 erwähnt, und kurze Zeit später folgten klinische Erfahrungsberichte. 1906 wurde die Arzneimittelprüfung von *Echinacea angustifolia* publiziert, und 1924 wurde Echinacea in Dr. Wilmar Schwabes Homöopathisches Arzneibuch aufgenommen.

Meyer's

BLOOD PURIFIER.

← DIRECTIONS. →

Take one ounce three times every day in the following cases: — *Rheumatism, Sick-Headache, Erysipelas, Dyspepsia, old Sores and Bites, open Wounds, Dizziness, Scrofula and Sore Eyes.*

In cases of *Poisoning by Herbs, &c.*, take the double dosis, and *Bites of Rattlesnakes* take three ounces three times a day, until the swelling is gone. This is an absolute cure within 24 hours.

Children under 10 years of age half an ounce three times a day.

← Meyer's ←

Blut-Reiniger.

← Gebrauchsanweisung. →

Man nehme dreimal täglich eine Unze in folgenden Fällen: *Rheumatismus, Neuralgie, krankhafte Kopf-schmerzen, Kopfschmerz, Dyspepsie, alle Geschwülste und Geschwüre, offene Wunden, Schindeln, Skropheln und blutige Augen.*

Bei Vergiftungen durch Kräuter &c. nehme man die doppelte Dosis. — Bei Bissen von Klapperschlangen ist die dreifache Dosis zu nehmen, und wird innerhalb 24 Stunden die Kur unbedingt bemerkbar.

Kinder unter 10 Jahren erhalten die Hälfte.

Price \$ 1.25 per bottle.

— Prepared by —

H. C. F. MEYER,
2255 Jackson Street, St. Louis, Mo.

Abb. 1: Etikett von Meyer's Blood Purifier um 1880 (Quelle: [15])

Positive Erfahrungsberichte aus dem Bereich der Gynäkologie, vom Einsatz bei septischen Prozessen und Verbrennungen, Akne vulgaris und Furunkulosen folgten. Mitte der 30er Jahre kam es aufgrund der starken Nachfrage zu einem Engpass in der Herstellung des Frischpflanzenextraktes, woraufhin z.B. die Firma Madaus Samen aus Amerika anforderte [1]. Die gelieferten Pflanzen erwiesen sich allerdings als *Echinacea purpurea*-Samen, die dennoch in Europa in Kultur genommen wurden. Durch diese Verwechslung rückte *Echinacea purpurea* als die zentrale Heilpflanze in den Vordergrund und *Echinacea angustifolia* verlor in Europa als Droge an Bedeutung.

1.2.2 Systematik und botanische Betrachtung

Echinacea pallida gehört der Familie der Asteraceae (vorherige Bezeichnung: Compositae – Korbblütler) an. Der Artstatus von *Echinacea pallida* wurde in der Vergangenheit teilweise nicht beachtet, da eine eindeutige Abgrenzung gegen *E. angustifolia* aufgrund ähnlicher Merkmalsdifferenzierung nicht gegeben schien. Als artspezifische Merkmale sind neben der Chromosomenzahl $2n = 44$ die größere Wuchshöhe, die weiße Farbe der Pollenkörner, die Länge der Zungenblüten sowie das Auftreten von Ölgängen im Mark und in der Rinde des Stängels zu nennen. Auch in chronologischer Hinsicht weist das Areal von *Echinacea pallida* einen eigenen Charakter auf. Bei *E. pallida* (s. Abb. 2) handelt es sich jedoch nicht um eine tetraploide *E. angustifolia* [16].

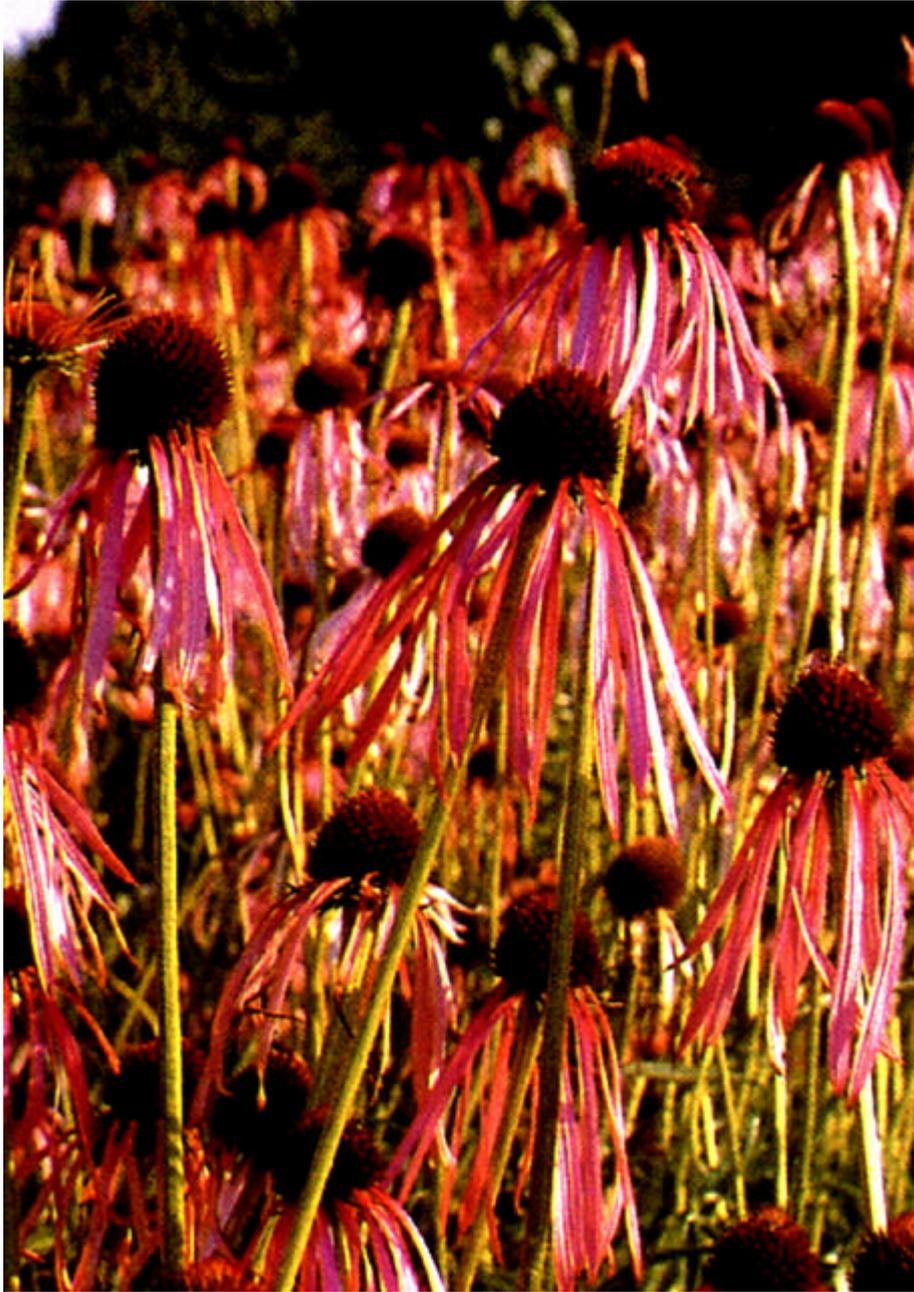


Abb. 2: Blühende *Echinacea pallida* (Quelle: [1])

Die Botanische Beschreibung lautet wie folgt:

Mehrjährige Pflanze, 40 bis 120 cm hoch; Stängel einfach, meist unverzweigt, unten zerstreut, oben dichter behaart; Blätter länglich-lanzettlich bis länglich-elliptisch, ganzrandig, dunkelgrün, an beiden Seiten rauhaarig, dreinervig; Grundblätter 10 bis 35 cm lang, 1 bis 4 cm breit, spitz, unten kurz gestielt, oben sitzend; Hüllblätter lanzettlich bis schmal länglich, 8 bis 17 mm lang, 2 bis 4 mm breit, rauhaarig, am Rand gewimpert, in 3 bis 4 Reihen, allmählich in die stachelförmigen Spreublätter übergehend; Zungenblüten zurückgebogen, 4 bis 9 cm lang, 5 bis 8 mm breit, purpurn, rosa oder weiß; Spreublätter 10 bis 13 mm lang, Spreite 8 bis 10 mm lang, Granne 2,5 bis 3,5 mm lang; Röhrenblüten 8 bis 10 mm lang, Kronblattzipfel 2 bis 3 mm lang; Achänen 3,7 bis 5 mm lang, kahl, Pappus als gezähntes Krönchen erhalten; Zähne annähernd gleichförmig, die längsten 1 mm; Pollenkörner weiß, 24 bis 28 µm im Durchmesser [16].

Die Droge stammt häufig aus Wildvorkommen in Nordamerika. *Echinacea pallida* wird in kleinen Mengen in Europa (Deutschland, Italien, ehemaliges Jugoslawien, Niederlande, Schweiz) und den USA kultiviert [1]

1.2.3 Inhaltsstoffe von *Echinaceae pallidae radix*

Ätherisches Öl

Die *Echinacea pallida* Wurzel enthält 0,2 bis über 2,0% Ätherisches Öl.

Hauptverbindungen sind Pentadeca-8Z-en-2-on und Pentadecan (s. auch *Radix Echinacea angustifolia*). Daneben kommen Pentadeca-8Z,11Z-dien-2on, Pentadeca-8Z,13-dien-11-in-2-on, und Tetradeca 8Z-en-11,13-diin-2-on vor, sowie das aus *Echinacea angustifolia / pallida* Wurzeln isolierte (E)-10-Hydroxy-4,10-dimethyl-4,11-dodeca-dien-2-on ("Echinolon") [1].

Polyacetylene

Vermutlich sind etwa 2 % Polyacetylene in *E.pallida* (berechnet auf luftgetrocknetes Material) mit Trideca-1-en-3,5,7,9,11-pentain und Ponticaepoxid als Hauptverbindungen enthalten. Stoffe aus dieser Verbindungsklasse sind jedoch sehr instabil. Außerdem wurden Pentadeca-8Z,11E,13Z-trien-2on, Pentadeca-8Z,11Z-dien-2-on, Pentadeca-8Z-en-2-on und Heptadeca-8Z,11Z-dien-2-on gefunden [1]. Die Strukturformeln hierzu sind Abb.3 zu entnehmen.

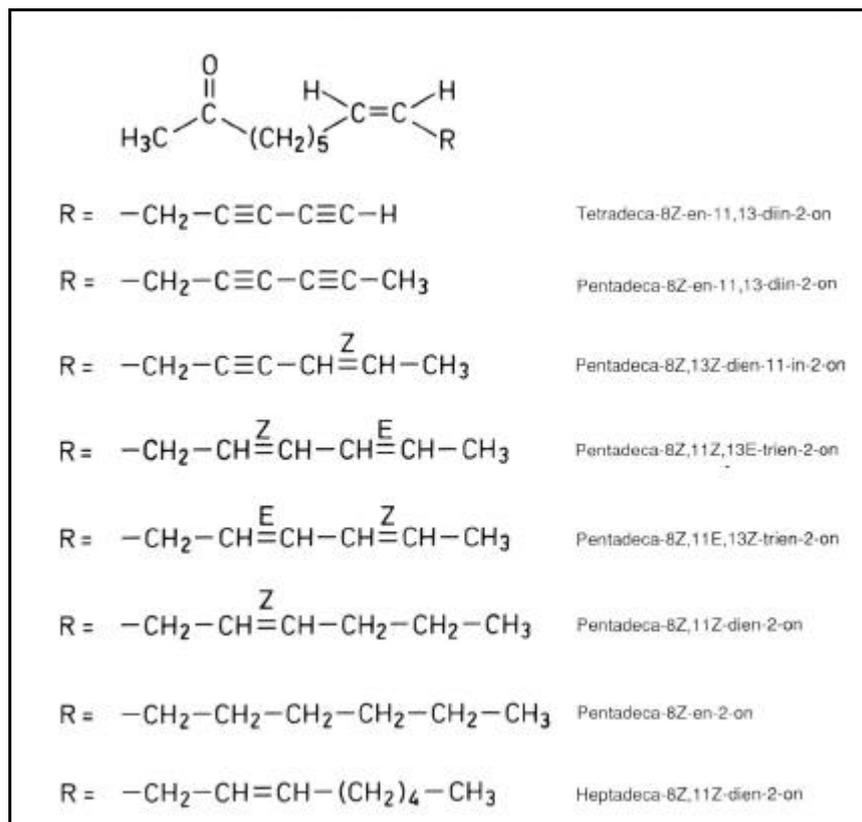


Abb.3: Polyacetylene (Quelle: [1])

Kaffeesäurederivate

Echinacosid ist zu ca. 1% in den Wurzeln vertreten. In geringer Menge findet sich 6-O-Caffeoyl-echinacosid [16] (siehe Abb.4).

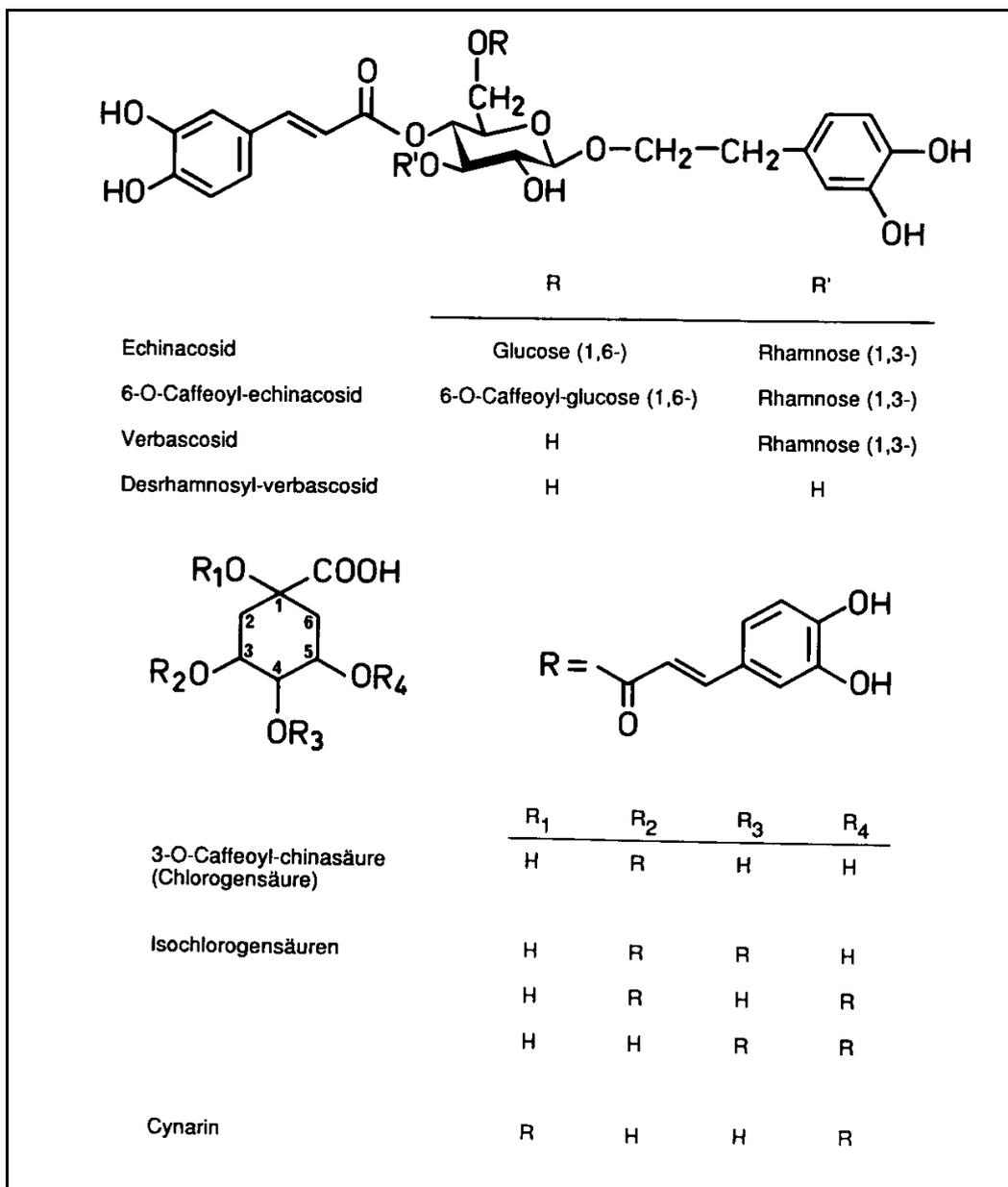


Abb. 4: Echinacosid und verwandte Verbindungen in *E. pallida* (Quelle: [1])

Alkylamide

Diese Klasse von Verbindungen tritt im Pflanzenreich relativ selten auf. Neben den Asteraceen kommen sie nur noch die Familien der Piperaceen, Aristolochiaceen und Rutaceen vor. Eine aus Echinacea-Arten isolierte Verbindung ist u.a. das Echinacein [1], (Dodeca-2E,6Z,8E,10E-tetraensäure isobutylamid) welches auf der Zunge einen lokalanästhesierenden Effekt hervorruft. Dieser Effekt ist als leichtes Kribbeln auf der Zunge wahrnehmbar, wenn Echinacea-Wurzeln oder Echinacea-Extrakte gekaut werden. Insgesamt wurden bisher etwa 15 Verbindungen dieses Typs in *Echinacea angustifolia* / *E. pallida* nachgewiesen.

Polysaccharide

Als eine der ersten Verbindungen wurde bereits 1914 Inulin als Baustein von Polysacchariden in Echinacea-Arten gefunden. Nach neueren Untersuchungen handelt es sich vermutlich um saure Mucopolysaccharide aus der Primärzellwand (s. Abb. 5). Weitere Polysaccharide konnten aus Gewebekulturen isoliert werden.

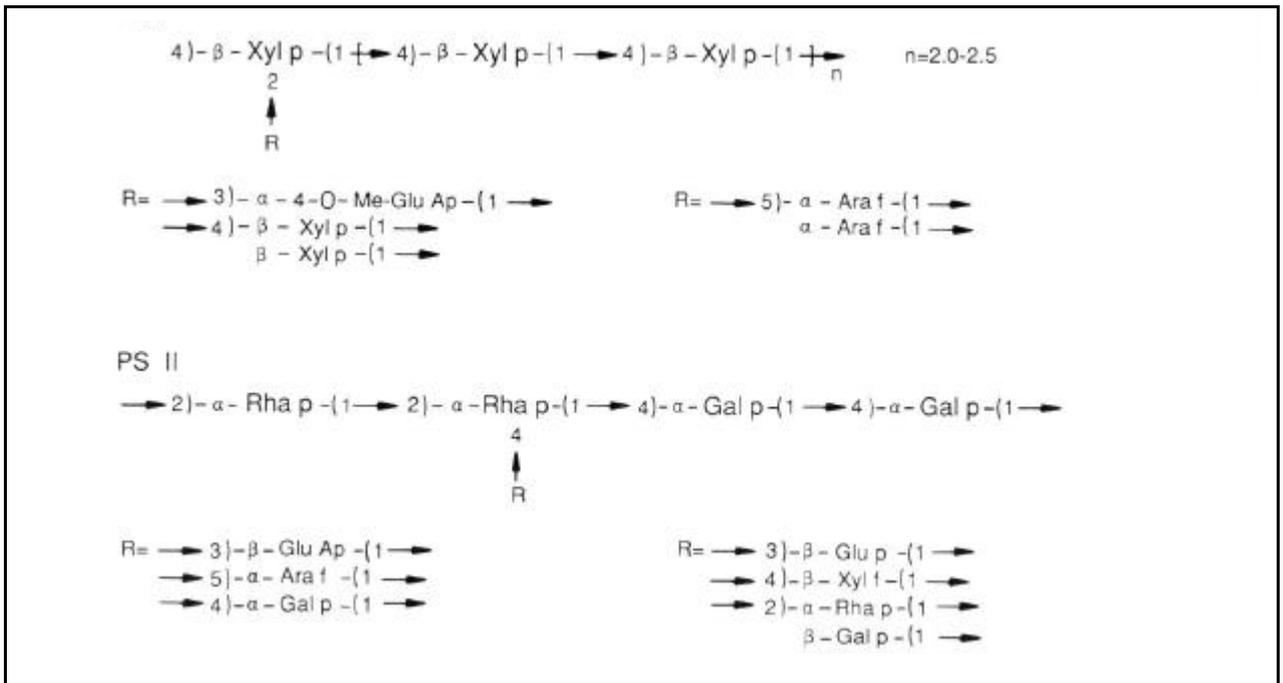


Abb.5: Übersicht über die Polysaccharide in Echinacea species (Quelle: [1])

1.2.4 Pharmakologie

Seit langem ist die Wirksamkeit von Echinacea-Extrakten bei der Behandlung von grippalen Infekten sowie von Infekten des Respirationstraktes bekannt, worunter u.a. Infektionen mit Influenza-, Para-Influenza-, sowie Rhino- und ECHO-Viren fallen [1]. Extrakte aus Pflanzen der Gattung Echinacea werden mittlerweile auch als zugelassene Arzneimittel bei den Indikationen “zur unterstützenden Behandlung bei grippalen Infekten” sowie bei “Infektionen des Respirationstraktes” angewendet (s. Fachinformationen zu aar vir® oder Echinacin®). Darüber hinaus gibt es jedoch deutliche Hinweise aus der neueren Literatur sowie aus vorhergegangenen Studien an Mensch [7] und Tier [3], [17] dass das therapeutische Feld viel weiter ausgedehnt werden kann. Aufgrund der immunmodulatorischen Wirkung von Echinacea-Extrakten auf die T-Lymphozyten-Subpopulationen [18], darunter vermutlich auch die der TILS (Tumor-infiltrierende Lymphozyten) und NK-Zellen [19] [20], könnte auch von einem immunologischen tumorinhibierenden Effekt ausgegangen werden.

Ein weiterer Effekt von Echinacea-Extrakten ist die Freisetzung von Radikalfängern (lipidlöslichen Vitaminen) aus internen Reserven des Organismus, was zusätzlich auf radioprotektive Eigenschaften hinweist [21].

Im Folgenden sind die wichtigsten experimentell bestätigte Wirkungen von Echinacea – Zubereitungen aufgeführt:

Phagozytosestimulierende Wirkung

Der Ethanolextrakt (1:10) erhöht bei einer Konzentration von 10^{-2} % im Testansatz *in vitro* die Phagozytoserate menschlicher Granulozyten um 23% [22]. Ab einer Konzentration von 10^{-6} % war kein Effekt mehr nachweisbar. Der Trockenrückstand der Chloroformausschüttelung führt in einer Konzentration von 10^{-4} % zu einer Phagozytosestimulation um 39%, während die wasserlösliche Fraktion bei 10^{-3} % nur eine maximale Stimulierung um 14% ergibt. Die Wirkung konnte im Carbon-Clearance-Test an Mäusen auch *in vivo* bestätigt werden [1]. Nach 2tägiger Behandlung mit p.o. 3mal täglich 10 ml/kg KG einer Lösung von 0,5 mL des Ethanolextraktes im 30 ml isotonischer Kochsalzlösung wird die Eliminationsrate von Kohlepartikeln im Vergleich zu einer Kontrollgruppe um den Faktor 2,2 gesteigert. Die Chloroformausschüttelung erhöht in derselben Dosierung die Carbon-Clearance um den Faktor 2,6.

Mittels Durchflusszytometrie wurde an menschlichen Granulozyten *in vitro* die Phagozytose gelb-grün-fluoreszenzmarkierter Latexpartikel nach 30minütiger Vorinkubation mit unterschiedlichen Konzentrationen einer Urtinktur aus *Echinacea angustifolia* / *Echinacea pallida* untersucht. Dabei zeigte sich bei einer Konzentration von 10^{-4} % eine maximale Stimulierung um 29,5%. Eine

entsprechende Menge Alkohol hatte keine Wirkung. Aufgrund der ungeklärten Qualität des verwendeten Extraktes bedürfen die Ergebnisse der Überprüfung . In weiteren Studien wurde die qualitative und quantitative Stimulation von NK-Zellen *in vivo* beobachtet, ebenfalls gibt es Hinweise auf die Induktion von Zytokinen *in vitro* [23].

Wirkung auf Immunglobuline

Die p.o. Gabe von 0,1 ml Urtinktur aus *Echinacea angustifolia* (vermutlich *Echinacea pallida*) pro kg an Hühner führte am 5. Bis 9. Tag nach Verabreichung zu um bis zu 32% erhöhten IgG- (am 7. Tag) und IgA- (am 9. Tag) Spiegel. Der IgM-Wert war am 7. Tag im Vergleich zur Kontrolle, die nur die entsprechende Menge Alkohol erhielt, um 8% erhöht. Bei einer Dosis von 0,4 ml/kg KG wurde nur der IgA-Wert um ca. 28% gesteigert. Da die Identität und Qualität der verwendeten Urtinktur nicht gesichert ist, bedürfen die Ergebnisse der Überprüfung [16].

Antibakterielle Wirkung

Für Echinacosid wurde auch eine schwache Hemmwirkung gegenüber *Staphylococcus aureus* gemessen. Die Wirkung von 6,3 mg Echinacosid entsprach bei der eingesetzten 8×10^{-3} molaren Lösung ungefähr 10 Oxford-Einheiten Penicillin.

Für Trideca-1-en-3,5,7,9,11-pentain wurde eine bakteriostatische und fungistatische Wirkung beschrieben. Gegenüber *Escherichia coli* wurde eine totale Wachstumshemmung bei einer Konzentration von 50 µg/ml und gegenüber *Pseudomonas aeruginosa* bei 1.000 µg/ml gefunden. Für weitere Bakterien, sowie Hefen bzw. Pilze wurden ebenfalls Hemmeffekte festgestellt [16]

Antiödematöse Wirkung

Im Carrageenan-Rattenpfotenödem-Modell zeigt eine Polysaccharidfraktion aus *E.-angustifolia*-Wurzeln bei einer i.v. applizierten Dosis von 0,1 mg/kg KG eine 65%ige Hemmung des Ödems. [16]

Virustatische Wirkung

Ein wässriger Extrakt (1:10) aus Wurzeln von *Echinacea angustifolia* (*Echinacea pallida*?) zeigte im Plaquehemmtest mit Filterpapierscheiben bei einer aufgetragenen Menge von 0.02 ml gegen Herpes, Influenza-, Vaccinia- und Polio-Viren keine Wirkung. Für Echinacosid und Cichoriensäure wurde eine Hemmwirkung gegenüber VSV (Vesicular Stomatitis Virus) in L-929-Mäusezellen gefunden, wobei 125 µg/ml Cichoriensäure nach 4stündiger Inkubation die VSV-

Infektion um mehr als 50% reduzierten (im Vergleich dazu hatte Kaffeesäure denselben Effekt bei 62,5 µg/ml). Ein antiviraler Effekt nach Vorinkubation mit der Substanz konnte nicht beobachtet werden [16].

In einer weiteren Studie an Kaninchen konnte die kurative Wirkung von *Echinacea pallida* Trockenextrakt auf eine experimentell induzierte generalisierte Herpes-simplex- Virus (HSV) - Infektion gezeigt werden [17]. Unklar war, ob der beobachtete Effekt auf eine antivirale oder immunstimulierende Wirkung zurückzuführen war.

1.3 Mechanismen der Tumorabwehr

1.3.1 Reaktionen des Immunsystems

Bei einer Immunreaktion laufen grundsätzlich die im Folgenden und in Abb.6 beschriebenen Prozesse ab:

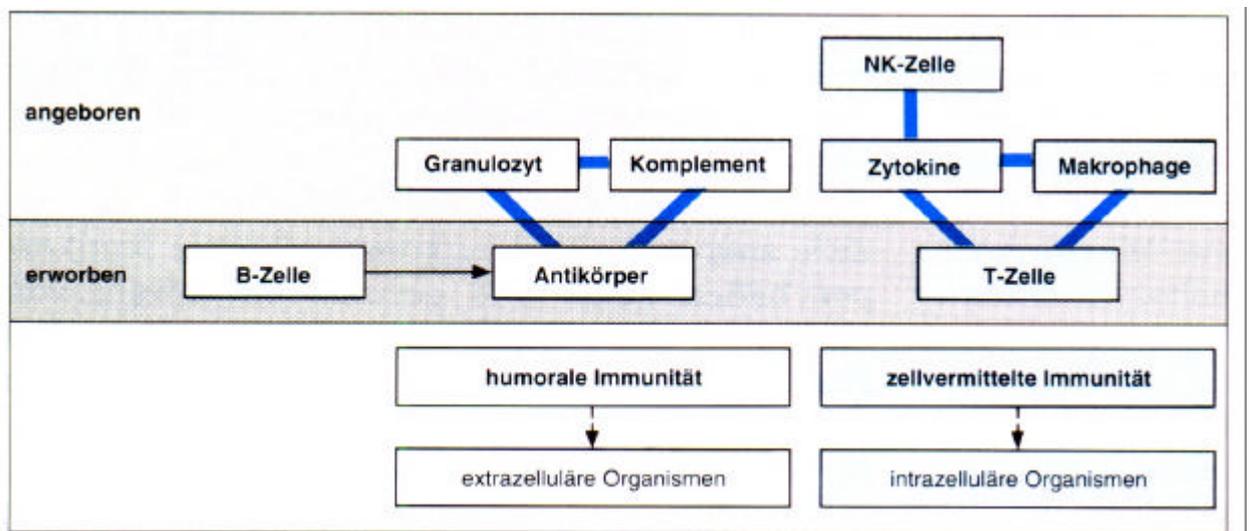


Abb.6 : Vereinfachtes Schema von B- und T-Zellen-vermittelter Immunität

(Quelle [24])

Der humorale Abwehrmechanismus (B-Zell-vermittelt)

Der Ablauf einer humoralen Immunantwort auf Erreger wie Bakterien oder auf frei zirkulierende Antigene stellt sich bei einem Antigenkontakt wie folgt dar:

Etwa 24 Stunden nach Eindringen des Antigens verschwinden die Antigenreaktiven Zellen aus dem zirkulierenden Lymphozyten-Pool. Einige Tage später, nach Proliferation dieser Zellen an der Eindringstelle, kann im Ductus thoracicus, der Hauptverbindungsstelle von Blutgefäß- und Lymphsystem, eine maximale Anzahl von aktivierten Zellen beobachtet werden. Dies ist darauf zurückzuführen, dass es nur eine begrenzte Anzahl antikörpertragender Lymphozyten gibt, die gerade für dieses Antigen spezifisch sind. Lymphozyten, deren Rezeptoren ein passendes Antigen gefunden haben, erhalten dadurch ein Aktivierungssignal und wandeln sich in antikörperbildende Plasmazellen um. Es wird anschließend ein Klon von Plasmazellen produziert, welche die gleichen Antikörper gegen dieses spezielle Antigen tragen und in großer Menge sezernieren. Die Antikörper stellen das nötige Signal zur Verfügung, um den Kontakt zwischen Phagozyt und Antikörper- „markiertem“ Antigen zu etablieren und die Phagozytose des Erregers u.a. vermittelt durch das Komplement-System auszulösen

Bei einem erneuten Antigenkontakt ist das Immunsystem nun fähig im Rahmen der Sekundärantwort sofort die Antikörper bereitzustellen - es hat sich ein lymphozytäres Gedächtnis gebildet - die „erworbene“ Immunität [24].

Der zelluläre Abwehrmechanismus:

Unabhängig von dem B-Zell- vermitteltem System hat sich in der Evolution ein System entwickelt, welches intrazelluläre Erreger wie Parasiten, intrazelluläre Bakterien und Viren abwehren kann. Hieran sind hauptsächlich die T-Zellen beteiligt. Am direktesten erfolgt dies durch zytotoxische T-Zellen, welche infizierte Zellen anhand ihrer veränderten Oberflächen-Marker erkennen und abtöten, bevor z.B. die Virusreplikation fertige Viren hervorbringen konnte. Die weiteren Subtypen der T-Zellen sind T-Helfer-Zellen, welche u.a. B-Zellen zur Sezernierung von Antikörpern aktivieren oder Makrophagen zum Infektionsherd dirigieren können, sowie T-Suppressor-Zellen, welche eine überschießende T-Zell-Immunantwort unterdrücken können. Die Aktivierung von T-Zellen erfolgt dabei nach geeignetem Antigenkontakt in Gegenwart des Haupt-Histokompatibilitätskomplex (MHC)

Eine schematische Übersicht der T-Zell- vermittelten Immunantwort ist Abb. 7 zu entnehmen.

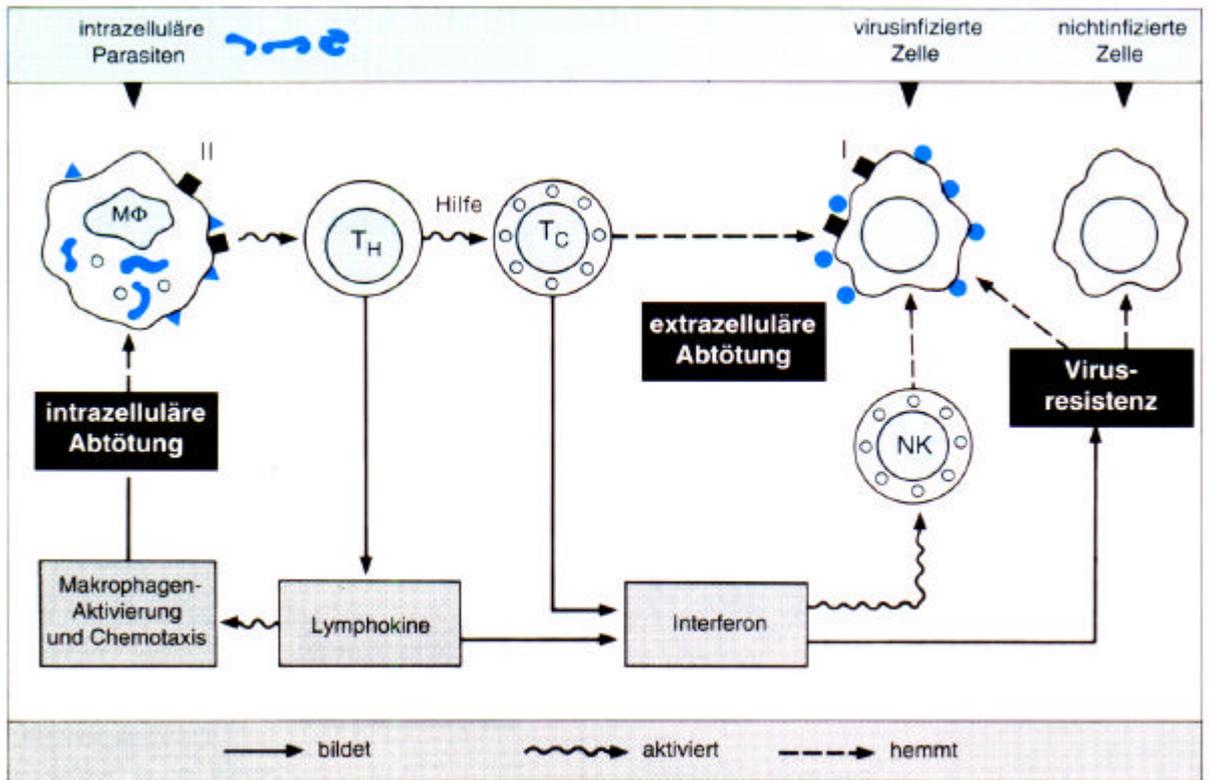


Abb. 7: Schematisch vereinfachte zelluläre, T-Zellen-vermittelte Immunreaktion auf intrazelluläre Erreger. Das virale Schema auf der rechten Seite entspricht weitestgehend auch den Reaktionen bei der Tumorerabwehr gegen virus- als auch nicht-virusinduzierten Tumoren. Quelle: [24]

1.3.2 Immunantwort auf Tumorzellen

Der wichtigste Schritt zur Tumorabwehr ist, dass entartete Zellen vom Immunsystem erkannt werden können [25]. Dies zeigt sich anhand der folgenden Beobachtungen an Patienten [24]:

- Postmortale Daten weisen darauf hin, dass es vermutlich mehr Tumoren gibt als klinisch in Erscheinung treten.
- Viele Tumoren enthalten lymphozytäre Infiltrate.
- Spontane Regressionen von Tumoren kommen vor.
- Tumoren treten mit häufiger Frequenz in der Kindheit und bei älteren Menschen auf, d.h. zu Zeiten, in denen das Immunsystem nicht „optimal“ arbeitet.

Daraus ist abzuleiten, dass sich maligne Zellen von nicht malignen Zellen aufgrund ihrer Antigenstruktur unterscheiden. Es findet sozusagen eine Unterscheidung von „eigen“ und „nicht-eigen“ bzw. „verändertem eigen“ statt. Bei Untersuchungen an Patienten [26] konnten die erkannten Antigene in zwei Gruppen eingeteilt werden:

- gemeinsame Antigene, die für einen bestimmten Tumortyp charakteristisch sind
- individuelle Antigene, die sich von einem Patienten zum anderen unterscheiden.

Als tumortyp-spezifische Antigene (siehe auch Tab.1) ließen sich u.a. die mutierten Proteinprodukte des ras-Onkogens und des p53-Tumorsuppressorgens identifizieren, die in Tumoren verschiedener Krebspatienten zu finden waren. Individuelle Antigene wurden in Einzelfällen ebenfalls beobachtet, hierbei handelt

es sich um sehr seltene Mutationen von Genabschnitten, die in Tumoren aktiv sind, wie z.B. des Melanotransferrins (p97) aus Melanozyten bzw. Melanomzellen.

Eine weitere Klasse von Tumorantigenen sind Genprodukte, die in Tumorzellen alleine oder exzessiver exprimiert werden als im Normalgewebe. Hierzu gehört u.a. die Tyrosinkinase HER2/neu in epithelialen Tumoren. Die Antigene können auch durch T-Zellen erkannt werden, z.B. wurden bei zahlreichen Patienten aktivierte T-Zellen gegen Produkte der MAGE-Gene oder Tyrosinase gefunden.

Tabelle 1 zeigt eine Auswahl von tumorassoziierten Antigenen.

Antigen	Tumortyp	Normalgewebe
Antikörper-Erkennung:		
Ganglioside (GM2, GD2)	Melanom	Neuroektodermales Gewebe
Melanotransferrin, mutiert	Melanom	----
gp 75	Melanom	Melanozyten
Her2/neu	Mamma-Ca	Epitheliales Gewebe
T, Tn	Mamma-Ca	Epitheliales Gewebe
P53	Mamma-Ca	Ubiquitär
T-Zell-Erkennung:		
MAGE-1, MAGE-3	Melanom	Hodengewebe
Tyrosinase	Melanom	Melanozyten
MART-1	Melanom	Melanozyten
PMel 17	Melanom	Melanozyten
MUC 1	Pankreas- und Mamma-Ca	Epitheliales Gewebe
Her2/neu	Mamma-Ca	Epitheliales Gewebe
P21ras, mutierte Form	Kolon-Ca	----

Tab. 1: Tumorassoziierte Antigene. Quelle: [27]

Eine wichtige Rolle in der Abwehr von Tumorzellen spielen CD8+ und CD4+ T-Zellen, allen voran die NK (Natural Killer-) Zellen, die maßgeblich an der Erkennung und Zerstörung von neoplastischen Zellen beteiligt sind. Im Falle des Melanoms konnte nachgewiesen werden, dass die Immunantwort auf Melanom-spezifische Melanozytendifferenzierungs-Antigene die Progression des Hauttumors verhindern kann. Verschiedene Schritte der Tumorerkennung und Adhäsion sowie die möglichen Änderungen der Tumoroberfläche sind in Abb. 8 und 9 dargestellt.

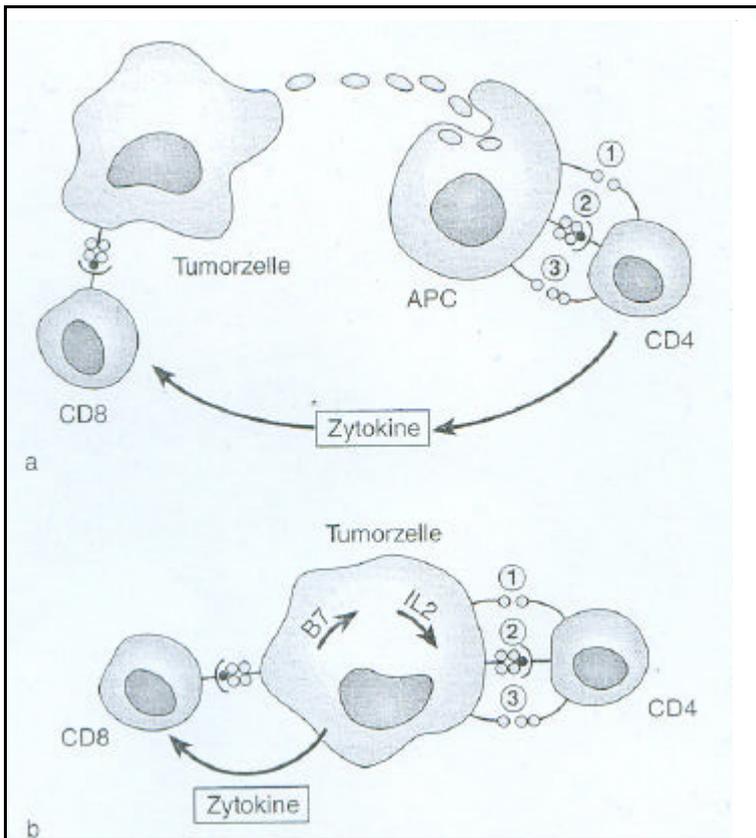


Abb. 8: immunologische Erkennung von Tumorzellen durch T-Lymphozyten [28]
 Die Entstehung von CD8+ zytotoxischen T-Lymphozyten (CTLs) gegen Tumorantigene, die im Kontext von MHC-Klasse-I-Molekülen präsentiert werden, erfordert eine „Hilfe“ in Form von Lymphokinen, welche von CD4+-Zellen produziert werden, die wiederum Antigene im MHC-Klasse-II-Kontext erkennen.

a) Hauptschritte der Antigenpräsentation für T-Zellen:

1. Adhäsion, vermittelt durch LFA3-CD2 und ICAM LFA1
2. Erkennung der Tumorpeptide durch den T-Zell-Rezeptor
3. Co-stimulatorische Signale über die Interaktion von B7-CD28

b) Solide Tumorzellen exprimieren häufig akzessorische Moleküle wie LFA-3 sowie Tumorantigene im MHC-Kontext. Dagegen fehlen ihnen in der Regel die co-stimulatorischen Moleküle der B7-Familie. Transduziert man solche Tumorzellen mit für IL2 oder für B7 kodierender cDNA, konvertiert die Tumorzelle in eine antigenpräsentierende Zelle.

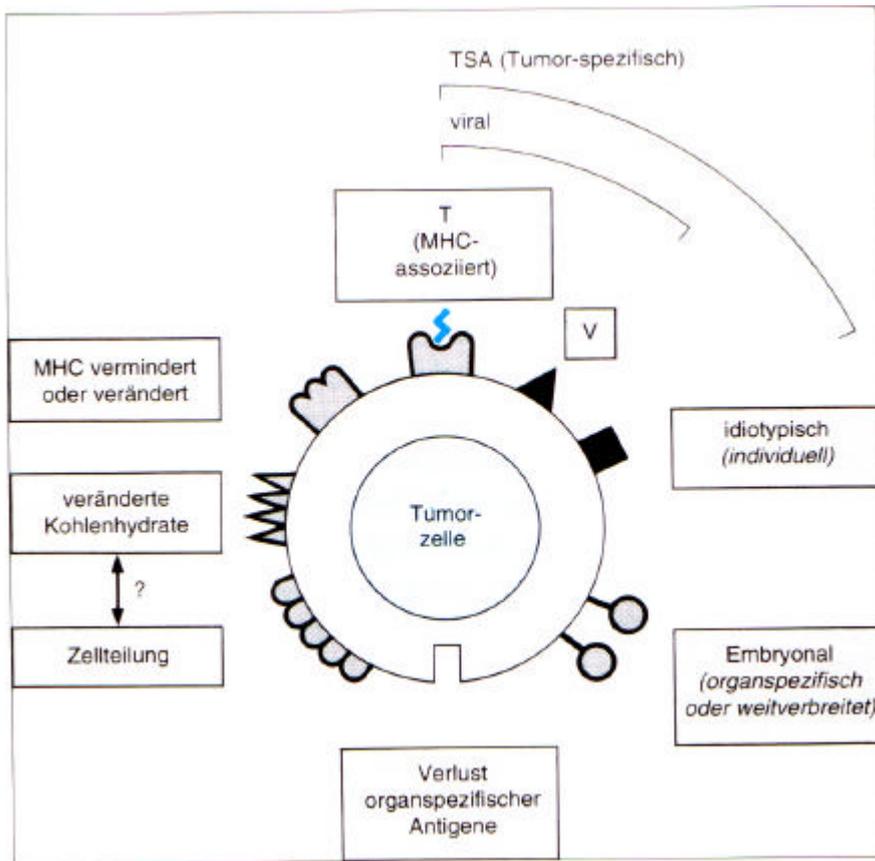


Abb. 9: Mögliche Änderungen der Oberfläche von Tumorzellen (Quelle:[24])

1.3.3 Immunologischer „Escape“

Wie sich maligne Zellen dem Immunsystem entziehen

Würde die Tumorabwehr in jedem Fall funktionieren wie oben beschrieben, wären Krebserkrankungen nicht derart aggressiv und lebensbedrohlich. Entartete Zellen haben die natürlichen Begrenzungsmechanismen der Teilungsfähigkeit außer Kraft gesetzt und führen zudem ein evolutionäres Dasein. Durch die erhöhte genetische Variabilität dieser Zellen ist es möglich, leichter den Angriffen durch das körpereigene Immunsystem zu entkommen, obwohl sie vom Immunsystem als „fremd“ erkannt worden sind.

Es werden verschiedene grundlegende Mechanismen diskutiert, die zu diesem „immunologischen Escape“ führen können:

- Inhibition reifer Immun-Effektorzellen:

Obwohl bei Patienten tumorreaktive T-Zellen und Antikörper gefunden wurden, leiden diese an der Progression der Erkrankung. Isolierte tumorreaktive T-Zellen müssen erst durch Stimulation mit Zytokinen *in vitro* stimuliert werden, um eine ausreichende tumorspezifische Zytotoxizität zu entwickeln. Dementsprechend liegen diese Zellen *in vivo* vermutlich inaktiviert vor. Zudem muss bereits im frühen Stadium der Erkrankung eine ausreichende Menge löslicher Tumorantigene vorliegen, um eine spezifische Immunantwort auszulösen. Für die Entwicklung von CD8+-CTLs werden ebenfalls antigenspezifische CD4+-T-Helferzellen benötigt, welche lösliches Tumorantigen aufnehmen müssen, um die Antigen-Spezifität zu entwickeln.

Eine weitere Möglichkeit ist die Entwicklung einer „tumorspezifischen Toleranz“, wobei die antigenpräsentierenden Tumorzellen die co-stimulatorischen Faktoren oder Adhäsionsmoleküle nicht oder nur in zu geringer Menge exprimieren. Es kommt daraufhin zwar zur Erkennung, aber nicht zum „festen“ Kontakt, der für die Lyse der Zielzelle notwendig ist („Anergie“). Im Normalfall nehmen die immunreaktiven Zellen lösliche Antigene auf, zerlegen sie zu Peptiden und präsentieren diese an der Zelloberfläche im Rahmen der HLA-Klasse II-Moleküle zusammen mit den co-stimulatorischen Molekülen.

- Maskierung der Tumorzellen durch verminderte Antigenexpression:

Da die Heterogenität der neoplastischen Zellen aufgrund der bereits erwähnten evolutionären Prozesse im Laufe der Erkrankung ansteigt, muss das Immunsystem zum einen auf immer neuere Antigenstrukturen antworten, zum anderen zielt der Selektionsdruck in Richtung Antigen-negativer Zellklone, bei denen die Expression von HLA-Molekülen unterdrückt ist.

- Induktion von Apoptose bei der kontaktierenden Immunzelle:

Seit kurzem ist bekannt, dass über den Kontakt von Tumorzelle und Lymphozyt, der über CD95 vermittelt wird (CD 95 auf dem Lymphozyten und CD95-Ligand auf der Gegenseite), bei dem angreifenden zytotoxischen, tumorreaktiven Lymphozyten über eine intrazelluläre Kaskade der programmierte Zelltod ausgelöst werden kann. Hierbei werden im Lymphozyten Enzyme (Caspasen)

aktiviert, die im letzten Schritt zur Lyse des Zellkerns und damit der Immunzelle führen.

Trotz dieser Hindernisse scheint es nicht unmöglich, durch Stimulation des Immunsystems zu einer verbesserten tumorspezifischen Abwehr zu gelangen, da neben einer erhöhten lymphozytären Infiltration des Tumorgewebes auch Spontanremissionen von diversen Tumorarten vorkommen und vermutlich auf einem Durchsetzen des Immunsystems gegenüber diesen Effekten beruhen.

1.3.4 Rolle des Lymphatischen Systems

Zu den wichtigen Geweben und Organen im Lymphatischen System zählen die Lymphknoten (u.a. Tonsillen, axiliäre, mesenteriale und Bein-Lymphknoten), der Thymus, das Knochenmark, die Milz und die Peyer´schen Plaques im Darm.

Diese Systeme sind miteinander über die Lymphbahnen verbunden, wodurch Lymphozyten zwischen den lymphatischen Geweben wandern können. So ist es möglich, dass Antigen-sensitive Zellen Antigene finden und sich am Ort der Immunreaktion anreichern können. Gedächtniszellen und ihre Vorläufer liegen eher gestreut vor, um so eine breite Antwort des gesamten Lymphsystems zu ermöglichen.

Blut und Blutbildendes System

Wie alle Teile des hämatopoetischen Systems besteht die Matrix des roten Knochenmarks aus Retikulumzellen und retikulären Fasern, die gemeinsam ein lockeres Netzwerk bilden. In den Maschen befinden sich Zellen der Erythropoese und Leukopoese (Granulopoese, Monozytopoese, Thrombopoese und zum kleineren Teil der Lymphopoese). Außerdem kommen reife Blutzellen, Makrophagen und in unterschiedlicher Menge Fettzellen vor. Durchzogen wird das Knochenmark von zahlreichen mit Endothel ausgekleideten sinusoidalen Kapillaren einschließlich der zu- und abführenden Gefäße. Die Retikulumzellen sind stark verzweigt. Ihre Fortsätze stehen untereinander in Verbindung, und ihrer Oberfläche schmiegen sich retikuläre Fasern an. Um die sinusoidalen Kapillaren bilden Retikulumzellen eine Adventitia. Retikulumzellen haben zusammen mit Makrophagen die Fähigkeit, in das Knochenmark gelangte fremde und körpereigene Substanzen zu phagozytieren und abzubauen.

Die freien Zellen in den Maschen der Matrix des Knochenmarks sind überwiegend Blutbildungszellen. Sie haben die Tendenz, sich zu Nestern zusammenzulagern, wobei in jedem Nest die Bildung einer Blutzellart vorherrscht. Lichtmikroskopisch sind die Megakaryozyten infolge ihrer Zell- und Kerngröße - trotz ihrer geringen Zahl - sowie die vielen Normoblasten mit einem dichten Zellkern auffällig. Zwischen den Blutbildungszellen liegen freie Makrophagen.

Wenn die Blutzellen reif sind, gelangen sie in die Sinusoide des Knochenmarks und von hier - in der Regel schubweise - ins Blut. Die Wand dieser

Gefäßabschnitte und der Kapillaren besteht aus einem zarten, fenestrierten Endothel, das von einem lockeren Gitterfasernetz umhüllt wird. Eine Basalmembran fehlt weitgehend. Angelagert sind zur Phagozytose befähigte Adventitiazellen (Retikulumzellen). Die reifen Blutzellen gelangen durch die Endothelzellen hindurch in die Blutbahn, bei den Granulozyten handelt es sich um einen aktiven Vorgang, bei den Erythrozyten sind die Einzelheiten des Austritts noch nicht geklärt.

Angeschlossen ist die terminale Strombahn im Knochenmark einerseits an zuführende Arteriolen, durch die Blut ins Knochenmark gelangt und andererseits an Venolen, die das Blut ableiten.

Die wichtigsten Aufgaben des roten Knochenmarks sind somit:

- Die Bildung von Blutzellen einschließlich immunologisch nicht-kompetenter Vorläuferzellen von B- und T-Lymphozyten und deren Freisetzung in die terminale Strombahn,
- Beteiligung am Erythrozytenabbau und Speicherung des dabei freigesetzten Eisens als Ferritin (von den speichernden Retikulumzellen an benachbarte Erythroblasten abgegeben, von diesen durch Phagozytose aufgenommen und zum Aufbau von Hämoglobin verwendet).[30]

Ein Ausstrichpräparat des peripheren Blutes einer Ratte zeigt Abb.10.

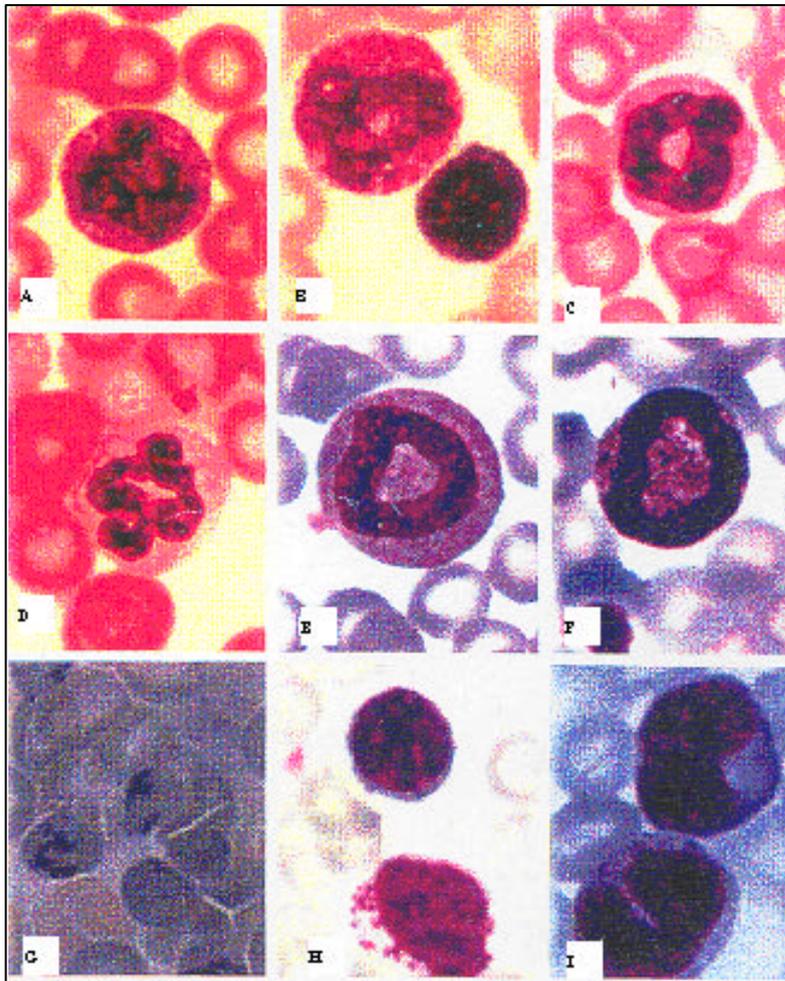


Abb. 10: Ausstrich des peripheren Blutes, Ratte, 250 g KGW, modifiziert nach Wright's-Giemsa. Promyelozyt oder Myelozyt (A), Metamyelozyt (B), loch- bzw. ringkerniger neutrophiler Granulozyt (band cell) (C), reifer neutrophiler Granulozyt (D), Eosinophile mit nukleärer Morphologie einer neutrophilen Bandzelle (E), basophil-ähnliche Zelle (F) (tritt nur auf im Blut einer murinen rekombinant GM-CSF-behandelten Ratte), Retikulozyten mit Retikulozytose (G), kleiner Lymphozyt und großer granulierter Lymphozyt (H), Monozyt (I). (Quelle: [30])

In einer vorausgegangenen Studie an gesunden Ratten [3] konnte gezeigt werden, dass es unter Gabe eines Extraktes von *Echinacea pallida* zu einer Stimulation des lymphopoetischen und hämatopoetischen Systems des Knochenmarks sowie der peripheren lymphatischen Organe kommt.

1.4 Ziele der Arbeit

Diese Arbeit setzt sich zum Ziel, die Effekte einer Radiotherapie in Verbindung mit einer begleitenden Hochdosisbehandlung (100mg/kg) mit *Echinacea pallida* Trockenextrakt (EPT) der eines experimentell induzierten Sarkoms der Ratte zu zeigen. Dabei steht das Geschehen in den sekundären lymphatischen Organen, im Blut sowie im Tumor im Vordergrund.

Dabei werden zum einen die Effekte von ionisierenden Strahlen und EPT *in vitro* auf zellulärer Ebene an isolierten und kultivierten Tumorzellen betrachtet, zum anderen werden die Auswirkungen der Applikation von EPT und Radiotherapie *in vivo* am Modell eines syngenen Tumors der Ratte untersucht. Die Reaktion der Tumorzellen des Walker-Sarkoms auf den Echinacea-Extrakt ist bisher auf zellulärer Ebene nicht beschrieben worden, ebenso wenig der Einfluss auf das tumorspezifische, immunologische Geschehen im lebenden Organismus. Zudem ist es wichtig, eine Unterscheidung von Immunsystem-vermittelter Anti-Tumor-Aktivität und zytostatischen bzw. apoptotischen Effekten festzustellen. Ein weiteres Ziel dieser Arbeit ist es, nicht nur den Einfluss der Therapie auf immunologische, sondern auch auf hämatologische und klinisch-chemische Parameter zu untersuchen.

2 Material und Methoden

2.1 Echinacea pallida Trockenextrakt (EPT)

2.1.1 Spezifikation der Droge

Die Ganzdroge besteht aus ganzen oder geschnittenen, meist 10 bis 20 cm langen und etwa 4 bis 20 mm dicken, zylindrischen Wurzeln; teilweise spiralg gedreht und unregelmäßig verzweigt. Die Oberfläche ist rot- bis graubraun und deutlich längsgefurcht oder gerunzelt. Die Schnittdroge riecht schwach aromatisch, schmeckt leicht säuerlich, schwach bitter. Das mikroskopische Bild ist im Querschnitt durch mehrere schmale Xylemstrahlen gekennzeichnet, die nur im Bereich der größeren Gefäße randliche oder vorgelagerte Holzfasergruppen aufweisen. Sklerenchymfasern mit Phytomelanauflagerungen treten sowohl innerhalb als auch außerhalb des Zentralzylinders auf. Steinzellen und Sklerenchymfasern findet man hauptsächlich im inneren Bereich des Rindenparenchyms und im äußeren Teil des Zentralzylinders, wo sie meist als stark pigmentierte Einzelfasern vorliegen. Ölbehälter (100 bis 200 µm) treten sowohl innerhalb als auch außerhalb des Zentralzylinders auf. Sie sind gewöhnlich einzeln zwischen den Xylemstrahlen oder gegenüber dem interfascicularen Bereich angelegt. Zentrales Markgewebe ist nur bei sehr jungen Wurzeln vorhanden, wobei die Zellen eine rundliche oder schwach kugelige Form haben und zwischen 50 bis 80 µm lang sind. In den Längsschnitten sind pigmentierte Einzelfasern oder kleine Fasergruppen von 100 bis 300 µm Länge im peripheren Rindenparenchym zu finden [16].

2.1.2. Eingesetzter Extrakt

Der eingesetzte Extrakt entspricht dem Wirkstoff des Präparates aar®vir, welches die nativen Extraktivstoffe von *Echinacea pallida radix* enthält. Der Trockenextrakt aus *Echinacea pallida radix* wird aus der Schnittdroge und Methanol 30% (V/V) nach einem für Trockenextrakte in der Monographie ‚Extrakte‘ im Europäischen Arzneibuch und in der 2. Aufbereitungsmonographie der Kommission E [29] beschriebenen Verfahren hergestellt. In den *in vitro* und *in vivo* Versuchen wurde die gleiche Charge des Extraktes des Fertigarzneimittels aar®vir eingesetzt (Charge: 018917). Die Spezifikationen des Extraktes (Extr. *Echinacea pall. e rad. sicc. (5 - 7 : 1)*), sind Tab. 2 zu entnehmen.

Stammpflanze:	<i>Echinacea pallida</i> (NUTT.) NUTT
Verwendeter Pflanzenteil:	Getrockneter Wurzelstock
Auszugsmittel	Methanol 30% (V/V)
Verhältnis von trockener Droge zu nativem Extrakt	5 – 7 : 1
Zusammensetzung der Drogenzubereitung:	90% nativer Extrakt, 10% techn. Hilfsstoff (Kartoffelstärke)
Beschreibung:	Hellbrauner bis ockerfarbener Extrakt von Charakteristischem Geruch
Identität/Reinheit	DC-Fingerprintchromatogramme auf Inhaltsstoffe in <i>Echinacea</i> analog DAB9 und Bauer R. [1]
Trocknungsverlust:	max. 5% (DAB 10-1.NT; 2 h 105°C)
Mikrobiologie:	Entspricht DAB 10 VIII.N5 Kat.3
Grenzwerte Schwermetalle:	Blei 5 mg/kg Cadmium 0,2mg/kg Quecksilber 0,1mg/kg

Tab.2: Spezifikation des bei den *in vitro* und *in vivo* Versuchen eingesetzten Extraktes

2.1.3 Methoden zur Charakterisierung des Extraktes

Dünnschichtchromatographie (DC)

Zur Identifizierung des Trockenextraktes aus *Echinacea pallida* - Wurzel (5 - 7 :1) in echinacea aar / aar vir Dragees wird die Dünnschichtchromatographie (DC): verwendet:

Methode. Dünnschichtchromatographie "Sonnenhutwurzel"; DAB 9 Kommentar

Probenaufbereitung:

100 mg Extrakt werden 5 min lang mit 5ml Methanol R auf dem Wasserbad bei 65°C geschüttelt. Die abgekühlte, filtrierte Lösung dient als Untersuchungslösung.

Adsorbens: Kieselgel G R

Referenzlösung: 3,0 mg Rutosid R in 10ml Methanol R gelöst.

Fließmittel:

wasserfreie Ameisensäure R	13 ml
Wasser	20 ml
Ethylacetat R	67 ml

Lautstrecke: 10 cm

Trocknung: 5 min lang bei 100 - 105 °C

Sprühreagenz:

1. 1 % Diphenylboryloxyethylamin in Methanol
2. 5% Macrogol 400 in Methanol

Auswertung: nach 5 min bei 365nm

Im Chromatogramm der Referenzsubstanz ist im mittleren Bereich Rutosid als gelborange bis orangebraun fluoreszierende Zone sichtbar. Im Chromatogramm der Untersuchungslösung befindet sich im unteren Drittel im Referenzbereich von 0,25 die intensiv grüngelb bis türkis fluoreszierende Hauptzone. Wenig unterhalb der Fließmittelfront liegt eine weitere, schwächere grünlich bis türkis fluoreszierende Zone. Schwächere, meist bläulich fluoreszierende Zonen sind ebenfalls vorhanden

Echinacosidbestimmung mittels HPLC-Methode

Methode:	Quantitative HPLC-Bestimmung von Echinacosid in <i>Echinacea pallida</i> -Trockenextrakt
Prinzip:	externe Bestimmung von Echinacosid über die Fläche
Reagenzien:	3.1. Methanol p.A. 3.2. gereinigtes Wasser DAB 10 3.3. Methanol 70% (VN) 700ml Methanol (3.1.) werden mit 300ml Wasser (3.2.) gemischt] 3.4. Acetonitril HPLC-rein 3.5. Wasser HPLC-rein 3.6. Phosphorsäure 85%ig p.A.
Referenzsubstanz:	Echinacosid
HPLC-Bedingungen: Fließmittel:	Acetonitril 125 Wasser 873
Säule:	LiChrospher-Kartusche (Fa. Merck) 100 RP-18 L = 125mm; ID = 4 mm
Fluss:	1,5ml/min
Detektion	UV 339 nm (Diodenarray: 200-600 nm)

Injektionsvolumen: 20 µl

Laufzeit: 30 min.

Probenvorbereitung:

Extrakt: 100 mg Extrakt, genau gewogen werden in einen 50ml Braunglas Messkolben überführt und mit 40 ml Methanol 70% (3.3.) im Ultraschallbad 30 min lang gelöst. Nach dem Erkalten wird mit Methanol 70% (3.3.) bis zur Marke aufgefüllt. 2ml dieser Lösung werden über einen Membranfilter filtriert und 20µl hiervon injiziert.

Externer Standard: ca. 13 mg Echinacosid (4), genau gewogen, werden in einem 50-ml-Braunglas-Meßkolben mit 30ml Methanol (3.1.) im Ultraschallbad gelöst. Nach dem Erkalten wird mit Methanol (3.1.) bis zur Marke aufgefüllt. Von dieser Lösung werden 20µl injiziert.

Berechnung: Die Berechnung des Gehaltes an Leitsubstanz Echinacosid wird mit Hilfe der Flächenberechnung über den externen Standard ermittelt.

2.2 Tierspezies

Die Spezies Ratte (*Rattus norvegicus*) eignet sich sehr gut als Versuchstier, um *in vivo* hämatologische Untersuchungen des peripheren Blutes und des Lymphatischen Systems durchzuführen. Die für die moderne Mikroanalytik erforderlichen minimalen Blutentnahmen lösen, im Gegensatz zur Maus, keine größeren Veränderungen hämatologischer Parameter aus [30]. Im morphologischen Vergleich der hämatopoetischen und zirkulierenden Blutzellen unterscheiden sich humanes und murines Blut nur sehr gering. Außerdem ist das Rattenmodell biologisch geeignet, Untersuchungen auf dem Gebiet muriner Zytokine durchzuführen und die Daten mit denen beim Menschen zu vergleichen, da diese gleichermaßen hämatologisch immunaktiv sind [30]. Ergebnisse immunologischer Untersuchungen mit definierten Wirkstoffen an der Ratte korrelieren aufgrund der verwandten Morphologie und Kinetik zirkulierender Leukozyten sehr gut mit den entsprechenden Verhältnissen beim Menschen.

Die Sprague-Dawley (SD)-Ratte wurde erstmals von Robert W. Dawley 1925 durch Kreuzung einer hybriden männlichen Ratte mit einer weiblichen Wistar-Ratte gezüchtet [31]. Es handelt sich hierbei um eine Albino-Ratte. In den darauffolgenden Jahren wurden Stämme bei den Firmen Sprague-Dawley Inc. und Charles River weitergezüchtet (Wachstumskurve s. Abb.11). Die Ratte besitzt volle Immunkompetenz, entwickelt aber im Alter spontane Tumoren. Das Tier ist wegen seiner gut beschriebenen Aufzucht und der umfangreichen Datenlage u.a. über immunologische und klinisch-chemische Parameter besonders geeignet für dieses Vorhaben. Ein Tierversuchsantrag für diesen Versuch wurde positiv genehmigt (Westfälische Wilhelms-Universität Münster, Tierversuch Nr. G 4/99).

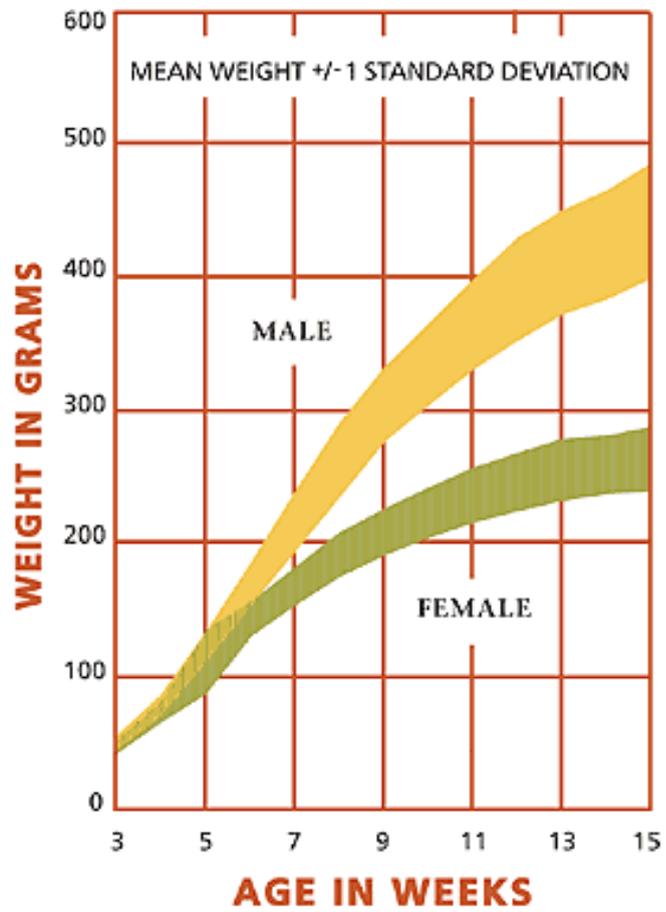


Abb.11: Wachstumskurve der SD-Ratte (Quelle: Charles River Laboratories, 1999)

2.3 In vitro-Versuche

2.3.1 Walker Sarkom

Bei dem Walker-Sarkom 256 handelt es sich um einen immunogenen Tumor der Ratte, der im Alter auch spontan auftritt. Die Zellen sind kultivierbar und übertragbar auf die immunkompetente Ratte, die daraufhin einen Tumor an der Applikationsstelle entwickeln kann [32], [33].

Es handelt sich hierbei um eine relativ schnell wachsende Tumorspezies mit einem exponentiellen Wachstum bei einer mittleren Wachstumsfraktion von etwa 38% /24h und bei einer Verdopplungszeit von etwa 43 h *in vitro* wie *in vivo* [32]. Dabei befinden sich im Mittel 43,2 % der Zellen in der S-Phase, sowie 46,5% in G1-Phase und 10,3% in G2-Phase. Aufgrund des schnellen Wachstums kommt es auch zu einer hohen Zellverlust-Rate von etwa 48,5 % *in vivo*. da die Zellen im Inneren der Geschwulst nicht mehr mit Sauerstoff versorgt werden können. Da es sich hierbei um eine sehr ausführlich beschriebene Zelllinie handelt, deren immunologische Eigenschaften ebenfalls bekannt sind, liegt es nahe, ein solch eingeführtes Modell zu verwenden. Die verwendeten Tumorzellen stammen aus einer Kultur des ECACC (European Collection of Cell Cultures, Nr. 88031148, Name: WRC) und wurden ursprünglich aus einer weiblichen SD-Ratte gewonnen. Die Übertragung der Zellen auf ein genetisch homologes Nagetier unterdrückt in diesem Versuch auch eine Regression des Tumors allein aufgrund einer möglichen genetischen Verschiedenheit von Wirt und Tumor.

2.3.2 Aufzucht der Walker 256 Sarkomzellen

Die Zellen wurden in alle 7 Tage ausgewechseltem MEM Medium + 10% FCS (Fetal Calf Serum) im Brutschrank bei 37°C unter 5% CO₂ angezüchtet und jeweils mit 1-3x 10⁵ Zellen wieder neu angesetzt. Zur Applikation wurden die Zellen zentrifugiert und in PBS-Puffer aufgenommen. [34]

2.3.3 Bestrahlung der Zellkulturen

Die Zellkulturen wurden in Petrischalen mit einer Müller 200 Röntgenapparatur (Filter: 0,8 mm Cu) so lange bei Raumtemperatur (20°C) und in Anwesenheit von Luftsauerstoff bestrahlt, bis die mit dem Dosimeter (Unidos PT) gemessene Strahlendosis erreicht war. Um einen möglichen strahlenabsorbierenden Effekt des Deckels der Petrischale zu eliminieren wurde der Messkopf des Dosimeters ebenfalls mit in einem Deckel einer Petrischale bedeckt.

2.3.4 Messung von Zellzahl, Zellzyklus

Ein Aliquot der Zellsuspension (1ml) wurde mit 1 ml PBS aufgenommen (Phosphate buffered Saline) und anschließend 3x im Durchflusszytometer (PAS I, Partec, Münster) gezählt, wobei der Mittelwert der drei Messungen bestimmt wurde.

2.3.5 Bestimmung von Mikrokernen

Die Zellen aus der Zellkultur werden vom Medium befreit und in 2ml DAPI (CyStatin UV, Partec, Münster) aufgenommen. Die Zahl der Mikrokerne (Micronuclei) wird dann im Flow-Zytometer bei zwei unterschiedlichen Wellenlängen (570 nm und 320 nm) bestimmt. Die Gates werden so gesetzt, dass die Zahl der intakten Kerne in Bezug gesetzt werden kann zur Zahl der Mikrokerne, welche im Bereich von 10- 90% der normalen DNA-Menge zu finden sind [35].

2.3.6 Klonogenitäts-Assay

Unter Klonogenität versteht man die Fähigkeit einer Zellkultur aus einzelnen ausgesäten Zellen Zellklone hervorzubringen. Dies wurde mit Hilfe von Nährmedium-beschichteten Agar-Platten durchgeführt. Man misst hierbei die „Plating efficiency“, d.h. der Faktor der im Vergleich zur ausgebrachten Zellzahl gewachsenen Zellklone (s. Abb.12). Methode: In Petrischalen mit 5 cm Durchmesser wurde ein Agar eingefüllt, bestehend aus:

Lösung A: 9,7g MEM-Medium, 10ml Penicillin/Streptavidin-Lösung (10mg/100ml), 200ml steril filtrierte FCS (Fetal Calf Solution), 2g Natriumhydrogencarbonat , 200 ml H₂O dest. (Nach Mischen steril filtriert)

Lösung B: 0,3 g Agar in 50 ml H₂O dest., autoklaviert

Beide Lösungen werden auf 40°C erwärmt und im Verhältnis 1:1 gemischt und in einer Dicke von ca. 5 mm aufgetragen. Nach Inokulation mit 400 Zellen, der anschließenden jeweiligen Behandlung und einer Inkubationszeit von 5 Tagen wurden die Platten mit einem Farbstoff (0,5mg /ml Nitrophenyl-lodtetrazoliumchlorid) behandelt. Die so gut sichtbar gemachten Zellkolonien (s.Abb.12) konnten dann mittels eines Zählgerätes (Coulter Counter) ausgezählt werden.



Abb.12: Beispiel Klonogenitäts-Assay: (Kontrollgruppe nach 5 Tagen)

2.3.7 Apoptose-Assay

Zur Erfassung der apoptotischen W256 - Zellen wurden die Zellen nach 2 Tagen Inkubation vom Medium befreit und mit 1ml einer Fertiglösung von DAPI SR (DAPI Sulforhodamin, Partec, Münster) markiert und im Durchflusszytometer bei zwei unterschiedlichen Wellenlängen (570 nm und 320 nm) gemessen.

2.4 In vivo – Versuche

In der vorliegenden *in vivo*-Studie an tumortragenden Sprague-Dawley-Ratten wurden über eine Behandlungsdauer von 14 Tagen die Prüfsubstanz EPT in der galenischen Zubereitung als Drageekerngranulat in einer Dosierung von 100 mg / kg KGW (Gruppe II, IV) geprüft . Die Applikation erfolgte intragastral mit einer starren Sonde. Zu diesem Zweck wurden je 9 weibliche Sprague-Dawley Ratten randomisiert in 4 Gruppen eingeteilt und wie folgt behandelt:

Die Prüfsubstanzen wurden einmal zu einem definierten Zeitpunkt pro Tag über 14 Tage intragastral mit einer starren Sonde appliziert. Am 1. und 14.

Behandlungstag wurde den Tieren retroorbital Blut entnommen und anschließend *in vitro* hämatologisch qualitativ und quantitativ analysiert: Leukozyten,

Erythrozyten, Hämoglobin, Hämatokrit, mittleres Zellvolumen (MCV), mittleres korpuskuläres Hämoglobin (MCH) sowie Mittlere Hämoglobinkonzentration der Erythrozyten (MCHC). Zusätzlich wurden durchflusszytometrisch die

Leukozytendifferenzierung mittels Streulichtmessung, die

Lymphozytendifferenzierung nach spezifischer monoklonaler Inkubation mittels

fluoreszenzaktivierter Zellsortierung sowie *in vitro* die klinisch-chemischen Parameter Bilirubin, Kreatinin, Harnstoff, GLDH, GOT, GPT, AP, Glucose, Cholesterin, Triglyzeride, Calcium, Natrium, Kalium, Chlorid und Gesamtprotein selektiv, photometrisch oder ionenselektiv erfasst.

Die histologische Untersuchung am Tumor wurde mit einem Lichtmikroskop an Hämatoxylin-Eosin-gefärbten Paraffinschnitten durchgeführt.

2.4.1 Spezies und Haltungsbedingungen

Weibliche SD-Ratten (Züchter: Charles River) mit einem durchschnittlichen Körpergewicht von 150g wurden in Dreiergruppen in Makrolonkäfigen unter konventionellen Bedingungen bei einer Raumtemperatur von 21 +/- 1°C, einer relativen Luftfeuchtigkeit von etwa 60 % und einem 12 Std.-Tag/Nacht-Rhythmus gehalten. Sie unterlagen vor Versuchsbeginn einer Akklimatisation von 12 Tagen an diese Haltungsbedingungen.

Die Ernährung erfolgte mit der pelletierten Standarddiät Altromin C1000, Misch.Nr. 100 (Firma Altrogge, Lage).

2.4.2 Formulierung der Prüfsubstanzen

160 mg aar vir Drageekerngranulat (\cong 100 mg Echinacea-pallida-Trockenextrakt , EPT) werden in 2 ml Wasser für Injektionszwecke (Aqua ad inj.) suspendiert (=EPS). Dabei entsprechen 0,5 ml dieser Suspension (EPS) genau 25 mg EPT.

2.4.3 Experimentelles Design: Behandlungsgruppen und Applikation

32 weibliche Sprague-Dawley-Ratten wurden zur Untersuchung in Gruppen zu je 3 Tieren randomisiert in Behandlungsgruppen eingeteilt und erhalten nach Applikation des Tumors folgende Dosierungen:

Gruppe	Gruppenbeschreibung	Dosis	Tierzahl (n)
I („K“)	Kontrolle	0	9
II („E“)	EPT	100 mg /kg	9
III („B“)	Bestrahlung	5 Gy	9
IV („EB“)	EPT + Bestrahlung	5 Gy, 100 mg /kg	9

Tab.3: Studiendesign – Einteilung der Gruppen

Die Applikationsmenge an W-256 Tumorzellen bei den SD-Ratten betrug 10^5 Zellen, welche subkutan bei allen Tieren in den linken Oberschenkel appliziert wurden. Eine Zellzahlmessung vor der Applikation wurde per Durchflusszytometrie mit Hilfe von DAPI (4-,6-Diamidino-2-phenylindol, 1:100 verd.) am Partec PAS II Durchflusszytometer durchgeführt.

Die Prüfsubstanz (EPT) wurde einmal täglich zum gleichen Zeitpunkt (8-9 Uhr morgens) an 14 Tagen den nicht sedierten Tieren intragastral mit Hilfe einer starren Knopfsonde verabreicht. Zuvor wurden die Tiere gewogen, um die korrekte

Dosis zu bestimmen. Die Suspension wurde unmittelbar vor ihrer Applikation frisch hergestellt und homogen appliziert. Die Kontrolltiere erhielten abgekochtes Leitungswasser ad libitum.

Zeitpunkt	Intervention
1.-5.Tag	- Eingewöhnung der Tiere
6.Tag	- subkutane Applikation der W256-Zellen
11.Tag	- Einschluss der tumortragenden Tiere in das Protokoll - Randomisierung dieser Tiere* - 1. Blutentnahme - lokale Bestrahlung , 5 Gy (Gr. II, IV) - 1. EPT- Gabe (Gr. III, IV)
12. – 24. Tag	- Applikation: EPT 100mg/kg /die (Gr. II, IV)
25. Tag	- 2. Blutentnahme - Messung der TumorgroÙe - Tötung der Tiere, Tumor- und Organentnahme

Tab. 4: Versuchsplan *in vivo* Versuch

2.4.4 Klinische Untersuchungen

Während der Akklimation vor Versuchsbeginn und im Verlauf der gesamten Versuchsdauer wurde das Allgemeinbefinden der Tiere kontrolliert. Zusätzlich erfolgte täglich eine Bestimmung des Körpergewichtes sowie die Begutachtung des Tumorwachstums.

2.4.5 Blutanalytik

Im einzelnen wurden im peripheren Blut erfasst:

- kombiniert: Erythrozyten (RBC), Retikulozyten (RET), Thrombozyten (PLT), Hämoglobin (HGB), Hämatokrit (HCT)

- Erythrozytenindizes: Mittleres Zellvolumen (MCV), Mittleres korpuskuläres Hämoglobin (MCH), Mittlere Hämoglobinkonzentration der Erythrozyten (MCHC) und Erythrozytenverteilungsbreite (RDW)

- durchflusszytometrisch:

Leukozytendifferenzierung: Leukozyten, Granulozyten, Monozyten, Lymphozyten, B- und T-Zellen, Helfer- und Suppressorzellen

- kombiniert:

GPT, GOT,
Glukose,
Cholesterin, Triglyzeride,
Natrium, Kalium, Chlorid, Calcium,
Kreatinin, Harnstoff, Gesamtprotein.

Mit Hilfe des Hämatologie-Analysengerätes Sysmex K-1000 können bestimmt werden: WBC, RBC, PLT sowie HGB und HCT, ferner MCV, MCH und MCHC.

Der Hämatokritwert gibt den prozentualen Volumenanteil der Erythrozyten im Blut an. Hämoglobin, das in den Erythrozyten enthaltene Chromoprotein, ist neben der Erythrozytenzahl und dem Hämatokritwert ein wichtiges Kriterium der Diagnostik von Anämien. Die Klassifizierung erfolgt durch die Erythrozytenindizes.

Erythrozytengröße und Hämoglobingehalt werden durch das Erythrozytenvolumen

(MCV = mean corpuscular volume), den Hämoglobingehalt der Erythrozyten (MCH = mean corpuscular haemoglobin) und die mittlere korpuskuläre Hämoglobinkonzentration (MCHC = mean corpuscular haemoglobin concentration) gekennzeichnet. Die Erythrozyten-Verteilungsbreite (RDW = red cell distribution width) ist ein Maß der Anisozytose.

Die Parameter wie Enzyme, Glukose, Lipide, Elektrolyte, Kreatinin, Harnstoff und Protein werden mit Hilfe des Analysengerätes Cobas Mira selektiv, methodenorientiert, photometrisch oder per ionenselektiver Elektrode erfasst (s. Tab. 5) Der Zusatzreport liefert analysenspezifisch Daten der Qualitätskontrolle und Statistik.

Parameter	Reagenzienhersteller	Methode
Bilirubin	Roche	Modifizierte Malloy-Evelyn-Methode
Kreatinin	Boehringer Mannheim	Jaffé-Reaktion Endpunkbestimmung ohne Ent-eiweißung
Harnstoff	Roche	Urease/GLDH Methode - vollenzymatischer UVTest
GOT	Roche	Messtemp. 37°C opt. Standardmethode
GPT	Roche	Messtemp. 37°C opt. Standardmethode
AP	Roche	Messtemp. 37°C kinetischer Farbtest
GGT	Boehringer Mannheim	Szasz 74 mit Carbo-y-Gruppe 37°C
Glukose	Roche	Gluc-DH (ALDH)-UV-Methode
Cholesterin	Roche	Chod Pap Methode
Triglyzeride	Roche	Enzymatischer Farbtest ohne Abzug des freien Glycerins
Calcium	Roche	Methylthymolblau
Natrium	Roche	Ionenselektive Elektrode - direkte Potentiometrie
Kalium	Roche	Ionenselektive Elektrode - direkte Potentiometrie
Chlorid	Roche	Ionenselektive Elektrode - direkte Potentiometrie
Protein	Roche	Biuretmethode mit Berücksichtigung des Probenleerwertes

Tab. 5: Übersicht über die gemessenen klinisch-chemischen Parameter mit Angabe der Methoden

Die Leukozytendifferenzierung wurde mit Hilfe des Durchflusszytometers PAS II der Firma Partec (Münster) nach entsprechender Lysierung der Vollblutprobe mit BD Lysis Reagenz durchgeführt (Streulichtmessung).

Die Lymphozytendifferenzierung erfolgte nach spezifischer monoklonaler Inkubation mittels fluoreszenzaktivierter Zellsortierung im Durchflusszytometer (Fluoreszenzmessung).

Quantitativ wurden am 1. Tag (=5 Tage nach Inokulation der Tumorzellen und Beginn der Behandlung) und 20. Behandlungstag (=Sektion) analysiert:

Leukozyten , Lymphozyten , Monozyten , Granulozyten (als Streulichtmessung)

Zusätzlich wurde am 20. Behandlungstag eine Lymphozytendifferenzierung durchgeführt:

T-Lymphozyten (CD2+ / CD45 RA-),

B-Lymphozyten (CD2- / CD45 RA+),

Suppressor-Lymphozyten (CD4- / CD8b+)

Helfer-Lymphozyten (CD4+ / CD8b-),

sowie NK-Zellen (CD8a+ / CD8b-).

Zur Phänotypisierung der Lymphozyten wurden diese mit folgenden monoklonalen Antikörpern der Fa. Pharmingen, San Diego, USA inkubiert, an welche ein Fluorochrom gekoppelt ist:

- Fluorescein Isothiocyanate (FITC) conjugated Mouse Anti-Rat CD2
- R-Phycoerythrin (R-PE) conjugated Mouse Anti-Rat CD45RA OR A/B
- Fluorescein Isothiocyanate (FITC) Mouse Anti-Rat CD4,
- R-Phycoerythrin (R-PE) conj. Mouse Anti-Rat CD8 ($\beta\beta$ -Chain)
- Fluorescein Isothiocyanate (FITC) conj. Mouse Anti-Rat CD8a

Ansatz:

- a) CD2/CD45RA = T- und B-Zellen
- b) CD4/CD8b = T-Helfer- und T-Suppressor-Zellen
- c) CD8a/CD8b = NK-Zellen

Je 5 μ l Antikörper werden mit 50 μ l Na-EDTA-Blut bei Zimmertemperatur im Dunkeln 20 Min. lang inkubiert. Die Suspension wird mit 2 ml Lysis Reagenz der Fa. Becton-Dickinson geschüttelt und wie beschrieben 10 Min. lang inkubiert. 6 Min. lang wird anschließend bei 400 G zentrifugiert, der Überstand abgegossen. Das Sediment wird mit 3 ml PBS-Puffer gewaschen und 6 Min. lang bei 400 G zentrifugiert. Das Sediment wird in 100 μ l PBS-Puffer aufgenommen. Die Suspension wird mit Hilfe des Durchflusszytometers bei den charakteristischen Wellenlängen der Fluorochrome analysiert, wobei jeweils pro Messung 25.000 Partikel gezählt wurden.

2.4.6 Histologie

Vom Tumorgewebe wurden 5µm dicke Paraffinschnitte angefertigt, die anschließend mit Hämatoxylin-Eosin (HE) und nach Goldner gefärbt wurden.

Die fotografische Dokumentation der histologischen Schnitte erfolgte mit einem Zeiss- Fotomikroskop. Die für die Aufnahmen verwendeten Filme waren Fuji Superia 200 Diafilme.

2.4.7 Sektion mit makroskopischer Befunderhebung

Am 25. Tag nach Randomisierung der Tiere, d.h. 19 Tage nach der Applikation der Tumorzellen wurden die Tiere mit Hilfe von Diethylether tief narkotisiert und mittels Schnitt durch die Carotis getötet. Dabei wurde den Tieren Blut abgenommen sowie die inneren Organe und der Tumor nach makroskopischer Befundung entnommen und in wässrige Formaldehyd-Lösung überführt.

2.4.8 Statistik

Fallzahlschätzung:

Für die Fallzahlschätzung wurde die Methode „ANOVA“ auf Basis folgender Daten eingesetzt:

Parameter: Niedrigere Angehrate der Tumoren im Vergleich zur Kontrollgruppe

$\Delta x/s = 1,5$ mit Δx = Differenz der Mittelwerte Kontrollgruppe- Behandlungsgruppe
und s = Standardabweichung innerhalb einer Gruppe

Anzahl Gruppen: 4 Diese Annahme geht von einer signifikanten Tumorreduktion gegenüber der Kontrollgruppe auf dem Signifikanzniveau $p= 0,05$ aus

Statistische Methoden

Aus den Gruppen I, II, III und IV werden Mittelwert und Standardabweichung ermittelt. Die Mittelwerte werden zur besseren Übersicht als Balkendiagramme dargestellt.

Der Vergleich der vier Stichproben wird mit Hilfe der Varianzanalyse (ANOVA) durchgeführt, um einen wahrscheinlichen Unterschied zwischen den Gruppen zu ermitteln. Der Mittelwertvergleich wird als zweiseitiger Test nach Scheffé für unverbundene Stichproben auf dem Testniveau von 95 % durchgeführt.

Dabei wird auf die Verwerfung der Nullhypothese

$H_0: \mu_1 = \mu_2$ (Es gibt keinen Unterschied)

und damit auf die Alternative

H1: $\mu_1 \neq \mu_2$ (es gibt einen Unterschied)

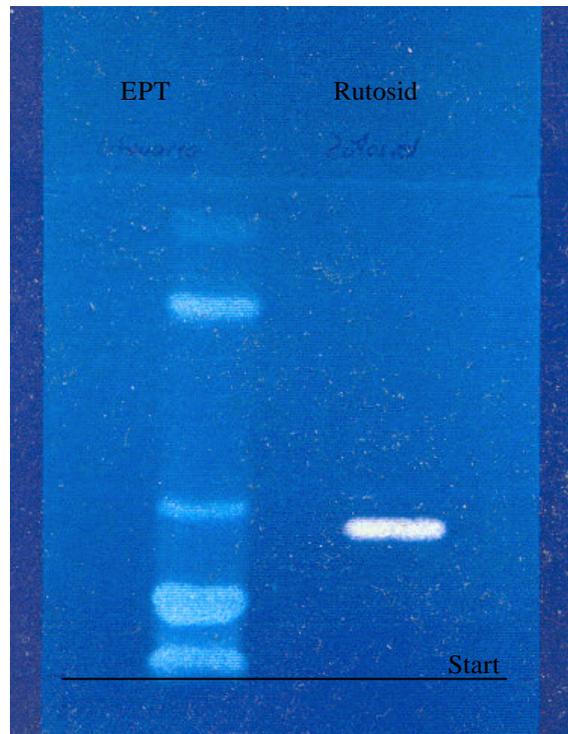
zwischen allen Gruppen getestet.

Die Signifikanz wurde mittels einfaktorieller Varianzanalyse (ANOVA) mit anschließendem post-hoc-Test nach Scheffé (mit $p < 0,05$) getestet. Die Parameter, welche im prä-post-Vergleich verglichen wurden, wurden mit Hilfe von Tests für verbundene Stichproben ausgewertet. Daten, die nur am Ende der Versuche erhoben wurden (Lymphozytendifferenzierung), wurden anhand von t-Tests für unverbundene Stichproben ausgewertet. Dabei wurde auf einen signifikanten Unterschied zwischen der Gruppen I (Kontrollgruppe) und den Gruppen II, III und IV getestet.

3 Ergebnisse

3.1 Charakterisierung des Extraktes

Anhand der Dünnschichtchromatographie (s. Abb.13) in Verbindung mit der Hochdruck-Flüssigkeitschromatographie (HPLC, s. Abb. 14 und 15) konnte die eindeutige Identität des Extraktes sowie der Gehalt der Analytischen Leitsubstanz Echinacosid eindeutig bestimmt werden. Echinacosid ist zwar nicht das wirksamkeitsbestimmende Hauptprinzip, gilt aber allgemein als analytischer Standard, um die Menge an Wirksubstanz zu quantifizieren.



1

2

Abb.13: Identifizierung: Dünnschichtchromatographie (DC), (Methode: s.2.1.7)

1. Eingesetzter Echinacea- Extrakt (EPT)

2. Referenzsubstanz: Rutosid

Der Extrakt konnte am Verhältnis der charakteristischen Banden zur Kontrollsubstanz identifiziert werden.

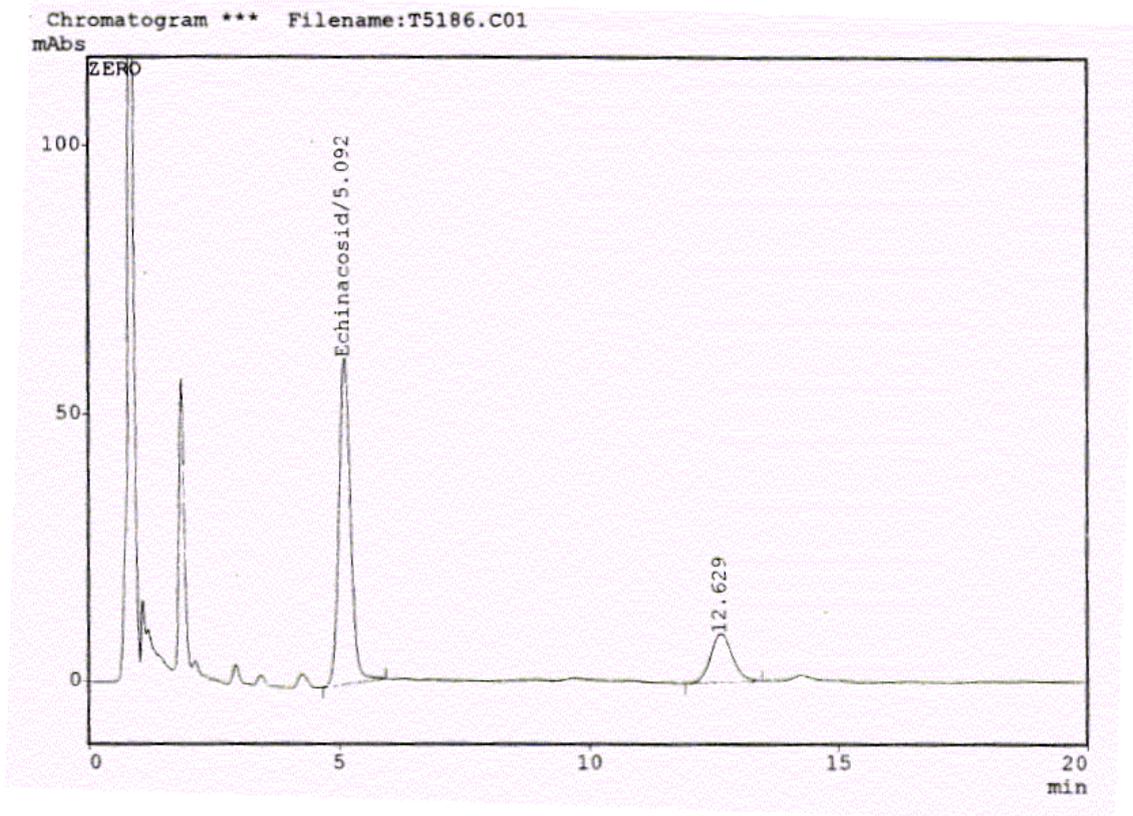


Abb.14: Chromatogramm (HPLC) des verwendeten Extraktes, Leitsubstanz: Echinacosid. Der Echinacosid-Gehalt des eingesetzten Extraktes betrug 0,786% (m/m). Die Methode ist im Teil „Material und Methoden“ beschrieben.

1: C:\TSP\SYSTEM B1\Data\ec16599e\ec16599e.Inj1.AQR (BR)

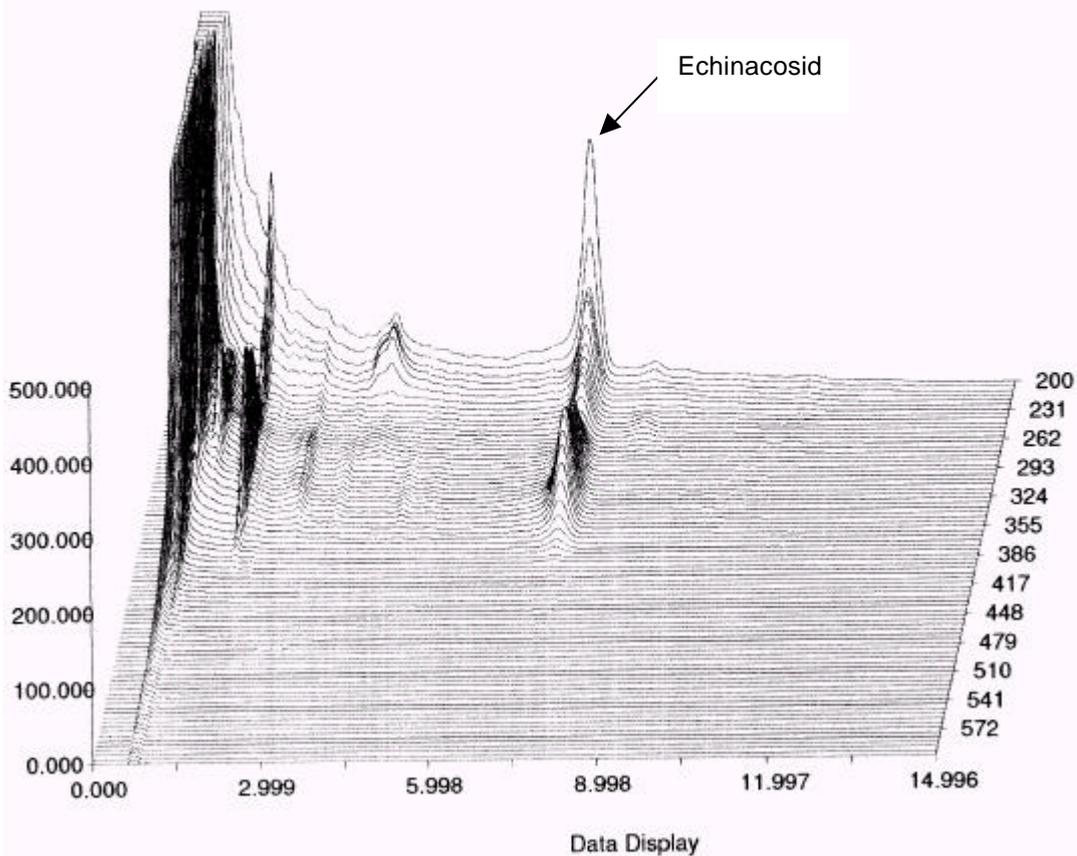


Abb.15: Identifizierung: Diodenarray-HPLC des verwendeten Extraktes, Chromatogramm bei 200-600nm. Anhand des Spektrums des Echinacosid-Peaks sowie durch Vergleich mit einem Referenzextrakt kann der Extrakt eindeutig identifiziert werden. Die Methode ist im Teil „Material und Methoden“ beschrieben.

3.2 Ergebnisse der *in vitro*- Untersuchungen:

3.2.1 Apoptose

Zur Erfassung der apoptotischen W256 - Zellen wurden die Zellen nach 2 Tagen Inkubation mit DAPI / SR (Sulforhodamin) markiert und im Durchflusszytometer gemessen.

Apoptotische Zellen sind an Signalen zu erkennen , die sich vor dem G1- Peak (1. Gipfel im DAPI- Histogramm) befinden.

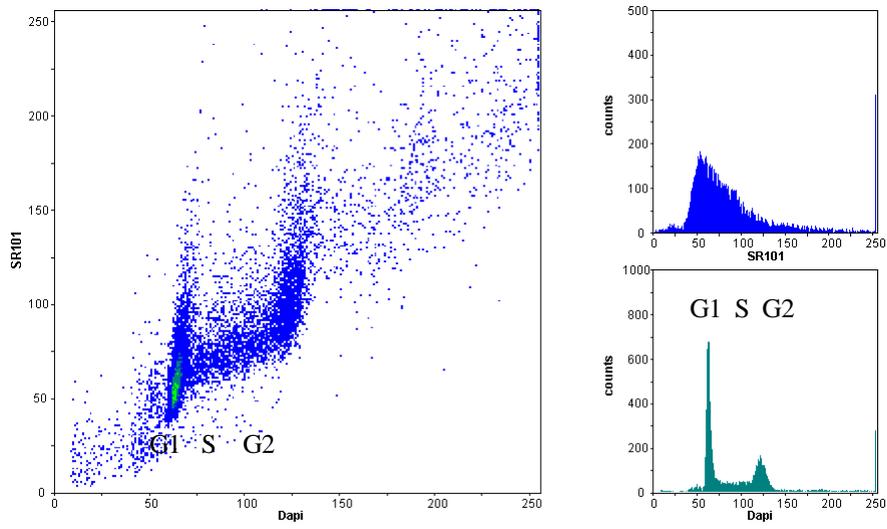


Abb.16: Kontrollgruppe nach 2 Tagen Inkubation:
keine Apoptose vor G1-Gipfel erkennbar.

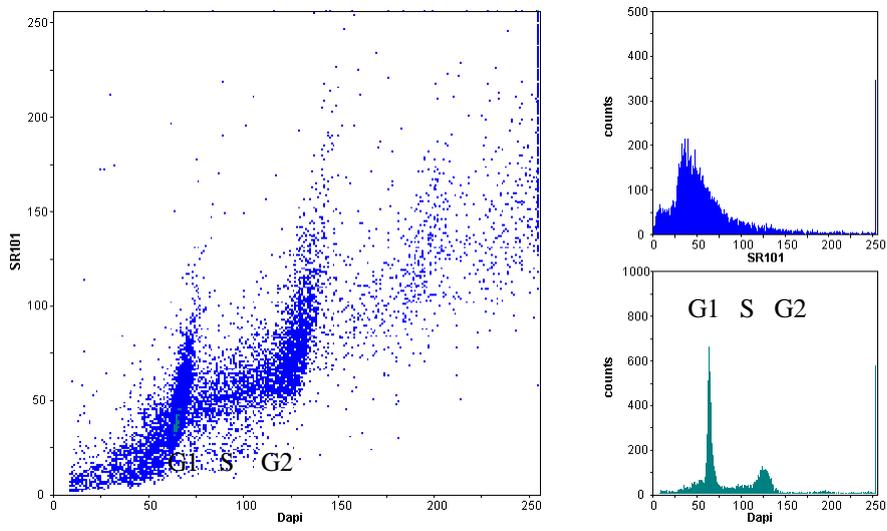


Abb. 17: EPT, 1.0 mg/ 10 ml nach 2 Tagen Inkubation :
keine Apoptose vor G1-Gipfel erkennbar

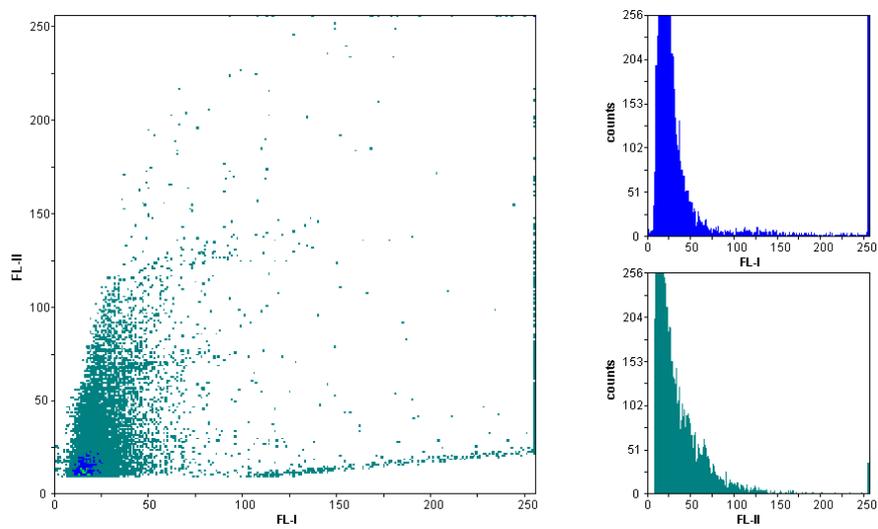


Abb.18: Positivkontrolle mit Betulinsäure 0.01 mmol/l, nach 2 Tagen Inkubation:
kein Zellzyklus mehr erkennbar (Zelltod) sowie starkes Signal vor
vermutetem G1-Peak, viele Zelltrümmer.

3.2.2 Mikrokernbildung

In vitro hat EPT einen nur sehr kleinen oder vernachlässigbaren Effekt auf die Mikrokernbildung, während die Positivkontrollen Betulinsäure und Mistel-Extrakt hier in der Intensität des zellinhibierenden Effektes überraschen(s.Abb.22). Im Folgenden sind einige Beispiel-Histogramme der einzelnen Gruppen aufgeführt um die Effekte zu verdeutlichen.

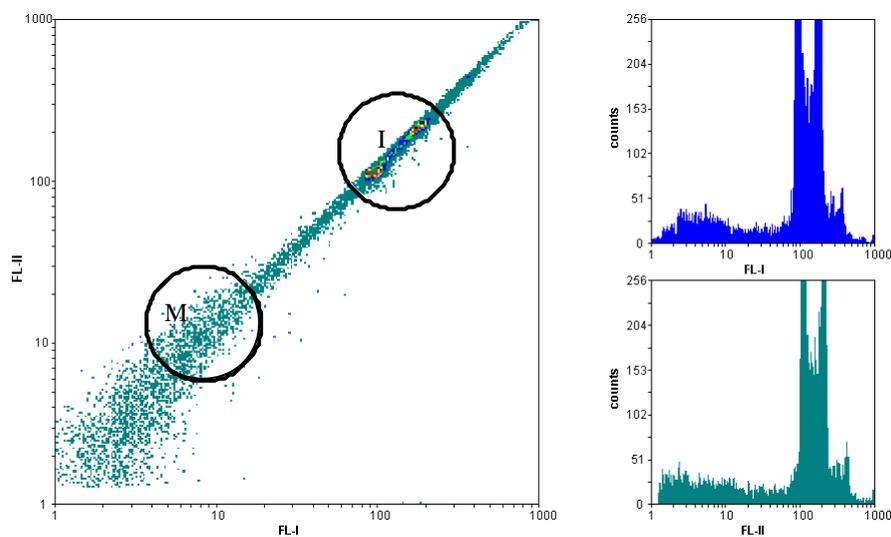


Abb.19 Kontrollgruppe: sehr schwache Mikrokernbildung im 2-Parameter-Diagramm nach 144h erkennbar. Verhältnis

Mikrokerne („M“) / intakte Kerne („I“) = 0,097 (Mittelwert aus n=3 Messungen)

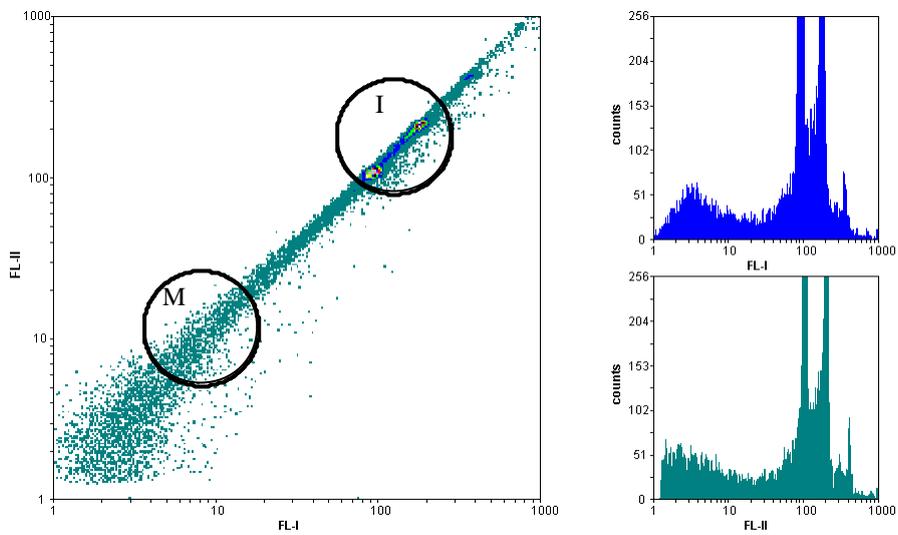


Abb. 20: EPT, 1.0 mg/10 ml : leicht erhöhte Mikrokernbildung nach 144h,
 Verhältnis Mikrokern(„M“) / intakte Kerne („I“) = 0,16 (Mittelwert aus n=3
 Messungen)

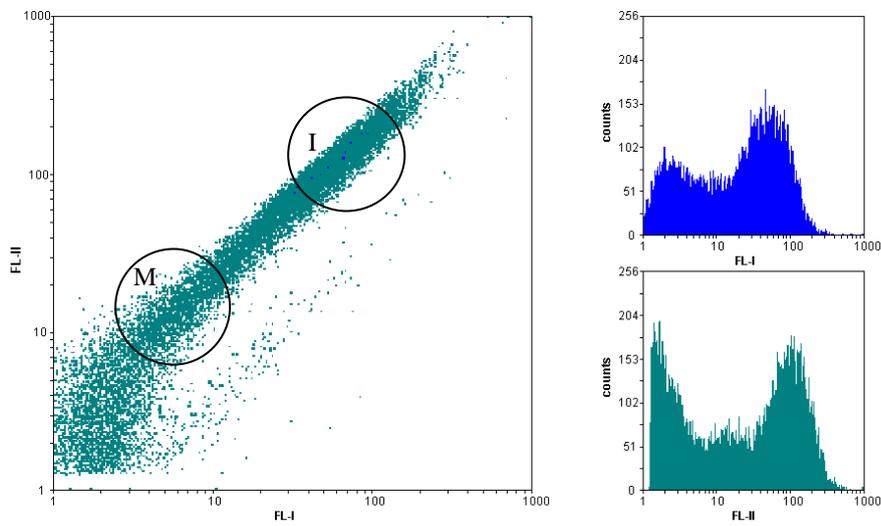


Abb. 21: Betulinsäure 0.01 mM: mehr Mikrokerne als intakte Kerne nach 144h vorhanden. Verhältnis Mikrokerne („M“) / intakte Kerne („I“) = 5,96 (Mittelwert aus n=3 Messungen)

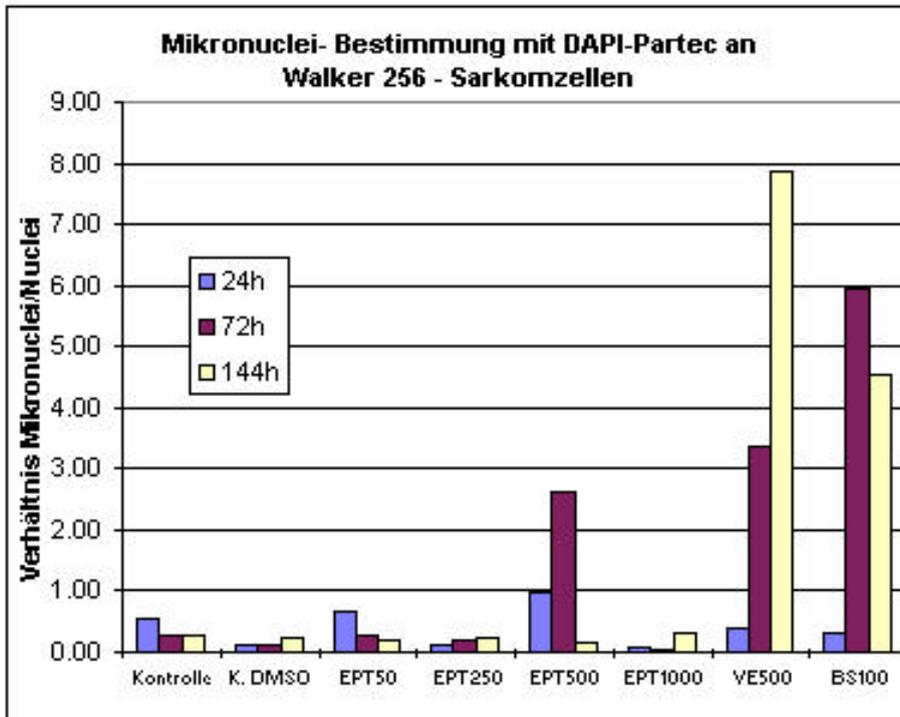


Abb. 22: Auswertung der Bestimmung von Mikrokernen.,
 Kontrolle: Kontrollgruppe, nur Zusatz von 0,5 ml Medium
 K.DMSO: Kontrollgruppe für BS100 , da Betulinsäure in DMSO gelöst ist
 EPT50: Echinacea- Extrakt 0,5 mg/100ml
 EPT250: Echinacea- Extrakt 2,5 mg/100ml
 EPT500: Echinacea- Extrakt 5,0 mg/100ml
 EPT1000: Echinacea- Extrakt 10,0 mg/100ml
 VE500: Viscum- Extrakt, 5mg/100ml
 BS100: Betulinsäure, 0,01mmol/l

3.2.3 Strahlenempfindlichkeit der W256 - Zellen

Bei dieser Versuchsreihe wurden die Zellen in Suspension mit 100 kV Röntgenstrahlung unterschiedlicher Dosen bestrahlt, danach wurden bei verschiedenen Zeitpunkten Zellzyklus und Zellzahl bestimmt.

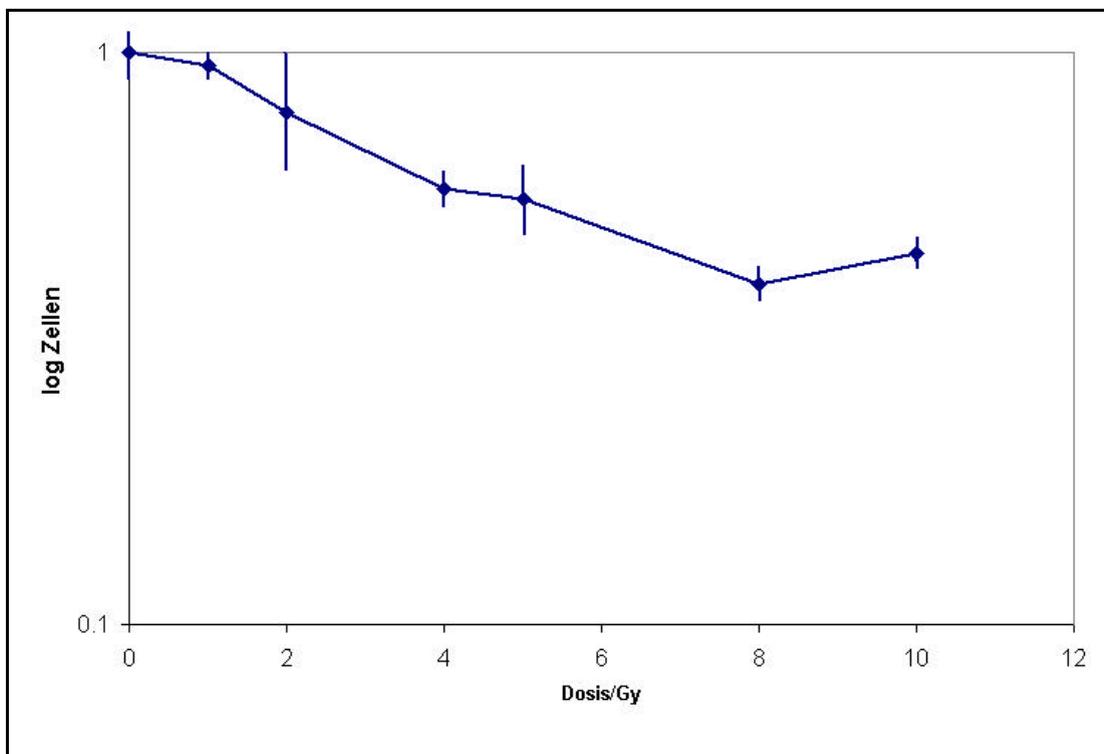


Abb. 23: Zellzahl nach 44 h. Bestrahlung mit 1 - 10 Gy 100 kV

Röntgenstrahlung. Der Punkt, an dem nur noch die Hälfte der Zellen im Vergleich zur Kontrollgruppe vorhanden ist (LD_{50}), liegt bei 5 Gy.

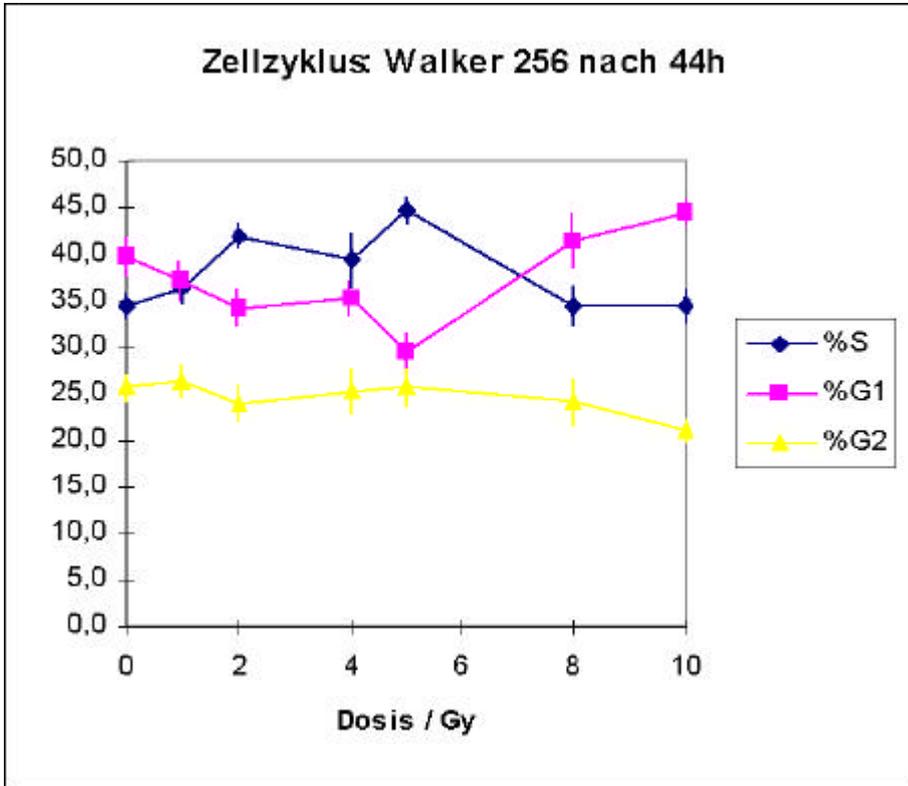


Abb. 24: Zellzyklus nach 44 h Bestrahlung mit 1 - 10 Gy 100kV Röntgenstrahlung

3.2.4 Klonogenität

Unter Klonogenität versteht man die Fähigkeit einer Zellkultur aus einzelnen ausgesäten Zellen Zellklone hervorzubringen. Diese Klonogenität wurde mit Hilfe von Nährmedium-beschichteten Agar-Platten untersucht. Man misst hierbei die „Plating efficiency“, d.h. das Verhältnis der im Verhältnis zur ausgebrachten Zellzahl gewachsenen Zellklone.

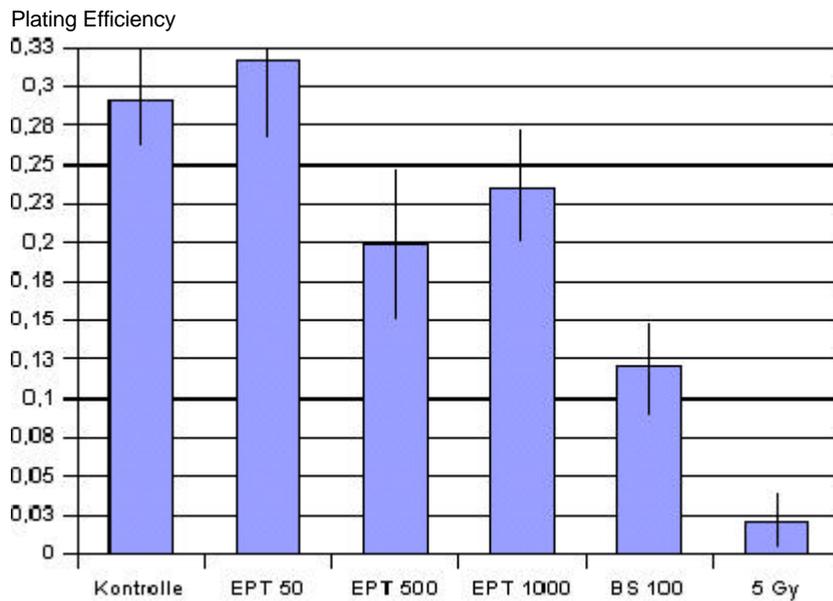


Abb. 25: Klonogenität: Vergleich der Plating Efficiency der Gruppen „Kontrolle“ (unbehandelt), EPT50 (=0,5 mg EPT/100ml Medium), EPT500 (5mg/100ml Medium), EPT 1000 (10mg/100ml Medium), BS 1000 (Betulinsäure 10mg/100ml Medium), 5Gy (=5Gy 200kV Röntgenstrahlen). Es wurden in allen Fällen außer bei der 5-Gy-Gruppe (2000 Zellen) 400 Zellen pro Agar-Platte ausgebracht (Mittelwerte aus n=3 Ansätzen).

3.3 Ergebnisse der *in vivo*-Untersuchungen

3.3.1 Klinische Beobachtungen

Alle Tiere überstanden die intragastrale Applikation ohne Beeinträchtigungen. Die Tiere, die mit der Prüfsubstanz behandelt wurden, zeigten klinisch kein nachteiliges Verhalten bis zum Versuchsende. Tier 17 (Gruppe: II, bestrahlte Tiere) zeigte Anzeichen einer Bronchitis, verlor deutlich gegenüber den anderen Tieren der Gruppe an Gewicht und zeigte ebenfalls auffällige Laborwerte (u.a. deutlich erhöhte Leukozytenzahl), die auf eine Infektion hindeuteten. Bei der Sektion konnten bei diesem Tier Anzeichen einer Pneumonie festgestellt werden. Aus diesem Grunde wurde dieses Tier nicht in die weitere Auswertung der blutchemischen und immunologischen Parameter miteinbezogen. Während der Behandlungsperiode nahmen die Körpergewichte in den Gruppen II (EPT) und IV (EPT + 5 Gy) im Mittel zu, während die Körpergewichte der Tier in der Gruppe I (Kontrolle) konstant blieben und in Gruppe III (Bestrahlung) signifikant ($p < 0,05$) abnahmen.

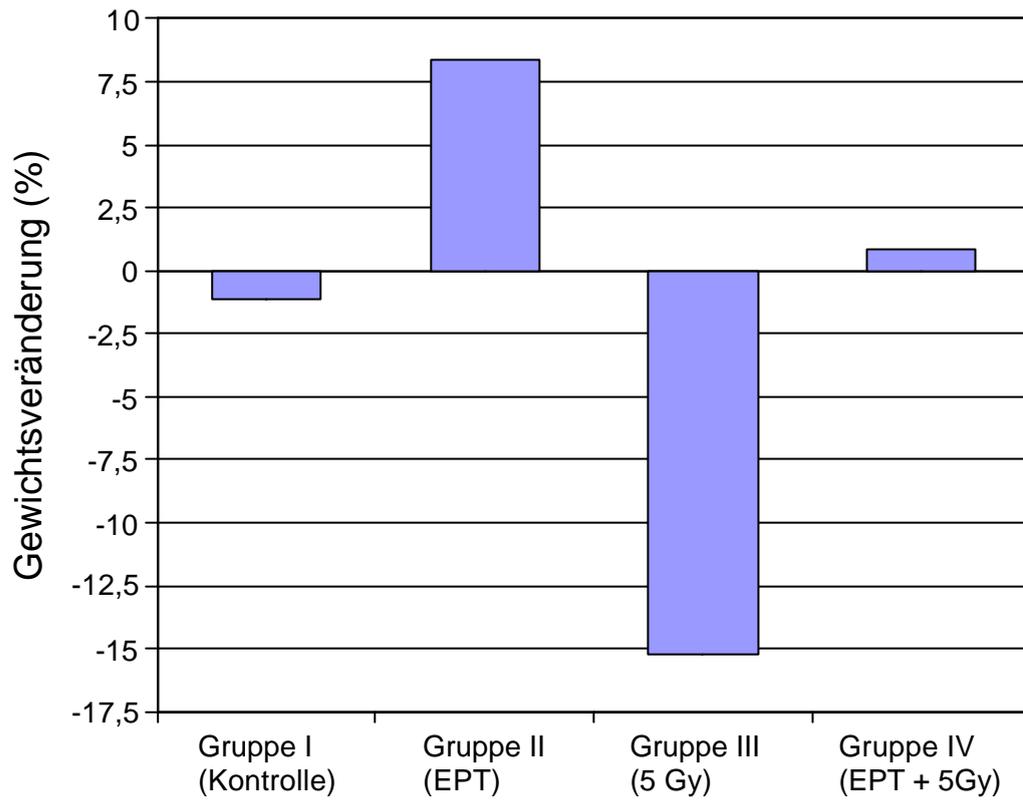


Abb. 26 :Körpergewichtsveränderung der tumortragenden Tiere der während der Studie. Um die Gewichtszunahme des Tumors zu berücksichtigen, wurden die Tumorgewichte vom Körpergewicht am Ende der Studie abgezogen

3.3.2 Makromorphologische Befunderhebung

- Tumor bei Sektion:

Bei der Sektion konnten in den Gruppen I-IV die folgenden Anzahlen an Tieren, welche Tumoren entwickelt haben, festgestellt werden: (jeweils N = 9 Tiere pro Gruppe):

Gruppe	Anzahl Tumoren	Odds Ratio(OR) zur Kontrollgruppe
I (Kontrolle, „K“)	7	-----
II (EPT, „E“)	2	0,28
III (Bestrahlung 5 Gy, „B“):	6	0,85
IV (EPT + Bestrahlung 5Gy, „EB“)	6	0,85

Tab. 5 : Anzahl der bei der Sektion festgestellten Tumoren und Odds Ratio im Vergleich zur Kontrollgruppe

Wie im Methoden-Teil beschrieben, wurden die Tumoren nach der Entnahme auf einer Analysenwaage gewogen. Die Verteilung der Tumorgewichte ist Abb. 27-28 zu entnehmen, die Mittelwerte können aus Tab. 6 entnommen werden. Es fällt bei der Beurteilung der makromorphologischen Daten der Tumoren zum einen auf, dass sich in der mit EPT behandelten Gruppe mit N=2 deutlich weniger tumortragende Tiere befinden als in den anderen Gruppen, und dass der Mittelwert der Tumorgewichte bei Gruppe IV (Bestrahlung + EPT) mit der kombinierten Therapie deutlich, wenn auch nicht signifikant niedriger ist als in der Kontrollgruppe.

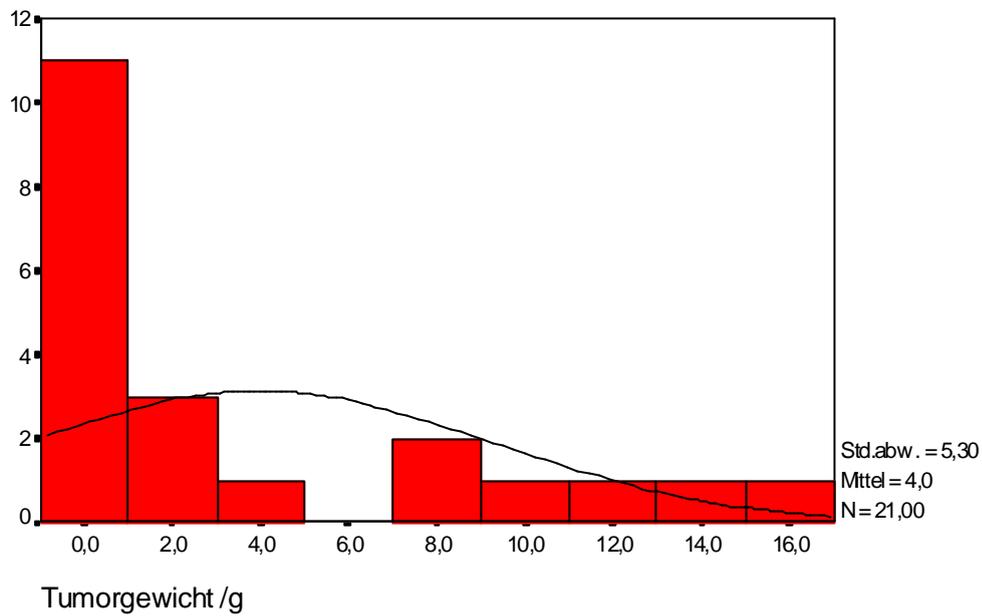


Abb. 27 : Histogramm über alle Gewichte der Tumoren. Es fällt hierbei auf, dass es scheinbar zwei Klassen von Größenordnungen gibt: Tumoren mit Gewicht > 6g und solche mit einem Gewicht < 6g. Hier ist von Interesse, welchen Gruppen diese zuzuordnen sind.

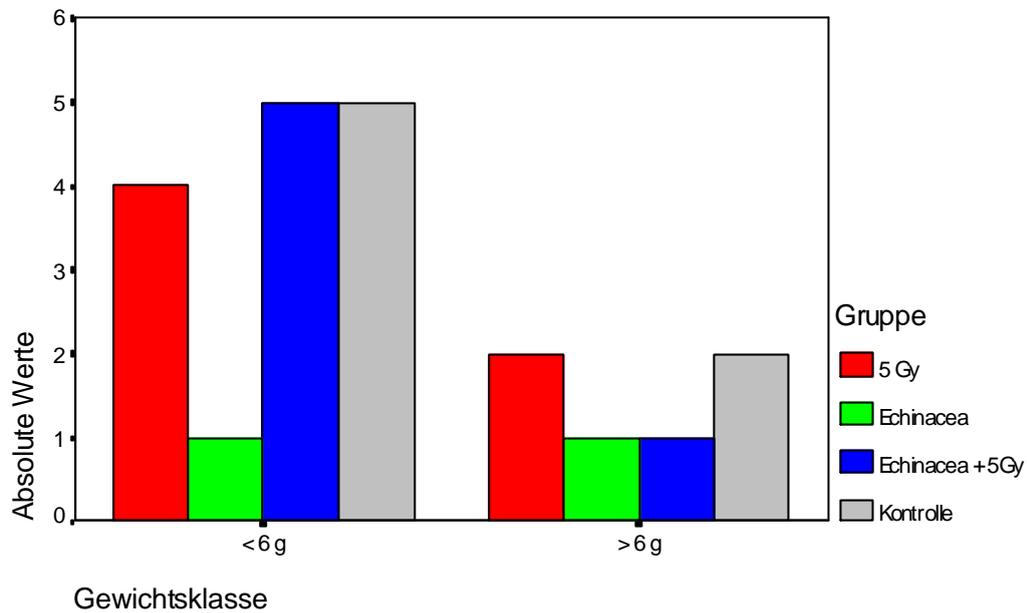


Abb. 28: Trägt man die Tumoren in zwei Gewichtsklassen auf (<6g und >6g), fällt auf, dass sie in etwa gleichen Proportionen über die Behandlungsgruppen verteilt sind. Einen geringe Unterschied kann man in der Gruppe „Echinacea+5G“ (Gruppe IV) feststellen. Eine Aussage ist für Gruppe II ist nicht zu treffen, da hier nur zwei Tumoren gefunden wurden.

Gruppe	I Kontrolle	II EPT	III 5 Gy Bestrahlung	IV EPT + 5Gy Bestrahlung
Mittelwert (g)	3,88	5,09	6,57	1,87
Standardabweichung	5,78	2,74	6,64	3,01

Tab. 6: Tumorgewichte nach Exzision

3.3.3 Mikromorphologische / histologische Befunde

Qualitative Übersicht Mikroskopie: Tumoren

Grp.	Tier Nr.	% intakt. Gewebe	Nekr. Areale	Mitosen	Kernzerfall	Binde-gewebe	Blutgefäße	Vakuolen	Gran. Infiltration	Demarka-tion	Extra-vasale Blutung
I	1	20	+	++		+					
I	2			-/+	+ (poly-morph)	+(unvollst)	+/-	+			
I	3	25	+	-	+		+/-	+	+	+	
I	23		++	-	+		+		+(Lymph.)		+(nekr.)
I	24		++	+,degene-riert	+(Pyknose)	++	++	++	++	+	++
II	13	75	+						+		
II	14		+	++	+(poly-morph)	+	++		++		
III	5	40	+		+(poly-morph)	+(unvollst)	++	+	+/-		
III	10	60/10	++	+	++				++		+
III	11	5/90	+++		+(poly-morph)		+(im nicht-nekr. Teil)		+++	+	++(nekr.)
III	12		+++		+(Pyknose)	++				+	
III	16		++		++(Pyknose)				+++ (Lymph.)	++	
IV	7	20	++	1		++		+/-	++		+
IV	8					++	++			+/-	
IV	9	30	++	-	+		++	++	++		
IV	26	10		-	++(Pyknose)	+(schmal)	++	+	++	++	
IV	28	0							++	++	
IV	30	Solide	+		+(poly-morph)	++	++	+		+(entzünd)	+

Tab.7: Übersicht der semiquantitativen Befunde der histologischen Analyse der Tumoren (Gruppen: I = Kontrolle; II = EPT, III = Bestrahlung 5 Gy; IV = EPT + Bestrahlung 5Gy)

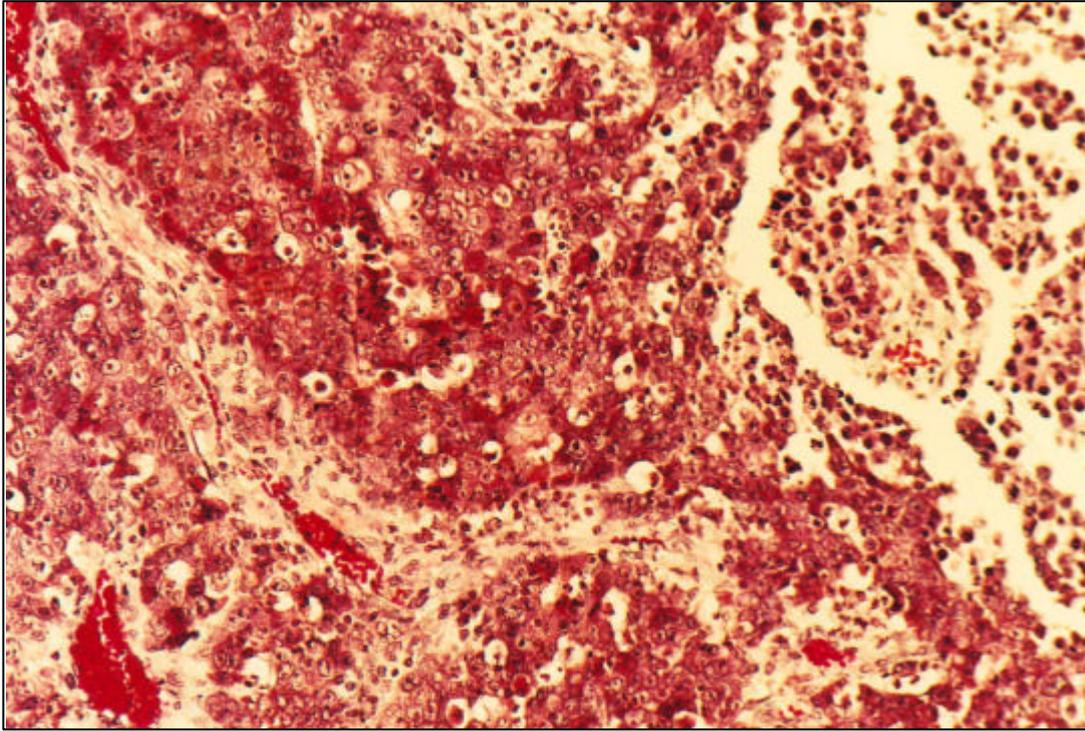


Abb.29a: Histologie, Beispiel: Schnitt durch einen Tumor aus der Kontrollgruppe. Deutlich sind mehrere Mitosen, sowie nekrotische Bereiche zu erkennen, (Gruppe I, Tier 2, 240x, Hämatoxylin-Eosin-Färbung)

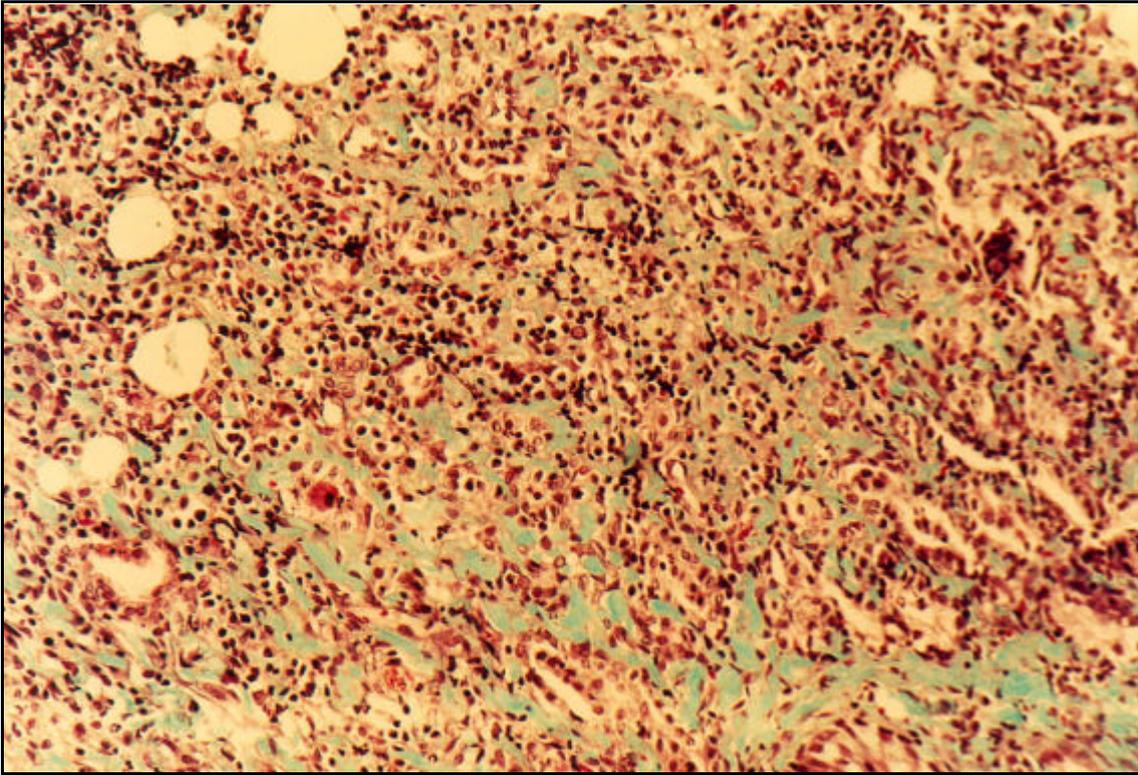


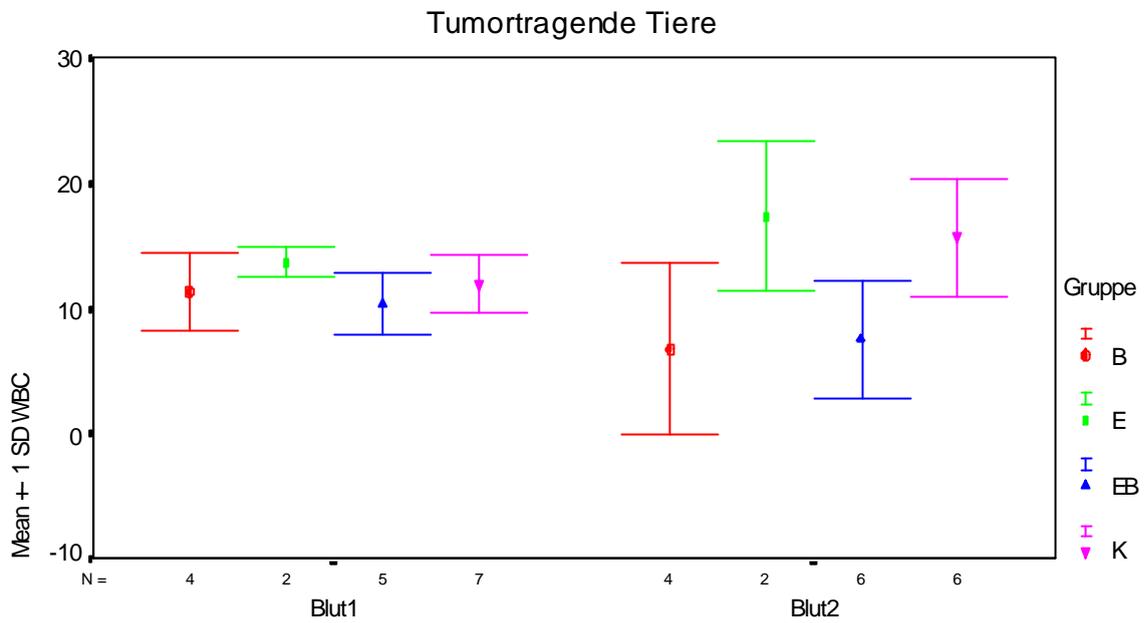
Abb.29b: Histologie, Beispiel: Schnitt durch einen Tumor aus der Kontrollgruppe.
Bindegewebe ist bei dieser Färbung grün hervorgehoben.
(Gruppe I, Tier 3, 240x, GOLDNER-Färbung)

3.3.4 Hämatologie und klinisch- chemische Daten

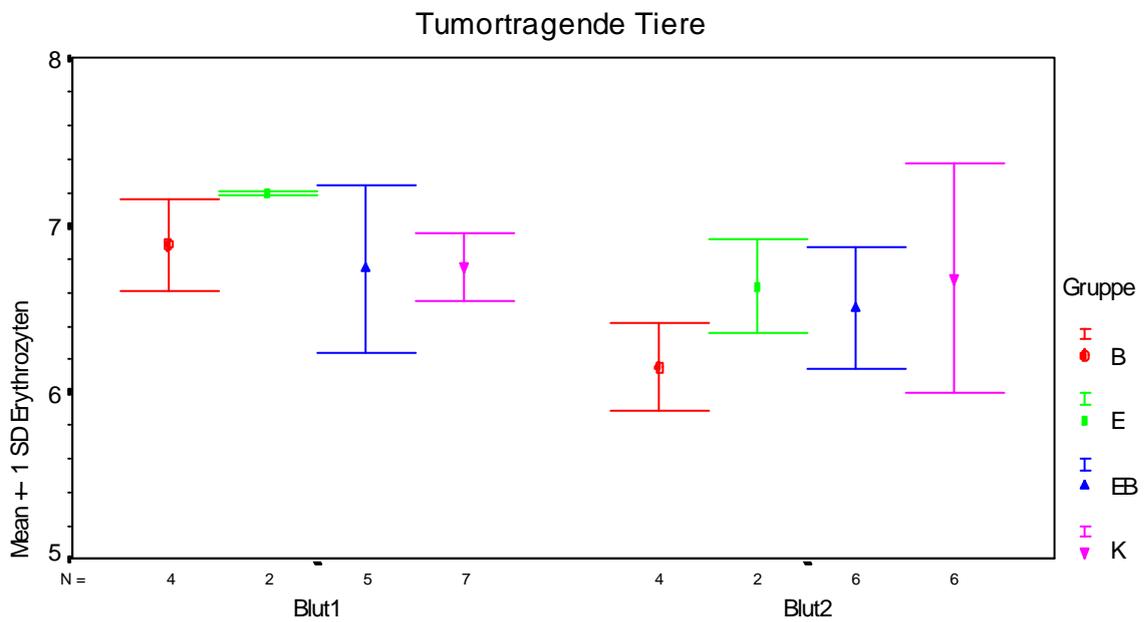
Erythrozyten, Leukozyten, Thrombozyten

Die Potentiale der unterschiedlichen Therapieformen wurden u.a. indirekt durch ihre Wirkung auf die Veränderung der Anzahl der Leukozyten (WBC), Erythrozyten (RBC) und Thrombozyten (PLT) bestimmt. Die Tiere, welche am 5.Tag einen Tumor entwickelt haben, stellen die „per protocol“ (PP) Stichprobe dar. Ebenfalls wurde die Population ausgewertet, welche die „Intention to treat“- Analyse darstellt, d.h. die Gesamtheit aller behandelten und untersuchten Tiere. Die Einzelwerte der ITT-Population sind in einem separaten Anhang zu finden, welcher auf Anfrage zur Verfügung gestellt werden kann.

Insgesamt spiegelt sich die Belastung der Tiere durch den Tumor auch im Blutbild wider. Besonders in der Gruppe der bestrahlten Tiere sinkt die Anzahl der Erythrozyten sowie der Leukozyten deutlich, während die Thrombozytenanzahl sich nur gering verändert. Die Kontrollgruppe zeigte kaum eine Änderung, während in der Gruppe, welche EPT enthielt, die Anzahl der Leukozyten leicht zunahm.



1./2. Blutabnahme



1./2. Blutabnahme

Abb. 30: Graphischer Vergleich der absoluten Zellzahlwerte der Leukozyten (WBC) und Erythrozyten in den Behandlungsgruppen (Echinacea (E) Bestrahlung (B) Kombination E+B (EB) und Kontrollgruppe (K). Einheiten: (RBC) in $10^{12}/l$, Leukozyten (WBC) in $1/fl = 1/\mu m^3$;

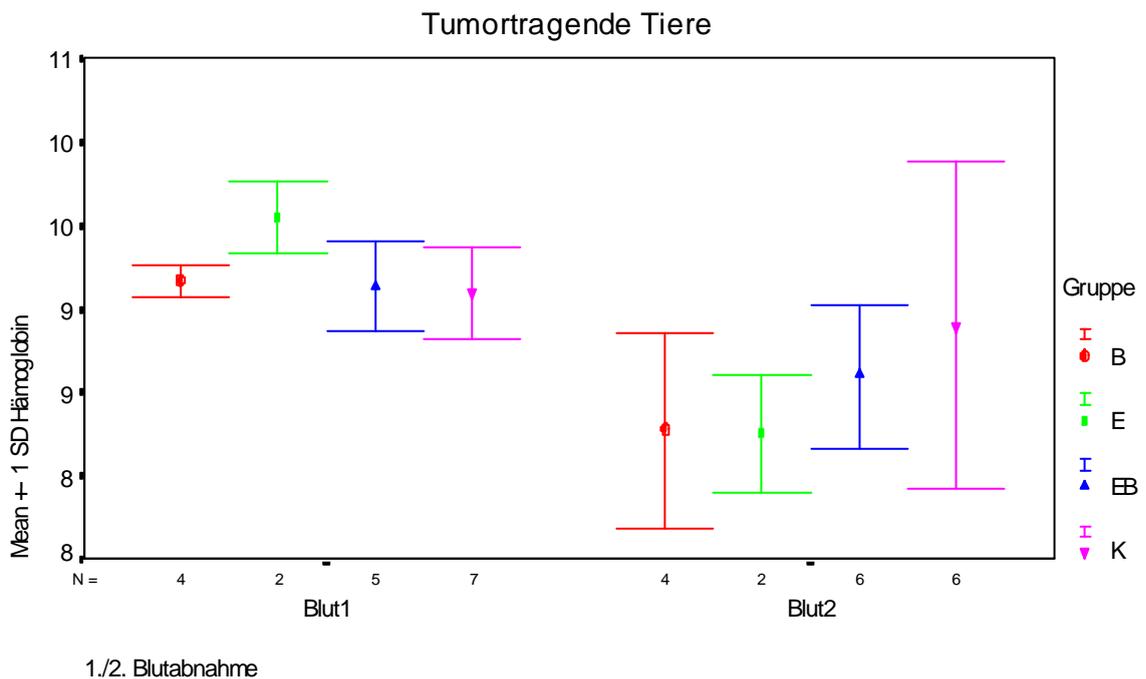
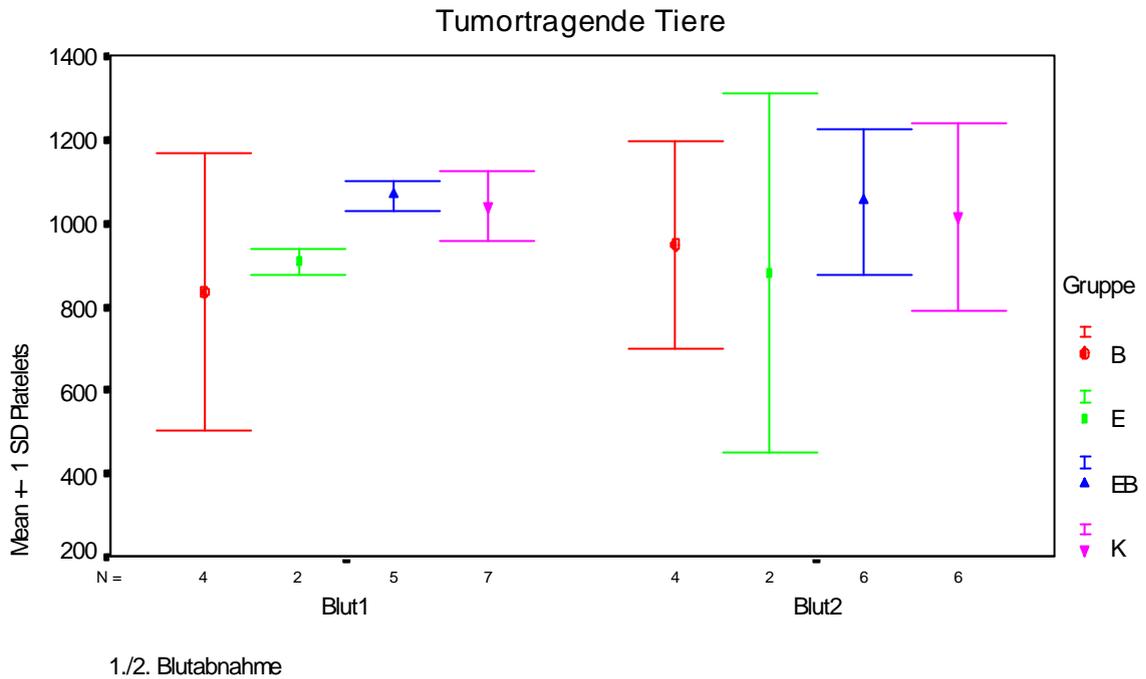


Abb. 31: Graphischer Vergleich der absoluten Zellzahlwerte der Thrombozyten (Platelets) sowie des Hämoglobingehaltes in den Behandlungsgruppen Echinacea (E) Bestrahlung (B) Kombination E+B (EB) und Kontrollgruppe (K). Einheiten: Thrombozyten in $10^9/l$. Stoffmengenkonzentration von Hämoglobin in mmol/l.

Gruppe	RBC	HGB	PCV	MCV	MCH	MCHC	RET	PLT
I	-3,40	-4,92	-4,19	-0,70	-1,53	-0,79	22,68	-7,40
II	-2,09	-3,99	6,44	8,82	-1,99	-9,70	-11,08	-7,34
III	-7,90	-7,53	-6,49	1,49	0,38	-1,21	37,40	-10,45
IV	-2,96	-4,41	6,08	9,46	-1,67	-10,02	-19,35	-5,27

Tab. 8:

Entwicklung des Blutbildes: Prozentuale Veränderung.

Durchschnittliche Zellzahlwerte der Erythrozyten (RBC) in 10¹²/l, der

Thrombozyten (PLT) in 10⁹/l, Retikulozyten (RET) in o/oo,

Stoffmengenkonzentration von Hämoglobin (HGB) in mmol/l, Hämatokrit (HCT) in

l/l, MCV in fl, MCH in fmol und MCHC in mmol/l. Prozentuale Veränderungen der

aufgeführten Werte in Bezug zu den entsprechenden Werten der Kontrollgruppe.

(Gruppen: I = Kontrolle; II = EPT, III = Bestrahlung 5 Gy; IV = EPT + Bestrahlung 5Gy)

Hämatologie:Hämoglobin, Hämatokrit, Erythrozytenindizes

Die Prüfsubstanz (EPT) sowie die Bestrahlung zeigte keinen signifikanten physiologisch bedeutsamen Einfluss auf HCT, MCV, MCH und MCHC (Abb. 31, Tab. 8).

Klinische Chemie

Folgende klinisch-chemische Stoffwechsel-Messgrößen wurden bestimmt:

Bilirubin, Kreatinin, Harnstoff, Glutamat - Oxalacetat-Transaminase (GOT), Glutamat-Pyruvat-Transaminase (GPT), Glucose, Cholesterin, Triglyzeride, Kalzium, Natrium, Kalium, Chlorid und Gesamtprotein (Tab. 9). Auch hier zeigt sich eine deutliche Beeinflussung der Werte durch den Tumor, was besonders bei den deutlichen Unterschieden in der Kontrollgruppe zu erkennen ist.

Tab. 9 zeigt die Änderungen der durchschnittlichen Stoffwechsel-Messgrößen (vorher - nachher) im prozentualen Vergleich.

Gruppe	BILI	CREA	BU	AST	ALT	GP	GLUC
I	-70,67	37,39	-8,11	2,28	-1,50	-15,17	29,85
II	-42,47	17,22	3,34	30,79	-17,09	-11,87	-41,06
III	-72,75	37,88	32,98	24,76	-20,61	-6,64	35,61
IV	-67,03	16,82	-14,92	38,68	-16,55	-16,82	-40,36

Gruppe	CHOL	TRIGL	P	CA	NA	K	CL	PROT	ALB
I	28,25	-20,51	4,70	9,90	24,75	29,01	27,77	1,20	-2,07
II	-3,84	-34,12	20,53	-1,11	4,45	24,96	2,45	-6,78	0,69
III	12,68	4,47	0,69	20,68	13,01	16,88	18,07	6,30	2,84
IV	-19,36	-34,87	15,17	-3,10	1,54	19,57	-6,45	-10,73	-2,54

Tab.9: Prozentualer Vergleich der durchschnittlichen Stoffwechsel-Messgrößen in Bezug zu den Anfangswerten: Bilirubin (Bili), Kreatinin (Crea), Harnstoff (BU), GOT, GPT, Glukose, Cholesterin (Chol), Triglyzeride (Trigl), Calcium (Ca), Natrium (Na), Kalium K, Chlorid (Cl), Gesamtprotein und Albumin (Gruppen: I = Kontrolle; II = EPT, III = Bestrahlung 5 Gy; IV = EPT + Bestrahlung 5Gy)

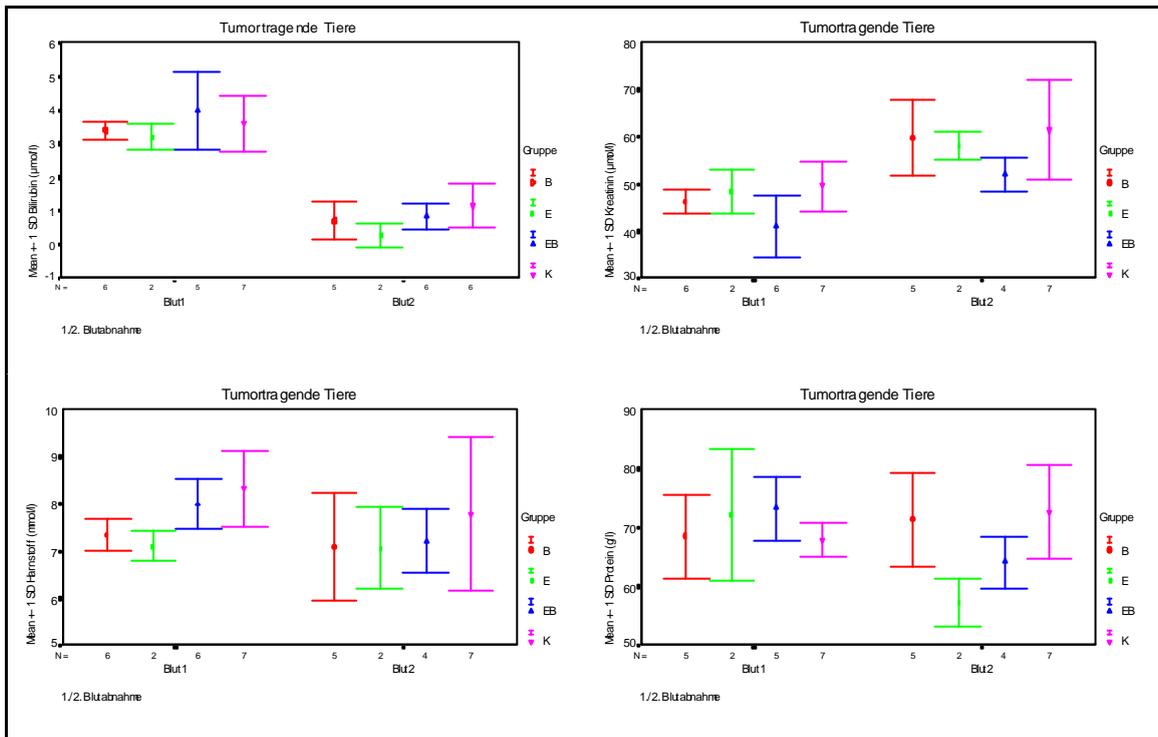


Abb. 32: Vergleich der Stoffwechsellmessgrößen von Bilirubin, Kreatinin in mmol/l und Harnstoff in mmol/l und Protein in g/l der tumortragenden Tiere.

Legende zu den Gruppen:

„K“ = Kontrolle (Gr.I),

„E“ = EPT (Gr.II)

„B“ = Bestrahlung (Gr.III)

„EB“ = EPT+ Bestrahlung (Gr. IV)

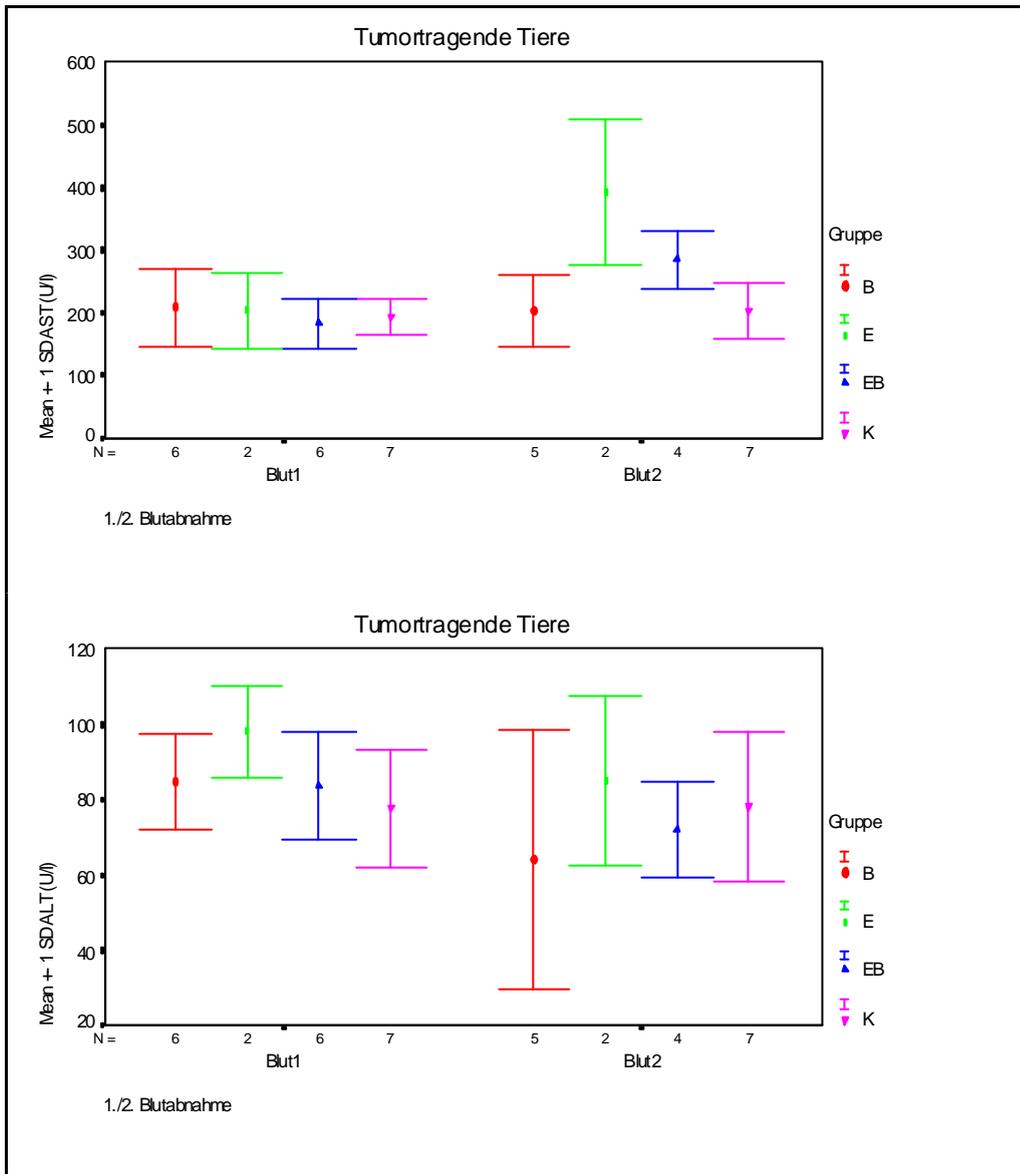
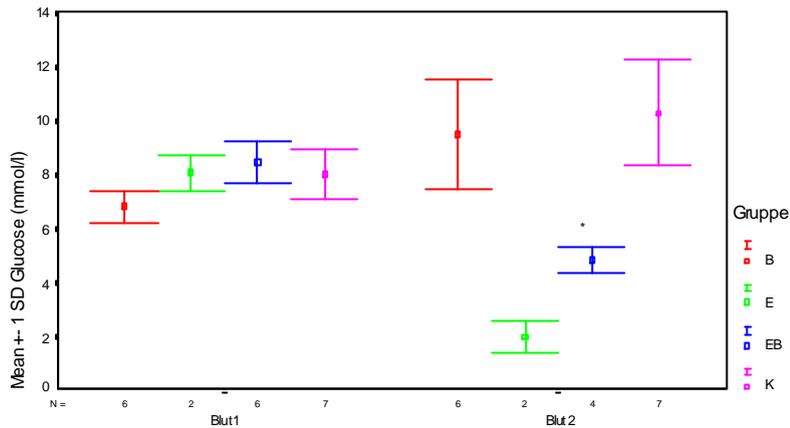
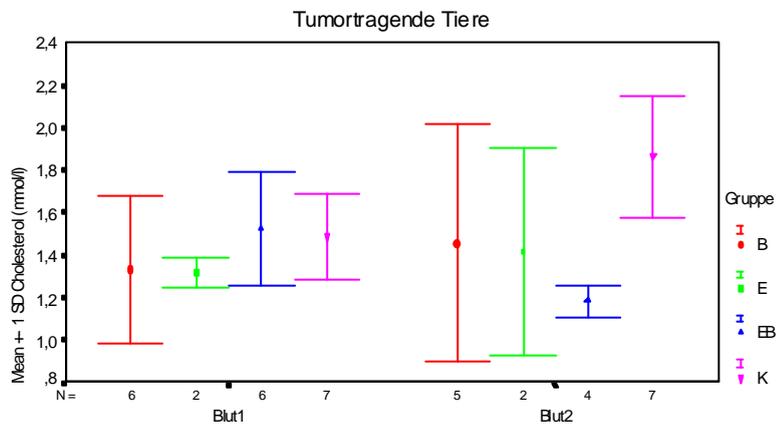


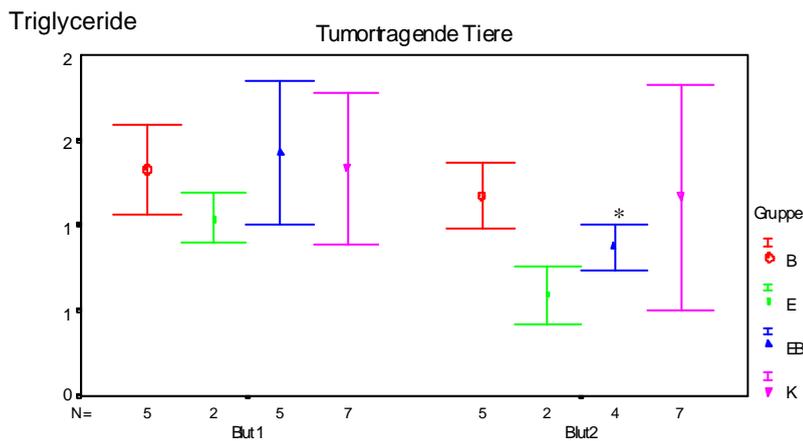
Abb. 33: Vergleich der Stoffwechsellmessgrößen von GOT (AST) und GPT (ALT) in U/l. Legende zu den Gruppen:
 „K“ = Kontrolle (Gr.I),
 „E“ = EPT (Gr.II)
 „B“ = Bestrahlung (Gr.III)
 „EB“ = EPT+ Bestrahlung (Gr. IV)



1./2. Blutabnahme



1./2. Blutabnahme



1./2. Blutabnahme

Abb. 34: Vergleich von Glukose, Cholesterin und Triglyzeriden in mmol/l * = $p < 0,05$; „K“ = Kontrolle (Gr.I); „E“=EPT (Gr.II); „B“= Bestrahlung (Gr.III); „EB“= EPT+ Bestrahlung (IV)

3.3.5 Immunologie

Lymphozytendifferenzierung

Gruppe	Lymphozyten	Granulozyten	Monozyten	T-Lymph.	B-Lymph.	Suppr.-Lymph.	Helfer-Lymph.	NK-Zellen
II % Abw.	-12,2	57,7	-2,2	16,3	2,38	25,41	18,49	217,82
III % Abw.	-3,96	6,11	48,13	-16,97	-13	0,85	-9,12	229,39
IV % Abw.	10,74	-33,74	18,18	4,95	-1,77	13,12	0,48	354,92

Tab. 10: Vergleich des leukozytären Blutbildes. Prozentuale Unterschiede der durchschnittlichen Zellzahlwerte der Lymphozyten, T-, B-, Helfer-, Suppressor- und NK-Zellen sowie der segmentkernigen Granulozyten und Monozyten je ml Blut in Vergleich zur Kontrollgruppe
(Gruppen: I = Kontrolle; II = EPT, III = Bestrahlung 5 Gy; IV = EPT + Bestrahlung 5Gy)

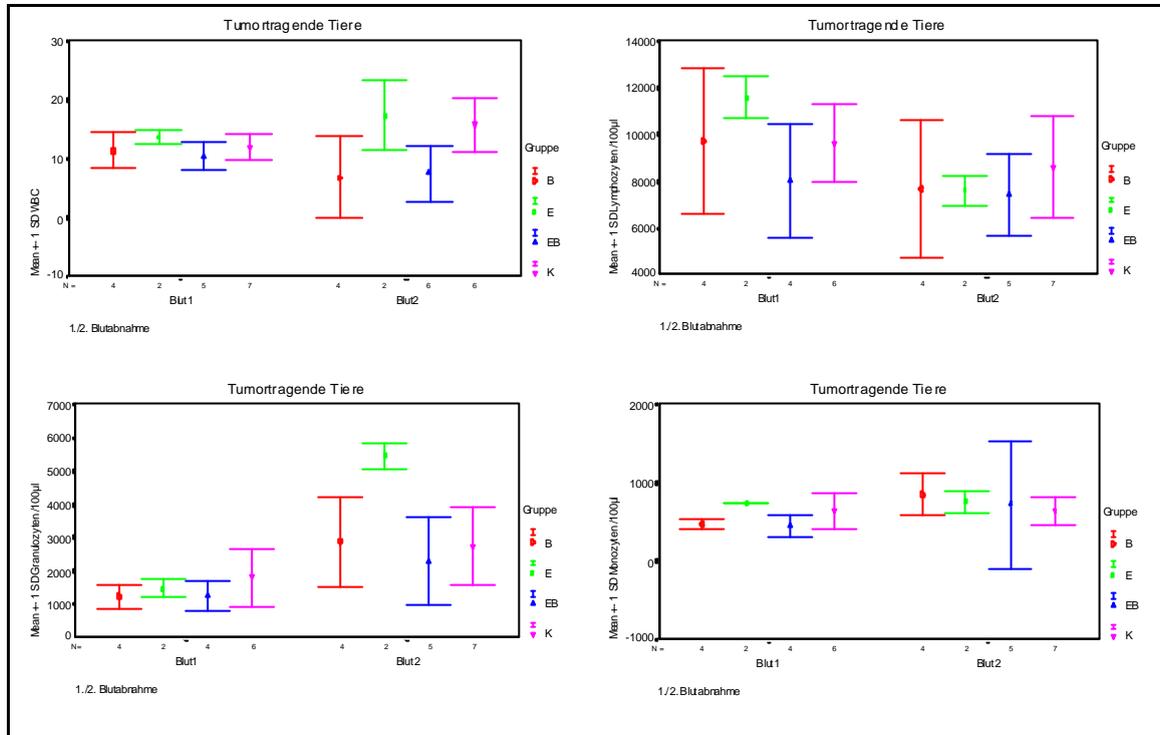


Abb. 35: Vergleich der gemessenen Zellzahlen der Leukozyten, Lymphozyten, segmentkernigen Granulozyten und Monozyten je µl Blut (gemessene Werte: s. Tabelle 10). Legende zu den Gruppen:
 „K“ = Kontrolle (Gr.I),
 „E“ = EPT (Gr.II)
 „B“ = Bestrahlung (Gr.III)
 „EB“ = EPT+ Bestrahlung (Gr. IV)

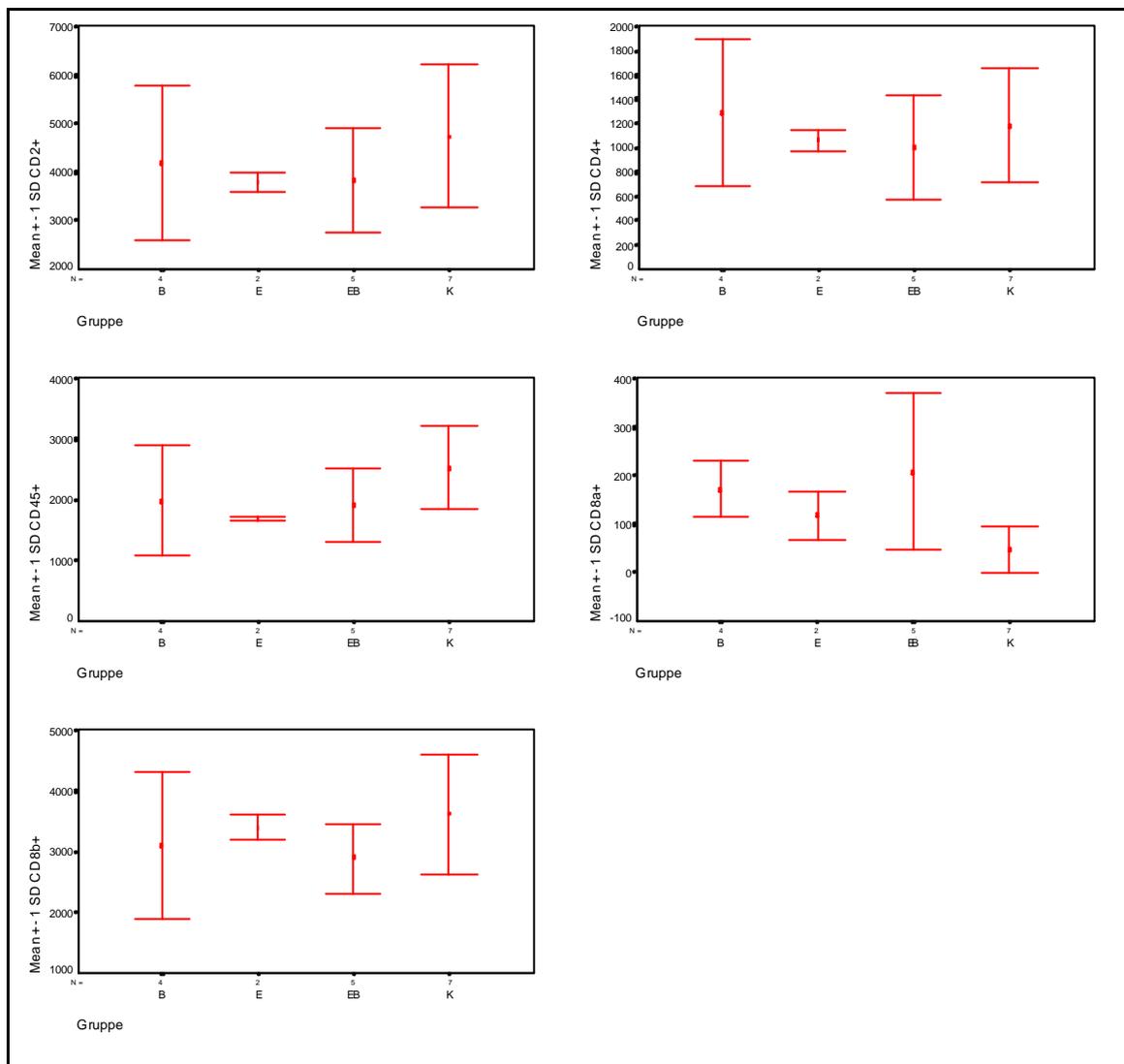


Abb. 36: Vergleich der gemessenen Zellzahlen der T- und B-Lymphozyten, Helfer-, Suppressor- sowie NK- Zellen je μl Blut (gemessene Werte: s. Tabelle 10) der tumortragenden Tiere der Gruppen Kontrolle (K), Bestrahlung (B), Echinacea (E) und Bestrahlung/Echinacea kombiniert (EB)

Da die Anzahl der tumortragenden Tiere zu gering für eine statistisch valide Aussage zur möglichen Stimulation der Lymphozyten ist, sind zur Verdeutlichung des immunstimulatorischen Effekts besonders an den NK- Zellen (CD8a) hier die Daten aller behandelten Tiere (tumortragende und nicht-tumortragende Tiere) gezeigt:

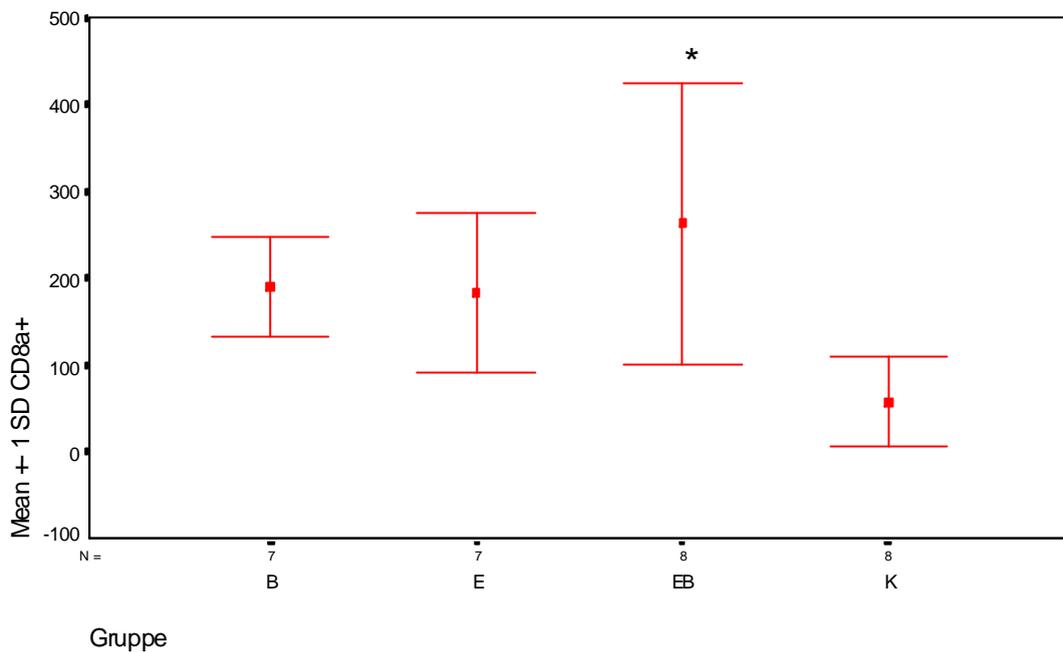


Abb. 37: Vergleich der gemessenen Zellzahlen NK- Zellen je μl Blut (gemessene Werte: s. Tabelle 10) aller behandelten Tiere.

* =Signifikanz $p < 0,05$ gegenüber Kontrollgruppe (K)

Legende zu den Gruppen:

„K“ = Kontrolle (Gr.I),

„E“ =EPT (Gr.II)

„B“ = Bestrahlung (Gr.III)

„EB“ = EPT+ Bestrahlung (Gr. IV)

3.3.6 Zusammenfassung der Ergebnisse der *in vivo* Versuche

Vom klinischen Gesamteindruck her waren deutliche Unterschiede zwischen den Gruppen zu erkennen – besonders die Entwicklung des Körpergewichts der Tiere zeigte, dass die tumortragenden Tiere, welche EPT erhielten - alleine oder in Kombination mit Bestrahlung – deutlich an Gewicht zunahmen, während die Kontrollgruppe sowie die Gruppe der bestrahlten Tiere an Gewicht abnahmen.

In den histologischen Untersuchungen des Tumorgewebes konnte festgestellt werden, dass der Tumor in allen Gruppen einen hohen Anteil von nekrotisierten Gewebeanteilen zeigte, der in der bestrahlten Gruppe der Tiere (III) am höchsten war. Zudem konnten in den Gruppen der behandelten Tiere (II, III, IV) im Vergleich zur Kontrollgruppe (I) ein erhöhter Kernzerfall sowie qualitativ eine erhöhte Infiltration von Granulozyten und/oder Lymphozyten in das Tumorgewebe beobachtet werden.

Auffällig - wenn auch nicht statistisch signifikant- war zudem, dass nur 2 Tumoren in der EPT-Gruppe (II) auftraten, während sich in allen anderen Gruppen mindestens 6 Tumoren fanden. Dies bedeutet, dass bei 78% der Tiere unter EPT keine Tumoren bei der Sektion festgestellt werden konnten, obgleich alle Gruppen gleich behandelt wurden. Zum Vergleich: in der Kontrollgruppe bildeten 7 von 9 Tieren (78 %) einen Tumor.

Die *hämatologische Analyse* des peripheren Blutes zum Ende der Therapie ergab nach Behandlung mit EPT alleine (Gruppe II) für die tumortragenden Tiere

im Vergleich zur Kontrollgruppe eine Abnahme der Zellzahl von Lymphozyten, sowie eine Zunahme der Granulozyten. In Gruppe II (EPT) waren die Werte der T-, sowie der Suppressor-, Helfer- und NK-Zellen am Ende des Versuchs im Mittel deutlich höher als bei der Kontrollgruppe. Die Anzahl von NK-Zellen pro Volumeneinheit war am Ende des Versuchs in Gruppe IV (EPT+ Bestrahlung) in der ITT –Population (alle Tiere mit und ohne Tumor) im Vergleich zur Kontrollgruppe im T-Test statistisch signifikant ($p < 0,05$) höher. Die bestrahlten Tiere (Gruppe III) zeigten dagegen eine deutliche Zunahme der Monozytenzahl (um fast 50%).

Auffällig war zudem, dass die Zahl der Retikulozyten in den Gruppen, welche EPT erhielten (II, IV) deutlich anstieg, während sie in der Kontrollgruppe (I) und der Gruppe der bestrahlten Tiere (III) abnahm.

Ein Vergleich der *chemisch-klinischen Daten* ließ bei EPT-behandelten Ratten eine Abnahme des Cholesterin-, Triglyzerid- sowie Glucose-Gehaltes des Blutes (Gruppe II und IV) erkennen, wobei die Änderung der Triglyzeride in Gruppe II und die Änderung des Glucosespiegels in Gruppe III statistisch signifikant ($p < 0,05$) waren. Die Gruppe der allein bestrahlten Tiere (Gruppe III) zeigte eine deutliche Zunahme der Blutharnstoff (BU) – Konzentration. Auffällig ist zudem, dass in allen Gruppen der Bilirubin-Wert stark gesunken ist.

4. Diskussion

4.1 Bisherige Erfahrungen mit Echinacea Extrakten

4.1.1 Präklinik

In einer Studie mit 49 männlichen Wistar-Ratten wurde in einer vorausgehenden Arbeit in der Zentralen Tierexperimentellen Abteilung der Universität Münster die Wirkung von EPT (aar® vir) auf das sekundäre lymphatische System untersucht [3]. Über einen Zeitraum von 14 Tagen wurde den Tieren täglich einmal eine EPT-Extrakt suspension oral verabreicht. Nach dieser Zeit konnte eine eindeutige immunologisch stimulierende Wirkung von EPT auf Milz und mesenteriale Lymphknoten festgestellt werden. Histologisch wie auch histometrisch war eine deutliche Erhöhung der Lymphozytenzahl in den Follikelzentren, den Marginalzonen und der periarteriellen lymphatischen Scheide (PALS) unter Erhaltung der jeweils charakteristischen Mikroarchitektur zu beobachten (siehe Abb. 38, 39).



Abb. 38: Milz, unbehandelte Kontrolle

Milzfollikel mit Zentralarterie rechts im Bild; Dünnschnittpräparat Hämatoxylin

Eosin-Färbung HE Dünnschnittpräparat (240 x); Quelle: [3]

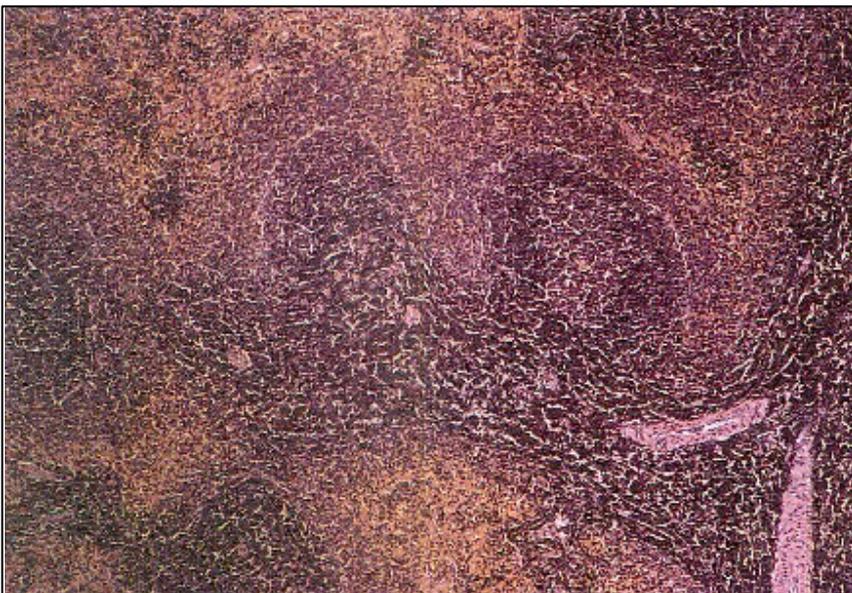


Abb. 39: Nach Behandlung mit EPT

Milzfollikel, Zellzahl nach EPT-Gabe deutlich erhöht, stärkere basophile Färbung
aufgrund der erhöhten Chromatinmenge; HE-Dünnschnittpräparat (240 x).

Quelle: [3]

Diese Ergebnisse lassen den Schluss zu, dass es sich hierbei um eine Hyperplasie im Sinne einer funktionellen Anpassung handelt, die durch die immunologisch stimulierende Wirkung von EPT hervorgerufen wird, woraus eine gesteigerte Immunabwehrfähigkeit resultiert.

In derselben Untersuchung wurde den Ratten - ebenfalls über einen Zeitraum von 14 Tagen – EPT zusammen mit dem Zytostatikum Cyclophosphamid, dessen immunsuppressive Nebenwirkung aus klinischen Studien bekannt ist, peroral verabreicht. Dies führte makroskopisch zu den bekannten atrophischen Auswirkungen auch in den lymphatischen Organen. Die mikromorphologische Untersuchung zeigte jedoch eine deutlich verbesserte Mikroarchitektur von Follikelzentren, Marginalzonen und PALS in der Milz. In mesenterialen Lymphknoten waren mikromorphologisch ebenfalls deutliche Anzeichen einer Regeneration und Wiederbesiedlung der parakortikalen Zone sowie der Markzone mit intakten lymphatischen Zellen zu erkennen (Abb. 40, 41).



Abb. 40: Nach Behandlung mit Cyclophosphamid

Milzfollikel mit Zentralarterie, deutliche Atrophie, zerstörte Mikroarchitektur mit Erythrozyteneinwanderung; HE-Dünnschnittpräparat (240 x)

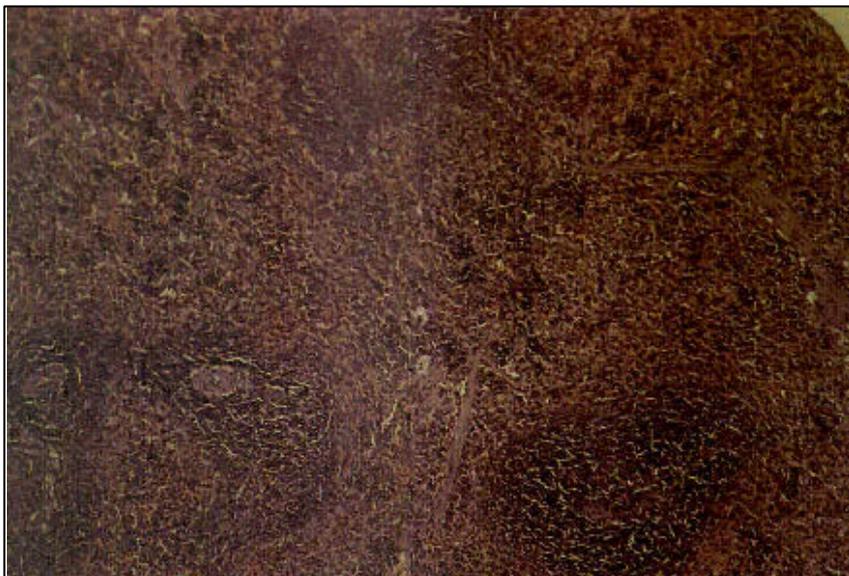


Abb. 41: Nach Behandlung mit Cyclophosphamid und EPT

Milzfollikel mit Zentralarterie, deutliche verringerte Atrophie, verbesserte Mikroarchitektur durch regenerative Proliferation; HE-Dünnschnittpräparat (240 x)

Quelle: [3]

Dieser Befund wurde auf durch EPT ausgelöste proliferative Effekte im Sinne einer Regeneration zurückgeführt. Unterstützt wird diese Schlussfolgerung durch die Tatsache, dass im Bereich der Follikel, Markstränge und subkapsulären Sinus keine mitogene Proliferation von Lymphozyten nachzuweisen war.

Sun et al. [1] prüften in einer weiteren experimentellen Untersuchung den Einfluss von *EPT* nach oraler Applikation auf hämatopoetische und immunkompetente Zellreihen in der Milz und im Knochenmark von Mäusen. Hierbei konnte eine signifikante Zunahme der Anzahl der Natürlichen Killerzellen und der Monozyten beobachtet werden. Beide Zellformen sind Mediatoren der unspezifischen Immunität und zeigen zudem deutliche zytolytische Effekte gegen virustragende Zellen.

Positive immunbiologische und antivirale Effekte von EPT stellten auch Beuscher et al. [36] fest. Neben einer Steigerung der Proliferation von Mäusemilzzellen konnten deutlich erhöhte bzw. positiv beeinflusste Serumspiegel der Interleukine (IL) 1 und 6 nachgewiesen werden. *In vitro* bewirkte der Extrakt zusätzlich die verstärkte Freisetzung von IgM, TNF α und IFN α und β . Die antivirale Aktivität des *Echinacea pallida*-Extraktes gegen Herpes-simplex-Virus Typ 1 (HSV1) wurde in einem Plaquereduktionsassay nachgewiesen. Die Anzahl der Plaques konnte dabei dosisabhängig bis maximal 100 % reduziert werden.

Aus neueren Daten geht hervor, dass Echinacea-Extrakte zudem eine quantitative und funktionelle Stimulation von NK-Zellen bewirken können. Im Tiermodell der alternden Ratte konnte der altersbedingte Rückgang der NK-Zellen durch eine 14-tägige Gabe von Echinacea-Extrakt soweit ausgeglichen werden, dass der NK-Zellstatus anschließend mit dem eines juvenilen Tieres vergleichbar war [19]. Die altersabhängige Verringerung der NK-Zellen wird von den Autoren auch mit dem häufigeren Auftreten von Tumoren im Alter in Verbindung gebracht, da die Abwehr von neoplastisch veränderten Zellen im wesentlichen von diesem Zelltyp abhängig ist.

4.1.2 Klinik

In einer randomisierten placebokontrollierten klinischen Doppelblindstudie wurden 160 Patienten mit grippalem Infekt einbezogen [37], [38]. Überprüft wurden die Zielkriterien „Verkürzung der Krankheitsdauer“ und „Beseitigung der Symptome Husten und Schnupfen“. Die Verumgruppe (n = 80) erhielt über die Dauer von 8 bis 10 Tagen einen alkoholisch-wässrigen Wurzelextrakt aus *Echinacea pallida* (900 mg/Tag). Der statistische Vergleich zwischen den Behandlungsgruppen berücksichtigte auch den Unterschied hinsichtlich der Art der Infektion (bakteriell oder viral). Symptome und Befunde wie Schnupfen, Schwächegefühl, Glieder- und Kopfschmerzen besserten sich im Vergleich zur Placebogruppe in klinisch relevanter und statistisch signifikanter Weise (siehe Abb. 42). Die stärksten Effekte wurden bei Patienten mit viralen Infekten erzielt ($p < 0,0001$), was auf eine Induktion der T-Zell-vermittelten Immunreaktionen hinweist.

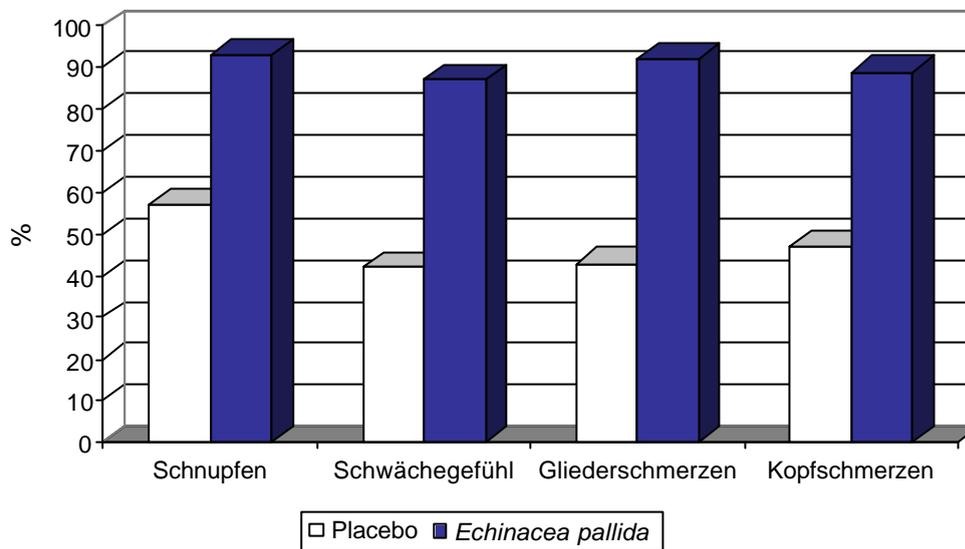


Abb.42 : Prozentuale Linderung klinischer Symptome in der *Echinacea*-Gruppe im Vergleich zu Placebo in einer randomisierten placebokontrollierten klinischen Doppelblindstudie [37])

Die Krankheitsdauer in der Verumgruppe der viral infizierten Patienten in dieser Studie nahm von 13 auf 9 Tage ab, die der bakteriell infizierten von 13 auf 10 Tage. *Echinacea pallida*-Wurzelextrakt wurde gut vertragen und zeigte keine unerwünschten Nebenwirkungen.

In einer weiteren placebokontrollierten Doppelblindstudie, in der 100 Patienten mit akuter Atemwegserkrankung untersucht wurden, erhielt die Verumgruppe über sechs Tage ein *Echinacea angustifolia*-haltiges Präparat [1]. Die Dosierung betrug in den ersten beiden Tagen 30 ml und ab dem dritten Tag 15 ml. Im Vergleich zur Placebogruppe konnten die Symptome Halsschmerzen, Nasenfluss und Husten sowie Rachenrötung signifikant gebessert werden ($p < 0,1$).

Auch Vorberg [39] beobachtete in einer placebokontrollierten Doppelblindstudie mit gleicher Medikation und einem vergleichbaren Patientenkollektiv ($n = 100$) am 3. und 8. Behandlungstag eine signifikante Besserung der Symptome gegenüber der Placebogruppe. Am deutlichsten sprachen die Symptome Halsschmerzen ($p < 0,001$), Schluckbeschwerden ($p < 0,001$) und Rachenrötung ($p < 0,001$) auf die Behandlung an.

In einer Studie (durchgeführt in einer Allgemeinarztpraxis) wurden 9 Patienten mit rezidivierenden, oft chronischen grippalen Infekten, Rhino-Pharyngo-Bronchitiden und Sinusitis untersucht [40]. Die Patienten erhielten 900 mg EPT täglich. Am 1., 4. und 10. Tag fand eine ärztliche Untersuchung statt. Die Therapie mit dem

Echinacea pallida-Wurzelextrakt hatte bei Patienten mit rezidivierenden, oft chronisch oder subchronisch verlaufenden Infekten mit den vorherrschenden Krankheitsbildern von Rhino-Pharyngo-Bronchitiden eine deutliche klinische Verbesserung zur Folge. Der Schweregrad und die Häufigkeit von Rezidiven nach einer Intervallbehandlung mit aar[®] vir führte im Vergleich zu zurückliegenden Therapieverläufen derselben Patienten zu:

- einer Reduzierung der Begleitsymptome wie Schwächegefühl, Kopf-, Glieder-, Muskel- und Halsschmerzen, Schluckbeschwerden, Ohrenscherzen
- einer deutlichen Verminderung der Anfälligkeit gegenüber grippalen Infekten und somit zu einem Rückgang der Häufigkeit bestimmter Rezidive/Jahr
- eine Verkürzung der durchschnittlichen Krankheitsdauer von Rhino-Pharyngo-Bronchitiden von 9,5 auf 5,25 Tage.

In einer weiteren klinischen Studie (ebenfalls durchgeführt in einer Allgemeinarztpraxis) wurde die Wirksamkeit von EPT hinsichtlich der Beeinflussung von Häufigkeit und Schwere bei rezidivierenden Herpes simplex-Erkrankungen untersucht [41]. Vor Einschluss in die Studie erkrankten die 12 teilnehmenden Patienten durchschnittlich 3,6 mal pro Jahr an Herpes simplex, wobei die Erkrankung jeweils 10 Tage pro Jahr dauerte.

Die durchschnittliche Krankheitsdauer betrug während der Behandlung mit aar[®] vir (900 mg täglich) im Gegensatz zum üblichen Krankheitsverlauf nur 5 anstatt

10 Tage bis zur Abheilung der Herpes-Läsionen. Darüber hinaus wurde bei allen Patienten eine deutlich reduzierte Ausprägung der Symptome bezüglich Juckreiz, Bläschenbildung, Schwellung und Schmerzintensität festgestellt. Unterschiede im Behandlungserfolg bei Patienten mit Herpes labialis und Herpes genitalis waren dabei nicht erkennbar. Hinsichtlich der Beeinflussung der Rezidivhäufigkeit/Jahr war ebenfalls ein deutlicher Erfolg festzustellen: Durchschnittlich sank die Rezidivrate auf 1,35 Rezidive/Jahr. 8 Patienten blieben nach der Therapie mit EPT sogar länger als 6 Monate rezidivfrei.

Eine bisher noch nicht publizierte retrospektive Auswertung der zellulären Immunprofile von drei Tumorpatientinnen [42] (Eine Patientin mit Mammakarzinom, eine Patientin mit Kolonkarzinom und eine Patientin mit Adenokarzinom des Rektums), welche prä-sowie postoperativ sowie z.T. während der Strahlen- (Mamma-Ca) und Chemotherapie 600-900 mg EPT/die erhielten, zeigte ebenfalls eine Zunahme von immunkompetenten Zellen (T- und B-Zellen), wie in Tab.11 zu sehen ist. Diese Einzelfallbeobachtungen fanden zwar nicht im Rahmen einer kontrollierten klinischen Studie statt, weisen jedoch auf eine individuelle Beeinflussung der Immunlage sowie eine Verbesserung der Befindlichkeit hin, welche unter den Bedingungen der Therapien eher ungewöhnlich erscheinen. Bei einer Patientin (Pat.1) konnte zudem eine Gewichtszunahme, sowie eine Reduktion der Anzahl grippaler Infekte festgestellt werden.

Pat.Nr.	1	2	3
Befund	Ablatio Mamma re, 11/92, 20 x Radiatio	Kolon-Ca, Zustand nach Resektion	Adenokarzinom des Rektums, Zustand nach Rektosigmoid-resektion. Post-OP 12 Zyklen 5-FU 780mg / Folinsäure 175 mg
Dosierung EPT, Beobachtungszeitraum	600 mg/d, 2,5 Monate post Radiatio	900 mg/d, 9 Monate, prä- und post- operativ	900 mg/d 1,5 Monate, während Chemotherapie
Thrombozyten	+ 3 %	-17 %	+ 16 %
Leukozyten	+ 26 %	+ 29%	- 9 %
Lymphozyten	+ 50 %	+ 26 %	- 3%
Monozyten	- 5 %	+ 17%	- 47%
Granulozyten	+ 20 %	+ 32 %	- 11 %
T-Lymphozyten	+ 33 %	+ 21%	+ 20%
B-Lymphozyten	+150%	+ 39 %	+ 29 %
Aktivierte T-Zellen	- 11 %	- 8 %	- 29 %
T-Helfer-Zellen	+26 %	+ 35 %	+ 20 %
T-Suppressor-Z.	+ 37 %	+ 13 %	- 25 %
NK-Zellen	+ 60 %	+ 39 %	- 49 %
Zytotoxische T-Zellen	- 33 %	+ 60 %	+ 20 %

Tab. 11: Prozentuale Veränderungen von Immunparametern nach Gabe von EPT. Einzelfallbeobachtungen bei 3 Tumorpatientinnen [42].

4.2 Diskussion der Ergebnisse

4.2.1 Diskussion der *in vitro* Ergebnisse

Ein direkter, dosisabhängiger zytostatischer oder zytozider Effekt von EPT auf die W256-Zellen konnte im Rahmen der hier vorliegenden *in vitro*-Versuche nicht nachgewiesen werden. Das Wachstum der W256-Zellen sowie der Zellzyklus wurden *in vitro* durch unterschiedliche Dosen von EPT -im Gegensatz zur Röntgenbestrahlung oder der Zugabe von zytoziden bzw. Apoptose-induzierenden Substanzen wie Betulinsäure [43] nicht oder nicht-messbar beeinflusst (s. Abb.19-21). Dieses Ergebnis stimmt auch mit den bisherigen Daten zur Toxizität von Echinacea-Extrakten überein, da bisher in keinem *in vitro*- oder *in vivo*- Versuch ein direktes zytotoxisches oder genotoxisches Potential festgestellt werden konnte [1]. Auf der anderen Seite sind aus der Literatur aber auch keine proliferationsfördernden Effekte bekannt, die möglicherweise mit einer Wachstumsbeschleunigung von Tumorzellen in Verbindung stehen [44].

4.2.2 Diskussion der *in vivo* Ergebnisse

Der auffälligste *in vivo* Parameter in Bezug auf den klinischen Gesamteindruck war die Zunahme bzw. die Beibehaltung des Gewichts der Versuchstiere in den Gruppen, welche EPT erhielten (Gruppe II und IV). Dagegen verloren die Tiere in der Gruppe, welche Bestrahlung erhielten signifikant ($p < 0,05$) an Körpergewicht. Dieser Effekt weist auf eine mögliche Hemmung der tumorinduzierten Kachexie hin. Diese Form der tumorbedingten Gewichtsabnahme ist generell beim Walker-Sarkom bekannt und wird auch als Tiermodell für eine experimentelle Induktion dieser Art der Kachexie in Tierstudien verwendet [45]. Tumorinduzierte Kachexie ist ein wesentlicher Faktor der Mortalität und Morbidität bei Krebspatienten. Sie betrifft etwa die Hälfte der Patienten. Dies variiert jedoch mit dem Tumortyp [46]. Dieser tumorassoziierte Gewichtsverlust betrifft nicht nur das Fett-, sondern auch das Muskelgewebe und ist selbst durch hochkalorische Diäten nicht ausreichend behandelbar. Aufgrund verschiedener Faktoren, darunter dem Einfluss von Zytokinen kommt es hauptsächlich zu einer biologisch nicht notwendigen Lipolyse des Fettgewebes und zum Abbau von Proteinen im Skelettmuskelgewebe, wobei auch erhöhte Triglyceridwerte festgestellt werden konnten. Einer der Faktoren, welche als Auslöser diskutiert werden, ist $\text{TNF}\alpha$, welcher einen gesteigerten Abbau von Fettgewebe induziert. Des Weiteren wurden in Tiermodellen und in Patienten deutlich erniedrigte Insulinspiegel festgestellt. Therapeutische Ansätze zur Behandlung dieser Form der Auszehrung sind die Gabe von Antikörpern gegen $\text{TNF}\alpha$ sowie Eicosapentaensäure, welche den Abbau von Proteinen im

Muskel verringern kann. Tumorassoziierte Kachexie hat ebenfalls eine immunologische Komponente [46]. Möglicherweise greift EPT entweder in das immunologische Geschehen ein, oder es existiert ein ähnlicher Mechanismus, der dem der Eicosapentaensäure nahe kommt. Da langkettige mehrfach ungesättigte Kohlenwasserstoff-Verbindungen (Polyacetylene, s.1.6.2) in *Echinacea pallida* vorkommen, ist diese Erklärung durchaus einleuchtend. Zudem fällt auf, dass bei EPT-behandelten Tieren die Glucose- sowie die Triglyzeridwerte im Blut signifikant gesenkt wurden, was wiederum auf eine mögliche Beeinflussung der Insulin-abhängigen Prozesse (Glucose) sowie der oben beschriebenen Lipolyse (Triglyzeride) hinweist.

Die geringere Angehrate der injizierten Tumorzellen in der EPT-Behandlungsgruppe (II) ist ebenfalls auffällig, jedoch benötigt man eine deutlich höhere Anzahl Tiere, um eine statistisch gesicherte Aussage hiervon ableiten zu können. Ähnliche Resultate wurden bereits in den 50er Jahren in Screening-Versuchen an Ratten mit Walker-Sarkom, welche Echinacea-Extrakt erhielten beobachtet, ohne sie jedoch weiter zu deuten [6]. Betrachtet man die niedrige Angehrate der Tumorzellen in der EPT-Gruppe im Rahmen der in der Literatur beschriebenen Versuche, bestätigen die vorliegenden Ergebnisse die Literaturdaten.

Die hämatologischen Befunde der Tiere, welche EPT erhalten haben, können als eine Verstärkung der unspezifischen Immunkompetenz interpretiert werden.

Die oben beschriebenen immunologischen Effekte von EPT konnten bereits zuvor an gesunden Ratten histologisch gezeigt werden [3], wobei eine orale Gabe von EPT im Thymus der behandelten Tiere eine Zunahme lymphoblastischer Zellelemente in Kortex und Medulla bewirkte und im mesenterialen Lymphknoten eine Zunahme lymphozytärer Zellelemente in den T-Lymphozytenarealen sowie in den Marksträngen induzierte.

Hinweise auf degenerative oder sonstige toxische Zellschäden wurden in den untersuchten Organen in der vorliegenden Untersuchung sowie in vorangegangenen Studien nach 14 Tagen nicht beobachtet, ebenso fehlten Anzeichen einer pathophysiologischen mitotischen Aktivität in den lymphatischen Geweben.

Insbesondere die erhöhten Werte der CD8-positiven (NK)-Zellen in den EPT-Gruppen (II, IV) lassen in der vorliegenden Studie ebenfalls auf eine positive Beeinflussung der zellulären Abwehr schließen.

Die Erhöhung der Retikulozytenzahl im peripheren Blut der Kontrollgruppe (I) und in der Gruppe der bestrahlten Ratten (III) kann möglicherweise als gesteigerte Erythropoese oder verzögerte Reifung der Erythrozyten aufgrund des schnell wachsenden Tumors interpretiert werden. Diese Veränderung trat bei den EPT-behandelten Tieren nicht auf.

Die Veränderungen der klinisch-chemischen Werte nach EPT-Gabe (Senkung des Cholesterin- sowie des Triglyzerid-Spiegels) ist auch von anderen Korbblütlern (Fam. *Asteraceae*) bekannt und wird auch therapeutisch genutzt, wie

zum Beispiel bei Artischocke oder Mariendistel [16], während die signifikante Abnahme des Glucosespiegels unter EPT eher auffällig ist. Insgesamt sorgt die Verbesserung des Fettstoffwechsels sowie ein niedrigerer Glucosespiegel für ein deutlich verbessertes klinisches Allgemeinbild, jedoch ist die Übertragbarkeit des letzteren Ergebnisses auf den Menschen noch zu prüfen. Die Senkung des Glucosespiegels lässt jedoch auch möglicherweise auf eine positive Beeinflussung des Insulinstoffwechsels schließen, was zudem im Geschehen der oben diskutierten tumorassoziierten Kachexie eine Rolle spielen kann, da bei kachektischen Ratten mit Walker Sarkom auch ein erniedrigter Insulinspiegel nachgewiesen werden konnte [46].

Der deutliche Anstieg der Harnstoff-Konzentration in Gruppe III (Bestrahlung) hängt vermutlich mit dem beschleunigten Abbau von Tumorsubstanz nach der Bestrahlung zusammen, da besonders die Abbauprodukte aus Purinen die Niere belasten und so zu einem erhöhten Harnstoffspiegel führen können. Eine weitere Erklärung wäre eine verminderte Flüssigkeitsaufnahme, welche mit der tumorinduzierten Gewichtsabnahme einhergehen kann und sich auch in den erhöhten Werten der Elektrolyte in dieser Gruppe niederschlägt.

5 Wertung und Schlussfolgerungen

Zusammenfassend ergibt sich bei dem verwendeten oral verabreichten hochdosierten *Echinacea pallida* Trockenextrakt das Bild eines Immunstimulans, welches eine ausgeprägte Erhöhung der Anzahl der im Blut zirkulierenden NK-Zellen bewirkt, und damit eine positive Wirkung auf die zelluläre Abwehr hat. NK-Zellen spielen nicht nur in der Abwehr von intrazellulären Erregern (v.a. Viren), welche sich bei immungeschwächten Krebspatienten leicht vermehren können, eine wesentliche Rolle, sondern auch in der Immunantwort auf Tumorzellen [27]. Neben dem Effekt einer NK-Zellzunahme konnte bei den mit EPT behandelten Tieren im Vergleich zu den bestrahlten Tieren oder der Kontrollgruppe durchweg ein besserer Allgemeinzustand festgestellt werden, was sich vor allem in der Entwicklung des Körpergewichts sowie in der Verbesserung der klinisch-chemischen Parametern zeigte. Überträgt man die in dieser Studie gefundenen Wirkungen auf den Menschen, so kann bei Tumorpatienten, welche eine Radiotherapie erhalten, mit einer verbesserten Prognose gerechnet werden, worauf die den obigen Beschreibungen von Einzelfällen hinweisen. Aufgrund der Ergebnisse dieser Arbeit ist es wünschenswert, dass in Zukunft auch kontrollierte klinische Studien mit definierten EPT-Formulierungen an Patienten durchgeführt werden. Dies erscheint vor allem notwendig, da bereits jetzt unterschiedlichste Präparate aus *Echinacea species* zu den meistverwendeten Mitteln in der Selbstmedikation bei Tumorpatienten gehören [47].

6 Literatur

1. Bauer R., Wagner H.: Echinacea: Handbuch für Ärzte, Apotheker und andere Naturwissenschaftler. Wiss.Verl.-Ges. Stuttgart 1990 (Übersichtsarbeit)
2. Maher, D.W., Lieschke, G.J. , Green M. et al. : Filgrastim in patients with chemotherapy-induced febrile neutropenia – a double-blind, placebo-controlled trial. Ann. Intern. Med. 1994; 492-501
3. Fröhlke ECM: Aktionen von *Echinacea* und Interaktionen mit Cynara und Cyclophosphamid unter dem Aspekt einer morphofunktionellen Stimulation des sekundären lymphatischen Organsystems der Ratte. Dissertation. Westfälische Wilhelms-Universität Münster 1996
4. Burger, R. A. et al.: Echinacea – induced cytokine production by human macrophages. Int.-J-Immunopharmacol. 1997, 19 (7) : 371 – 379
5. Cancer Chemotherapy National Service Center: Protocols for Screening Chemical Agents and Natural Products against Animal Tumors and other Biological Systems, Cancer Chemotherapy Reports No.25, December 1962, Drug Evaluation Branch, National Cancer Institute
6. Voaden J.V, Jacobson M.: Tumor Inhibitors. 3.Identification and Synthesis of an Oncolytic Hydrocarbon from American Coneflower Roots. Journal of Medicinal Chemistry 1972; 15 (6) : 619-623
7. Lersch C.et al: Stimulation of the immune response in outpatients with hepatocellular carcinomas by low doses of cyclophosphamide (LDCY) , echinacea purpurea extracts (echinacin) and thymostimulin, Arch.Geschwulstforsch 1990; 60 (5): 379-383
8. Melchart D. et al: Polysaccharides from Echinacea purpurea herba Cell Cultures to Counteract Undesired Effects of Chemotherapy – a Pilot Study. Phytother. Research 2002, 16: 138-142
9. Schumacher, A. und Friedberg, K.D.: Untersuchungen zur Wirkung von Echinacea angustifolia auf die unspezifische zelluläre Immunantwort der Maus. Arzneim.-Forsch./Drug Res. 1991;41:141-147
10. Wedel, W.R.: An introduction to Pawnee archeology, Smithsonian Institution, Bureau of American Ethnology, Bulletin 112, 59 (1 936)
11. Gilmore, M.R.: A study in the ethnobotany of the Omaha indians, Collections of the Nebraska State Historical Society 1913, 17, 3: 14-357
12. Gilmore, M.R.: Use of plants by the indians of the Missouri river region, Smithsonian Institution: Bureau of American Ethnology 1919 :Ann. Rep. 33

13. Gronovius, J.F.: Flora Virginica, Leiden: 1762 : 130
14. Schöpf, J.D.: Mateia medica americana potissimum regni vegetabilis, Erlangen, 1787: S.127
15. Lloyd, J.U.: History of Echinacea angustifolia, Pharm. Review 1904, 22: 9
16. Hager: Hänsel, R.; Keller, K.; Rimpler, H.; Schneider, G.: Hagers Handbuch der Pharmazeutischen Praxis. Bd. 5: Drogen E – O, Springer-Verlag, Heidelberg, 1993
1 - 34,
17. Zinserling, V. A. et al.: Generalized HSV-1 Infection in the new-born Rabbits. poster presentation. XVI European congress of Pathology, Maastricht, 31. August – 04. Sept. 1997
18. Luettig B., Wagner H. et al.: Macrophage Activation by the Polysaccharide Arabinogalactan Isolated From Plant Cell Cultures of Echinacea purpurea, J.Natl.Cancer Inst 1989; 81 (9): 669-675
19. Currier N.L., Miller S.C: Natural killer cells from aging mice treated with extracts from Echinacea purpurea are quantitatively and functionally rejuvenated. Experimental Gerontology 2000 ; 35: 627-639
20. Xiao-Hu Gan et al.: Mechanism of activation of human peripheral blood NK cells at the single cell level by Echinacea water soluble extracts: recruitment of lymphocyte-target conjugates and killer-cells and activation of programming for lysis. Int. Immunopharmacol. 2003; 3: 811-824
21. Paranich, A.V. et al: Effect of supposed radioprotectors on oxidation-reduction of vitamine e in the tissue of irradiated rats, Rad.Biol.Radioecol.1993; 33(5): 653-657
22. Bauer R, Remiger P, Jurcic K, Wagner H: Beeinflussung der Phagozytoseaktivität durch *Echinacea*-Extrakte. Z Phytoth. 1989; 10: 43-48 (3)
23. Elsasser-Beile U. et al.: Cytokine production in leukocyte cultures during therapy with Echinacea extract, J. Clin. Lab. Anal. 1996; 10 (6) : 441-445
24. Roitt, Ivan M.: Leitfaden der Immunologie; 4.Aufl. Blackwell Wissenschaftlicher Verlag, Berlin 1993
25. Houghton A.N.: Cancer Antigens: Immune recognition of self and altered self. J.exp.Med. 1994; 180
26. Old, L.J. : Cancer immunology, the search for specificity . Cancer Res. 1981, 41: 361-375)

27. Janeway Charles A, Travers Paul: Immunologie. Spektrum Akademischer Verlag , Heidelberg, 2. Aufl. 1997
28. Peter/ Pichler, Klinische Immunologie, 2. Aufl. 1996, Urbahn & Schwarzenberg, München,Wien, Baltimore
29. Aufbereitungsmonographie der Kommission E des Bundesgesundheitsamtes (BGA): *Echinaceae pallidae radix* (*Echinacea-pallida*-Wurzel). Bundesanzeiger Nr. 162 vom 28.2.1992 [1]
30. Ulich T. R., del Castillo J.: The hematopoietic and mature blood cells of the rat: their morphology and the kinetics of circulating leukocytes in control rats, *Exp. Hematol.* 1991 Aug;19(7):639-48.
31. Klinger, M. M, et al.. Body weight and composition in the Sprague Dawley rat: comparison of three outbred sources. *Lab. Anim. Sci.* 1996; 46(1):67-70.
32. Fogt F. et al. Flow cytometric Measurement of Cell Cycle Kinetics in Rat Walker-256 Carcinoma following *in vivo* and *in vitro* Pulse Labelling with Bromodeoxyuridine; *Cytometry* 1991, 12:33-41
33. Hull R.N. et al: The Adaptation and Maintenance of Mammalian Cells to continuous Growth in Tissue Culture: *Anatomical Record* 1956; 124:490
34. Arvelo, F. et al.: Establishment and Characterization of Cell Lines from the Walker Carcinoma 256 able to grow in Suspension Culture and deficient in Thymidine Kinase. *In vitro* 1984 ; 20 (7) : 549-565 (Übersichtsarbeit)
35. Pascher E., N. Wedemeyer, B. Greve, E. Severin, W. Göhde: Establishing flow cytometric techniques for quick and reliable determination of individual radiosensitivity, *Cytometry*, Supplement 11, 120-121, 2002
36. Beuscher N, Bodinet C, Willigmann I, Egert D: Immunmodulierende Eigenschaften von Wurzelextrakten verschiedener *Echinacea*-Arten. *Z Phytother* 1995;16: 157-166 [4]
37. Dorn M: Milderung grippaler Effekte durch ein pflanzliches Immunstimulans. *Natur Ganzheitsmedizin* 1989; 2: 314-319
38. Bräunig B, Knick E: Therapeutische Erfahrungen mit *Echinaceae pallidae* bei grippalen Infekten. *Naturheilpraxis* 1993; 1: 72-75
39. Vorberg G, Schneider B: Pflanzliches Immunstimulans verkürzt grippalen Infekt. Doppelblindstudie belegt die Steigerung der unspezifischen Infektabwehr. *Ärztliche Forschung* 1989; 36: 3-8

40. Nase D et al.: Untersuchung zur Beeinflussung „grippaler Infekte“ sowie chronische Verlaufsformen der Rhino-Pharyngo-Bronchitis wie auch Sinusitis durch Echinacea aar unter dem besonderen Aspekt der Rezidivhäufigkeit. Interner Bericht aar pharma o. J.
41. Nase D et al.: Untersuchung der Wirksamkeit von Echinacea aar bei Herpes simplex Virus Erkrankungen unter dem besonderen Aspekt der Rezidivhäufigkeit. Interner Bericht aar pharma o. J.
42. Ruepp, M.O.: Untersuchungen zur immunaktiven Wirkung von echinacea aar: Erste Hinweise auf eine therapeutisch verwertbare Wirkung von echinacea aar auf das zelluläre Immunsystem auf der Basis der Phänotypisierung mononukläerer Zellen (Vorläufige Mitteilung). aar pharma 11/1993
43. Pisha E. et al.: Discovery of betulinic acid as a selective inhibitor of human melanoma that functions by induction of apoptosis. Nat. Med. 1995 1 (10) : 1046 – 1051
44. Wagner H. : Stellungnahmen zum „Alarm-Telegramm“, Deutsche Apotheker Zeitung 1989; 129 (21) 1105-1107
45. Machado AP: Adipose tissue in Walker 256 tumour-induced cachexia: possible association between decreased leptin concentration and mononuclear cell infiltration Cell Tissue Res. 2004 Dec;318(3):503-14. Epub 2004 Dec.
46. Tisdale MJ.: Pathogenesis of cancer cachexia, J Support Oncol. 2003 Sep-Oct;1(3):159-68.
47. Izzo AA, Ernst, E.: Interactions between Herbal Medicines and Prescribed Drugs. Drugs 2001; 61 (15); 2163 – 2175



Bezirksregierung Münster

Bezirksregierung Münster, 48123 Münster

Gegen Empfangsbekanntnis!

Herrn

Prof. Dr. Wolfgang Göhde
Institut für Strahlenbiologie der
Westf. Wilhelms-Universität
Robert-Koch-Str. 43
48149 Münster

Dienstgebäude
Domplatz 1-3
Telefon: (0251) 411-0
Durchwahl: 2110
Zimmer: 431
Frau Möllers

Aktenzeichen
23.0835.1.0 (G 4/99)

8 . Februar 1999

Betr.: Tierschutz;

hier: Durchführung von Versuchen an Wirbeltieren

Bezug: Ihr Antrag vom 11.01.1999

Genehmigungsbescheid:

Sehr geehrter Herr Prof. Dr. Göhde,

gemäß § 8 Tierschutzgesetz (TierSchG) i.d.F. der Bekanntmachung vom 25. Mai 1998 (BGB1. I S. 1105) wird Ihnen die Genehmigung zur Durchführung nachstehenden Versuchsvorhabens erteilt:

Prüfung der adjuvanten Wirkung von Echinacea pallida bei der Radiotherapie eines experimentell induzierten subcutanen Sarkoms der Ratte.

Leiter des Versuchsvorhabens und sein Stellvertreter sind:

Herr Prof. Dr.
Wolfgang Göhde
Institut für Strahlenbiologie
der WWU Münster
Robert-Koch-Str. 43
48149 Münster

Frau
Dr. Ursula Hacker-Klom
Klinik und Poliklinik für
Strahlentherapie
- Radioonkologie -
der WWU Münster
Albert-Schweitzer-Straße 33
48129 Münster

Grünes Umweltschutztelefon: (0251) 411-3300

e-mail: poststelle@bezreg-muenster.nrw.de ● X-400: C=de, A=dbp, P=dvs-nrw, O=bezreg-muenster, S=poststelle ● Telefax (0251) 411-2525

Konten der Regierungshauptkasse Münster:

Landeszentralbank Niederlassung Münster BLZ: 400 000 00 Konto: 40 001 520

Westdeutsche Landesbank Girozentrale Münster BLZ: 400 500 00 Konto: 61 820

Öffentliche Verkehrsmittel - Buslinien 1 . 5 . 6 . 17 bis Haltestelle Prinzipalmarkt und 2 . 10 . 11 . 14 . 21 . 64 bis Domplatz

Diese Genehmigung gilt bis zum 28.02.2000.

Zur Durchführung des Versuchsvorhabens dürfen folgende Tiere verwendet werden:

48 Ratten.

Auflagen:

Mit dem Versuchsvorhaben darf erst nach Vorliegen dieser Genehmigung begonnen werden.

Sofern der Leiter des Versuchsvorhabens oder sein Stellvertreter wechselt, ist mir dieser Wechsel unverzüglich anzuzeigen.

Diese Genehmigung wird zurückgenommen, wenn bei der Erteilung die Voraussetzungen nach § 8 Abs. 3 TierSchG nicht gegeben waren.

Sie wird widerrufen, wenn die Voraussetzungen nach § 8 Abs. 3 TierSchG nicht mehr gegeben sind und dem Mangel nicht innerhalb einer von mir zu bestimmenden Frist abgeholfen wird; sie kann widerrufen werden, wenn ihre Bedingungen und Auflagen nicht erfüllt werden oder den Vorschriften des § 9 Abs. 2 TierSchG wiederholt oder grob zuwidergehandelt worden ist.

Ein Antrag auf Verlängerung der Genehmigung ist rechtzeitig vor Ablauf der Frist bei mir zu stellen.

Da das Versuchsvorhaben überwiegend im öffentlichen Interesse erfolgt, wird von der Erhebung einer Verwaltungsgebühr Abstand genommen.

Rechtsbehelfsbelehrung:

Gegen diesen Bescheid kann innerhalb eines Monats nach Bekanntgabe Widerspruch erhoben werden. Der Widerspruch ist bei mir unter der oben genannten Anschrift schriftlich oder zur Niederschrift einzureichen.

Sollte die Frist durch das Verschulden eines von Ihnen Bevollmächtigten versäumt werden, so würde dessen Verschulden Ihnen zugerechnet werden.

Mit freundlichen Grüßen

Im Auftrag



Dr. Piontkowski