

**Aus der Universitätshautklinik  
der Albert-Ludwigs-Universität Freiburg i.Br.  
(Direktorin: Prof. Dr. L. Bruckner-Tuderman)**



***In vitro*-Untersuchungen zu Inhaltsstoffen von  
*Hypericum perforatum L.***

***sowie***

***Topische Anwendung von Hypericum perforatum-  
Extrakten bei der Atopischen Dermatitis***

Inaugural-Dissertation  
zur Erlangung des Medizinischen Doktorgrades  
der Albert-Ludwigs-Universität Freiburg i.Br.

vorgelegt im Jahre 2003  
von Svea Silja Hezel,  
geboren am 04.05.1977 in Schorndorf

Dekan: Prof. Dr. med. Josef Zentner

1. Gutachter: PD Dr. med. Dipl. Biol. Schempp

2. Gutachter: Prof. Dr. med. Runnebaum

Promotionsjahr: 2003

## A Inhaltsverzeichnis

<b>A</b>	<b>Einleitung.....</b>	<b>8</b>
1.1	Krankheitsbild Atopisches Ekzem.....	8
1.2	Pathogenese der Atopischen Dermatitis.....	10
1.3	Behandlungsmöglichkeiten der Atopischen Dermatitis.....	13
1.3.1	Klassische Therapien.....	13
1.3.2	Topische Immunmodulatoren.....	14
1.4	Botanik des Johanniskrautes ( <i>Hypericum perforatum</i> L.).....	15
1.5	Klinische Indikationen des Johanniskrautes.....	17
1.6	Phytopharmaka.....	19
1.7	Pharmakologie.....	20
1.8	Hypericin.....	21
1.9	Hyperforin.....	22
1.10	Inhaltsstoffe des Johanniskrautes.....	23
1.10.1	Flavonoide.....	24
1.10.2	Gerbstoffe.....	25
1.10.3	Pflanzensäuren.....	26
1.11	Differenzierung Apoptose und Nekrose.....	28
1.11.1	Nekrose.....	28
1.11.2	Apoptose.....	28
1.12	Caspasen.....	31
1.12.1	Caspase 3.....	31
1.12.2	Caspase 8.....	32

<b>B</b>	<b>Fragestellung.....</b>	<b>33</b>
<b>C</b>	<b>Klinischer Teil.....</b>	<b>35</b>
<b>I.</b>	<b>Probanden und Methoden.....</b>	<b>35</b>
	<b>1. Studie 1: Hausinterne Pilotstudie.....</b>	<b>35</b>
1.1	Ethikkommission.....	35
1.2	Probanden.....	36
1.3	Einschlußkriterien.....	36
1.4	Ausschlußkriterien.....	36
1.5	Prüfmedikation.....	37
1.6	Studiendesign.....	38
1.7	Flußdiagramm Studienablauf.....	39
	<b>2. Studie 2: Placebokontrollierte Studie.....</b>	<b>40</b>
1.8	Ethikkommission.....	40
1.9	Einschlußkriterien.....	40
1.10	Ausschlußkriterien.....	40
1.11	Prüfmedikation.....	42
1.12	Studiendesign.....	43
1.13	Flußdiagramm: Studienablauf.....	44
1.14	Methoden.....	45
1.15	Hauptzielkriterium.....	45

1.16	Nebenzielkriterium.....	46
1.17	Laboruntersuchungen.....	47
1.18	Statistische Methoden.....	47

## **II. Ergebnisse des klinischen Teils..... 50**

### **1. Studie 1 (Pilotstudie) ..... 50**

1.1	Tabellen und Graphiken.....	50
1.2	Photodokumentation.....	53

### **2. Studie 2 ( Placebokontrollierte Phase II-Studie) ..... 54**

2.1	Auswertungskollektive.....	54
2.2	Gründe für den Ausschluß aus den Auswertungskollektiven.....	54
2.3	Demographische Daten der Auswertungskollektive.....	55
2.4	Wirksamkeit im Halbseitenvergleich.....	56
2.5	Keimbesiedlung.....	58
2.6	Verträglichkeit und kosmetische Akzeptanz.....	58
2.7	Laborparameter.....	60
2.8	Unerwünschte Ereignisse.....	61
2.9	Photodokumentation.....	62

<b>C</b>	<b>Experimenteller Teil.....</b>	<b>63</b>
<b>I.</b>	<b>Material und Methoden.....</b>	<b>63</b>
1.	Lösungsverhalten der Johanniskrautinhaltsstoffe.....	63
2.	Bestimmung der IC 50 / Verdünnungsreihen.....	64
3.	Jurkatzelllinie.....	64
4.	Proliferationsassay.....	65
5.	3H-Thymidinproliferationsassay.....	66
6.	BrdU-Elisa.....	67
7.	Apoptoseassay.....	69
8.	Caspase-Inhibitoren.....	69
9.	Toxizitätsassay (LDH-Release).....	70
10.	Statistische Methoden.....	71
<b>II.</b>	<b>Ergebnisse - Experimenteller Teil.....</b>	<b>72</b>
<b>1.</b>	<b>In-vitro-Untersuchungen zu Johanniskrautinhaltsstoffen.....</b>	<b>72</b>
1.1	Proliferationsverhalten von Jurkatzellen durch ausgewählte, im Johanniskraut enthaltene Gerbstoffe.....	72
1.2	Proliferationsverhalten von Jurkatzellen durch ausgewählte, im Johanniskraut enthaltene Pflanzensäuren.....	73
1.3	Proliferationsverhalten von Jurkatzellen durch ausgewählte, im Johanniskraut enthaltene Flavonoide.....	75
1.4	Ausschluss einer durch Luteolin induzierten Nekrose.....	81

1.5	Caspase-vermittelte Apoptose durch Luteolin.....	82
-----	--	----

<b>E</b>	<b>Diskussion.....</b>	
----------	------------------------	--

**84**

<b>F</b>	<b>Zusammenfassung und Ausblick.....</b>	<b>100</b>
----------	--	------------

<b>G</b>	<b>Literaturverzeichnis.....</b>	<b>103</b>
----------	----------------------------------	------------

<b>H</b>	<b>Curriculum vitae und Danksagung.....</b>	
----------	---	--

**114**

# A EINLEITUNG

## 1.1 Krankheitsbild des Atopischen Ekzems

Die Atopische Dermatitis ist eine der häufigsten Hauterkrankungen mit ständig wachsender Inzidenz. Die Prävalenz unter Schulkindern wird auf 5 – 23 % geschätzt (Rothe MJ, 1996; Ruzicka T, 1997; Wütherich B, 1996), die der Allgemeinbevölkerung auf 5% (Diepgen TL, 1992).

Für das Krankheitsbild Atopisches Ekzem existieren diverse Synonyme wie Atopische Dermatitis, Neurodermitis atopica und Endogenes Ekzem. Per definitionem handelt es sich dabei um eine chronische oder chronisch-rezidivierende, erblich prädisponierte, multifaktorielle und in ihrem morphologischen Aspekt und Gesamtablauf recht verschiedenartige entzündliche Erkrankung der Haut mit starkem Juckreiz. Oft ist sie in der betreffenden Familie oder bei dem Erkrankten mit anderen atopischen Erkrankungen vom Soforttyp wie allergische Rhinitis, allergische Konjunktivitis und allergischem Asthma bronchiale vergesellschaftet. Das Risiko zu erkranken steigt mit jedem erkrankten Familienmitglied an (Voigtländer V, 1977; Diepgen TL, 1992). Bei der Ausprägung der Erkrankung spielen teils exogene Realisationsfaktoren wie Inhalationsallergene, Nahrungsmittelallergene, mikrobielle Faktoren (Bayerl Ch, 1996; Ruzicka T, 1997) sowie individuelle Faktoren wie Streß oder psychovegetative und psychosomatische Störungen eine Rolle (Buske-Kirschbaum A, 1999; Otto J, 1991). Die Manifestation beginnt meist im Kleinkindesalter mit Juckreiz, Rötung, Schuppung, Nässen und Krustenbildung v.a. an den Wangen und am behaarten Kopf (sog. Milchschorf); später in den Gelenkbeugen, im Gesicht, an Hals, Nacken und Brust. Die Haut ist insgesamt durch eine Unterfunktion der Talgdrüsen (Sebastase) und der Schweißdrüsen (Hypohidrose) glanzlos und trocken, durch Dermis- und Epidermishypertrophie verdickt, ihr



Oberflächenrelief vergrößert (Lichenifikation). Exkorationen und ekzematös-fibrotische Areale finden sich an manifest betroffenen Hautstellen. Durch verschiedene Untersuchungen an Neurodermitispatienten konnte sowohl in klinisch unauffälliger als auch in klinisch erkrankten Hautarealen gesteigerter transepidermaler Wasserverlust (TEWL) und Sebstase objektiviert werden.

Ruzick und Wütherich postulieren neben der Sebstase auch Störungen des epidermalen Lipidstoffwechsels (Delta-Desaturasedefekt), Mangel an gamma-Linolensäure und Dysregulation des autonomen Nervensystems (Ruzicka T, 1997) als anatomisch-funktionelle Krankheitsfaktoren. Verkomplizierend können bakterielle und virale Sekundärinfektionen der betroffenen Körperstellen auftreten. Die Diagnose wird hauptsächlich klinisch gestellt, da keine objektiven diagnostischen Untersuchungen existieren. Bedeutend für die Diagnose einer Atopischen Dermatitis sind Juckreiz, ein chronisches Wiederauftreten der Dermatitis, eine positive Familienanamnese für Erkrankungen des atopischen Formenkreises und die frühe Erstmanifestation der Erkrankung. Die Verteilung und der Anteil betroffener Körperoberfläche ist von grösserer Bedeutung als das Erscheinungsbild individueller Läsionen. Charakteristisch ist neben der Xerosis cutis die infraorbitale Dennie Morgan Falte, periorbitale Verdunklung, Akzenturierung des palmaren Faltenreliefs und Keratosis pilaris (follikulär-vergrößertes Hautbild im äusseren Oberarmbereich). 1980 wurden Richtlinien zur Diagnosestellung veröffentlicht, die das Vorhandensein von 3 der 4 Hauptkriterien und 3 der 23 Nebenkriterien postulieren.

Insgesamt nimmt die Häufigkeit der Erkrankungen des atopischen Formenkreises zu.

## 1.2 Pathogenese der Atopischen Dermatitis

Lange Zeit vermutete man einen polygenen Erbmodus, durch den die Disposition zur atopischen Reaktion verschiedener Systeme vererbt wird. Es gibt allerdings Hinweise dafür, dass Atopieneigung über ein mütterliches Gen weitergegeben wird, welches auf Chromosom 11 lokalisiert ist (Cookson WO, 1992). Es wurden auch Verknüpfungen mit den Chromosomen 3q21, 1q21, 17q25 und 20p berichtet. Sie liegen den bekannten Psoriasisloci sehr nahe (Lee Ya, 2000; Cookson WO, 2001). Immunologisch ist Atopie gekennzeichnet durch eine reduzierte zelluläre Immunität, fehlerhafte antikörperabhängige, zelluläre Zytotoxizität, geringere Zahl immunregulatorischer T-Zellen, hohen Serumkonzentrationen an IgE und einer hohen Inzidenz IgE-induzierter Immunreaktionen nach Antigenexposition (Cooper KD, 1983). Die Entdeckung eines IgE-Rezeptors auf hautspezifischen Langerhanszellen, die an der Antigenpräsentation hochmolekularer Aeroallergene beteiligt sind, hatte neben den bekannten Mechanismen IgE-induzierter Immunreaktionen vom Soforttyp große Relevanz für das Verständnis der Inflammationspathogenese der Atopischen Dermatitis (Bohm I, 1997).

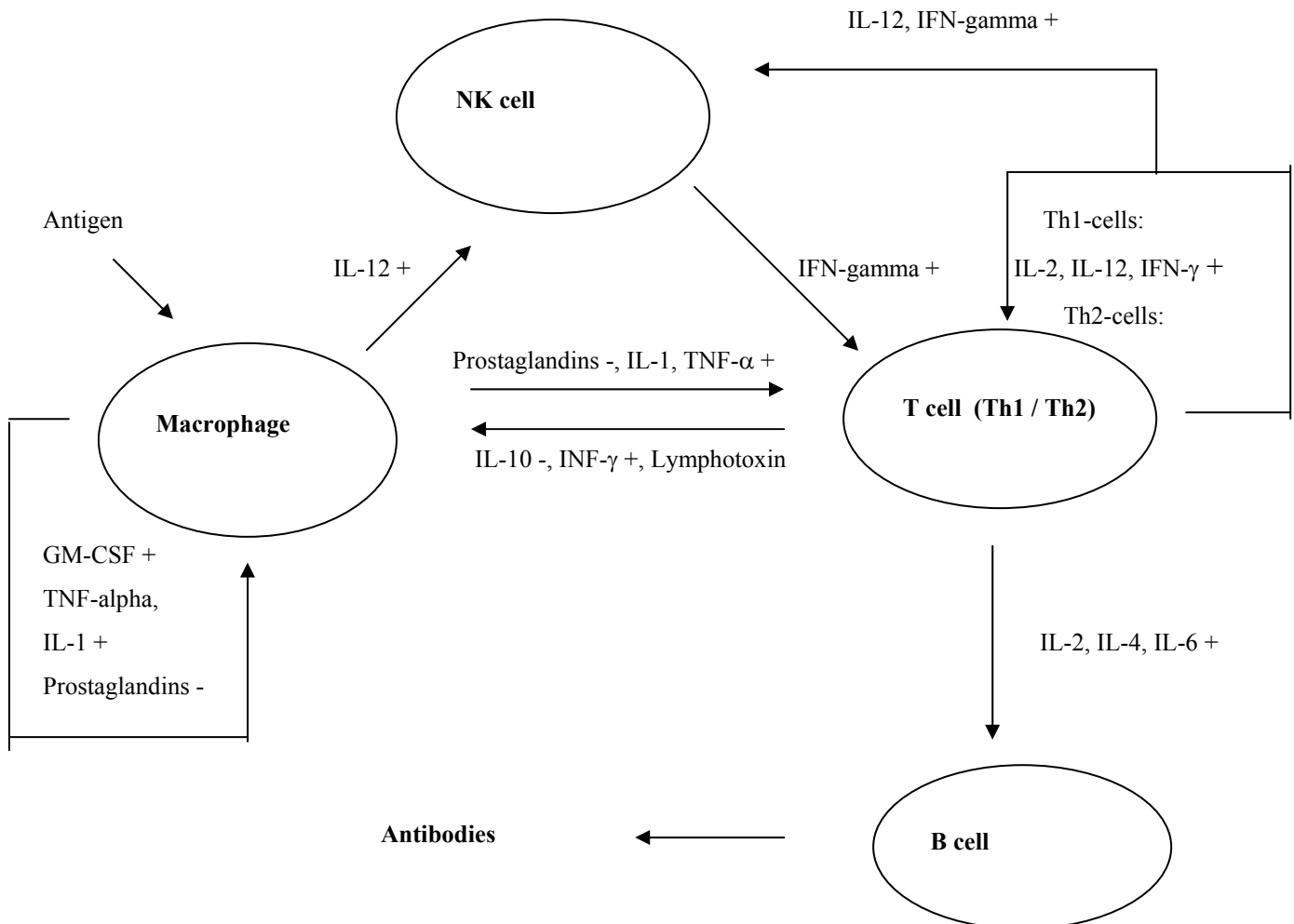
Zugrunde liegt eine Dysbalance der T-Helferzellen, eine Untergruppe reifer T-Zellen, die für die Regulation der Immunantwort des Körpers verantwortlich sind. Die beiden Haupttypen, Th1- und Th2-Zellen unterscheiden sich hauptsächlich durch die Zytokine, die sie produzieren, aber auch durch einige Oberflächenmarker. Abhängig von den Konditionen während der Antigenstimulation entwickeln sich aus unreifen T-Zellen entweder Th1- oder Th2-Zellen. Th1-Zellen generieren vor allem verzögerte Hypersensitivitätsreaktionen der zellulären Immunität. Als molekularer Marker gilt Interferon gamma (INF gamma), welches die Proliferation und Funktion von Th2-Zellen unterdrückt und die von Th1-Zellen stimuliert. Th2-Zellen produzieren Zytokine, die die IgE-Produktion induzieren („Ig class switch“ in IgG4 und IgE durch IL-4, IL-13), die Reifung eosinophiler Granulozyten fördern (Eosinophilie durch IL-5) und die Aktivierung von Th2-Zellen blockieren (IL-10) (Cooper KD, 1994). Man vermutet, dass die bei der Atopie

zugrundeliegenden zellulären Mechanismen so ablaufen, dass es bevorzugt zur Ausbildung sog. Th2-Zellen kommt. Die Th2-Induktion durch IL-4, IL-5 und IL-13 gilt somit als Schlüssel atopischer Störungen. In der Frühphase inflammatorischer Hautkrankheiten kommt es typischerweise zu einem Überwiegen von Th2-Zellen gegenüber Th1-Zellen. In chronischen Stadien allerdings können diese in Th1-Zellen übergehen (IL-12) (Sinke JD, 2002). Beide, CD4<sup>+</sup> - und CD8<sup>+</sup>-Zellen, infiltrieren die Dermis. Spezifische dendritische Zellen der Haut, die bei der Atopischen Dermatitis in der Dermis vermehrt vorhanden sind, scheinen eine bedeutende Rolle bei der Aktivierung der T-Zellen zu spielen (Banfield CC, 2001). Studien an Mäusen haben gezeigt, dass vor allem die Th2-Zytokine Interleukin-4 und -5 und das Th1-Zytokin Interferon gamma eine bedeutende Rolle in der Pathogenese der Hautentzündung und der Hauthypertrophie spielen, die für die Atopische Dermatitis charakteristisch sind. Hautspezifische T-Lymphozyten sind an der Bildung ekzematöser Reaktionen durch Fas-induzierte Apoptose beteiligt (Tamaki K, 2001). Auch Thromboxan A2 (TXA2) scheint mit chronischen Inflammation bei der Atopischen Dermatitis in Zusammenhang zu stehen. TXA2-Rezeptorpolymorphismus und IL-4R- Polymorphismus gelten als beteiligte Determinanten des erhöhten IgE bei der Atopischen Dermatitis (Tanaka K, 2002). Ausserdem scheint Interleukin 18 unabhängig von IgE zu der Entwicklung entzündlicher Hautzustände beizutragen (Konishi et al, 2002). IL-18 stimuliert T-Zellen und Mastzellen direkt. Diese produzieren dann AD-assoziierte Moleküle, Th2-Zytokine und Histamin. Erzeugt man künstlich eine hautspezifische Überexpression an IL-18 und Caspase-1, so kann eine inflammatorische Dermatitis mit Mastozytose und Th2-Zytokinakkumulation verbunden mit einer systemischen IgE- und Histaminerhöhung hervorgerufen werden (Konishi H, 2002).

Die Konzentration an Interleukin 2, genauer des löslichen Interleukin 2 – Rezeptors sIL-2R (soluble interleukin 2 receptor) korreliert mit dem Schweregrad des Atopischen Ekzems, weshalb dieser Marker “severity index“ genannt wird (Yamashiro M, 2002). Als weitere Plasmamarker der Krankheitsaktivität atopischer Dermatitis via neuroimmuncutanes System gelten Nervenwachstumsfaktoren (NGF) und Substanz P. Beide sind bei AD erhöht und korrelieren mit der Krankheitsaktivität. Man nimmt an, dass

neurogene Faktoren die systemisch-allergische Antwort modulieren (Toyoda M, 2002). Auch scheinen Hitzeschockproteine, HSPs, eine bedeutende Rolle in der Pathogenese inflammatorischer Hauterkrankungen zu spielen (Ghoreishi M, 2000). Wie die bekannten Immunphänomene, die determinierenden Genloci und die vielfältige zelluläre Pathogenese in genauem Zusammenhang steht, ist allerdings noch nicht vollständig geklärt.

**Abb. 1 Interaktion zwischen Zytokinen und Immunzellen bei normaler Immunitätslage**



## 1.3 Behandlungsmöglichkeiten der Atopischen Dermatitis

### 1.3.1 Klassische Therapien

Die Therapie der Atopischen Dermatitis ist wie bei allen chronisch-entzündlichen Erkrankungen äußerst schwierig. Grundvoraussetzungen sind pathophysiologische Kenntnisse, Überblick über das therapeutische Repertoire und Einfühlungsvermögen in die Gesamtsituation des Patienten. (Bayerl Ch, 1996; Ruzicka T, 1997; Sterry W, 1999)

Grundpfeiler der Therapie sind primär die sog. Externa (heilende oder pflegende Substanzen, die äußerlich angewendet werden), die systemische Therapie und die UV-Therapie.

Zu den bei atopischen Dermatitis eingesetzten Externa zählen neben rückfettenden Salben und Ölbädern, die die zu Seborrhoe und Hypohidrose neigende Haut des Atopikers widerstandsfähiger machen soll, die lokale antiphlogistische Therapie. Dazu gehören die nichtsteroidalen Antiphlogistika, die nur bei schwacher Ausprägung erfolgsversprechend sind, sowie die Lokalthherapie mit Glukokortikoiden. Der Einsatz von Klasse I oder II-Steroiden ist meist ausreichend, jedoch mit vielen gefürchteten Nebenwirkungen verbunden ist. Zu den vielfältigen Nebenwirkungen steroidhaltiger Externa gehören bei lokaler Anwendung v.a. Hautatrophie und Störungen der Wundheilung. Durch katabole Wirkung auf die Haut kommt es zur Verdünnung mit zigarettenpapierartiger Fältelung, Striae rubrae, erhöhter Gefäßfragilität mit Teleangiektasien sowie Follikulitiden und Steroidakne.

Durch die starken Nebenwirkungen der steroidhaltigen Lokalthapeutika und den schlechten Ruf der Glukokortikoide allgemein, wären Externa, die zur Einsparung steroidhaltiger Medikation führen könnten, für den Atopiker mit Dermatitis eine große Erleichterung und Hoffnung.

Bei chronisch-pruriginösem Verlauf kann Teer als Externa eingesetzt werden, Gerbstoffe bei Befall der Hände und Füße.

Die systemische Therapie wird nur selten bei starkem Juckreiz mit Antihistaminika und bei therapieresistenten Fällen atopischer Dermatitis mit Ciclosporin A eingesetzt, die UV-Therapie (v.a. UV A1-Licht) bei akut exazerbierter oder schwerer atopische Dermatitis.

In Diskussion sind auch allergische Immuntherapien, die an der zellulären Pathogenese angreifen. Ziel dabei wäre die Inhibierung der Th2-Immunreaktion, die, wie oben beschrieben, als Schlüssel atopischer Reaktionen gilt (Lewis D, 2002).

Eine weitere neue Option der Neurodermitistherapie sind die sog. TIMs, topische Immunmodulatoren. Da sie eine sehr vielversprechende steroidfreie Therapiealternative des Atopischen Ekzems darstellen, will ich gesondert auf diese Substanzen und deren Angriffspunkt im Entzündungsprozeß eingehen.

### **1.3.2 Topische Immunmodulatoren**

Die Wirkung der topischen Immunmodulatoren, sog. TIMs, beruht auf den Wirkstoffen Tacrolimus oder Pimecrolimus. Sie stellen eine steroidfreie und effektive Behandlungsalternative zu bisherigen Therapiegrundpfeilern dar. Tacrolimus und Pretacrolimus gehören zu den Makrolaktemen. Sie verhindern die Signalaktivierung der Zytokinproduktion, die eine T-Zellaktivierung nach sich zieht und vermindern die Antigenpräsentation dendritischer Zellen, indem sie die Fc-Epsilon-RI Expression auf diesen reduzieren (Rico MJ, 2002). Sie binden an spezifische Macrophilin-Rezeptoren. Hauptangriffspunkt sind die T-Zellen, aber auch Mastzellen, Langerhanszellen und dendritische Zellen. All diese Zellen sind am Entzündungsgeschehen, das der Atopischen Dermatitis zugrunde liegt, beteiligt. So behindern die TIMs in aktivierten T-Zellen die zur Zytokinproduktion führende Signalkaskade, indem sie die Aktivierung von Transkriptionsfaktoren, die für die Zytokinproduktion nötig sind, verhindern. Im konkreten Fall handelt es sich um den Transkriptionsfaktor NF-AT (Nuclear Factor of Activated T cells), dessen zytoplasmatische Komponente durch die Phosphatase Calcineurin aktiviert wird. Diese Phosphatase ist der Angriffspunkt der TIMs. Somit unterbinden topische Immunmodulatoren die

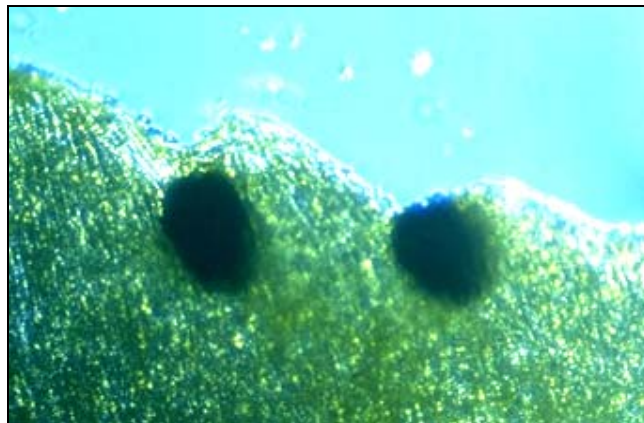
Produktion von biologisch aktiven Substanzen, die für den Entzündungsprozeß charakteristisch sind. Gleichzeitig reduzieren sie die Antigenpräsentation der Langerhanszellen, die den Circulus vitiosus der Atopischen Dermatitis in Gang hält und reduzieren die Freisetzung von biologisch aktiven Substanzen durch aktivierte Mastzellen. Die Kollagensynthese, die durch Steroide beeinträchtigt wird, bleibt dabei unbeeinflusst.

Mehrere Studien haben die Wirksamkeit der topischen Immunmodulatoren bestätigt. Übereinstimmend wird die Wirksamkeit von Tacrolimus 0,1% mit mittelstarken bis starken Kortikosteroiden gleichgesetzt (Ruzicka T et al, 1997; Boguniewicz M et al, 1998; Reitamo S et al, 2000/2002; Bekersky I et al, 2001; Paller A et al, 2001; Kang S et al, 2001; Drake L et al, 2001).

#### **1.4 Botanik des Johanniskrautes (*Hypericum perforatum* L.)**

Weltweit sind 378 Johanniskrautarten bekannt (Makino T, 1998; Roth L, 1990), die meist in subtropischen und tropischen Regionen verbreitet sind. In Mitteleuropa gibt es 9 einheimische Johanniskrautarten. Als Heilpflanze wird lediglich das Tüpfeljohanniskraut (*Hypericum perforatum* L.) verwendet. Die Stammpflanze für die Johanniskraut-Droge ist nach dem Deutschen Arzneimittel-Codex von 1986 die Art *Hypericum perforatum* L (Abb.1). Es wächst als Wildpflanze auf Brachen, an Wegrändern und lichten Wäldern in Europa, Asien, aber auch in Nord- und Südamerika. Es bevorzugt trockene, vor allem aber sonnige Standorte. Wegen des großen Bedarfs wird das Johanniskraut heute auch angebaut. Größere Anbaugelände befinden sich in Deutschland, in Osteuropa und auf Mallorca (Edwards C, 1995; Kil KS, 1996). *Hypericum perforatum* L. ist eine ausdauernde, bis 1m hohe Pflanze mit fünfzähligen, gelben Blüte und zahlreichen, langen Staubblättern. Die Blätter sind elliptisch, gegenständig angeordnet und durchscheinend punktiert, was zum Namen beigetragen hat (*perforatum*=durchstoßen) (Makino T, 1998; Roth L, 1990). Ein charakteristisches Unterscheidungsmerkmal gegenüber anderen *Hypericum*-Arten sind zwei Längskanten am Stengel. Das mikroskopische Korrelat der Tüpfel sind Hypericin führende Sekretbehälter

(Abb.1). Als Ausgangsmaterial für die verschiedenen pharmazeutischen Zubereitungen dient das Kraut mit den Blüten, die kurz vor der Blüte geerntet werden. Im Mesophyll der Blätter und in den Blüten befinden sich kugelige Sekretbehälter, die mit dem stark lichtbrechenden ätherischen Öl der Pflanze gefüllt sind (Abb.2). Die traditionellen Zubereitungsformen sind das Johanniskrautöl und Johanniskrauttee. Heute existiert eine Vielzahl verschiedener Zubereitungsformen, die sich durch Erntezeit und verwendete Pflanzenteile und Extraktionsverfahren unterscheiden. In Deutschland sind mehrere hundert Präparationen verschiedenster galenischer Art, dazu getrocknete, nicht extrahierte Pflanzen(teile) auf dem Markt, von denen nicht alle auf Wirkstoffgehalte standardisiert sind.



**Abb. 2 Ölgefüllte Sekretbehälter im Mesophyll eines Blattes von *Hypericum perforatum***



## 1.5 Klinische Indikationen des Johanniskrauts

Traditionell werden ölige Extrakte des Johanniskrauts (*Hypericum perforatum* L.) zur **topischen Behandlung** von Wunden, Verbrennungen und Nervenverletzungen verwendet (Roth L, 1990; Maisenbacher, 1992). Es gilt daher als altes Hausmittel, das in Form von Johanniskrautöl bis auf Hippokrates zurückgeht. Auch Paracelsus, Bock und Matthiolus wendeten das Johanniskrautöl bei der Behandlung von schlecht heilenden Wunden und Schmerzen an (Benedum J, 2000). In der europäischen Volksmedizin werden zur äußerlichen Anwendung vor allem lipophile Extrakte des Johanniskrautes verwendet (Johanniskrautöl) (Hänsel et al, 1993). In der Homöopathie wird das Johanniskraut auch bei ekzemartigen Hautausschlägen angewendet (Mezger, 1991). Bis heute gibt es allerdings nur eine ältere klinische Studie zur Anwendung von Johanniskrautöl, die eine Wirksamkeit bei der Behandlung von Dekubitalulcera älterer Menschen zeigte (Lomago P, 1979). Diese Untersuchung genügt jedoch nicht den heutigen Ansprüchen an eine kontrollierte Studie. Ein Extrakt aus der Johanniskrautart *Hypericum patulum* THUMB. Erwies sich im Tiermodell bei Exisions- und Inzisionswunden als wundheilungsfördernd (Mukherjee PK, 2000). Traditionell dermatologische Indikationen für Johanniskrautöl sind schlecht heilende, infizierte Wunden, Ulcus cruris, Quetschungen und Brandverletzungen (Fintelman V, 1989; Hänsel R, 1993; Loew D, 1999; Roth L, 1990; Wagner H, 1995; Weiss RF, 1999). Diese Indikationen hat auch die Kommission E des Bundesgesundheitsamtes teilweise anerkannt. Klinische Studien zur Überprüfung der Wirksamkeit des Johanniskraut-Öles wurden allerdings bisher nicht publiziert. Unter Umständen spielt der Gehalt des antibakteriellen Hyperforins in Johanniskrautölen eine Rolle (Mukherjee PK, 2000).

Johanniskraut-Extrakt wird teilweise auch in niedriger Konzentration (4%) gemeinsam mit anderen Pflanzenextrakten in Form von Salben verwendet (Rote Liste). Die Indikationen decken sich hierbei mit denen des Johanniskrautöls. Johanniskrautöl ist in Kombinationspräparaten wie Sportsalben, Rheumasalben und Kosmetika (z.B. Befelka-Öl) enthalten.

Wegen des Fehlens klinischer Studien existieren für topisch angewendete Johanniskrautpräparate bisher keine Empfehlungen zu Dosierung und Wirkstoffgehalt. Weiss empfiehlt die unverdünnte Anwendung von Johanniskrautöl zu Behandlung von Wunden und Ulcus cruris. Bei nässenden, infizierten Dermatosen wird Johanniskrautöl 2,0-5,0% in Pasta Zinci empfohlen (Weiss RF, 1999). Über die lokale Anwendung von konzentriertem Johanniskraut-Extrakt als Monopräparat in Form von Creme ist derzeit nichts bekannt. Somit stellen die hier durchgeführten Untersuchungen einen ersten Beitrag zur möglichen Anwendung von **Johanniskraut-Creme** dar als Monopräparat.

Zusammenfassend lässt sich festhalten, dass bisher keine kontrollierten klinischen Studien zur Wirkung von Johanniskrautextrakten in der Dermatologie vorliegen. Die bisherigen Ansätze zur Anwendung in der Dermatologie berufen sich ausschließlich auf traditionelle Erfahrungsmedizin und Analogieschlüsse aus Präklinischen Modellstudien. Wegen der antibakteriellen (Gaiend KN, 1959; Neuwald F, 1954; Guverich AI, 1971; Lavie, 1989) und immunmodulatorischen (Schempp CM, 2000) Wirkung von Hyperforin führten wir eine placebokontrollierte Doppelblindstudie mit einer hyperforinhaltigen Creme bei der Behandlung der Atopischen Dermatitis durch.

Die **innerliche Anwendung** von Johanniskraut-Extrakten erfolgt bei depressiven Erkrankungen in Form von Dragees oder Fluidextrakt. Diese Wirkung war bereits den Ärzten des Mittelalters bekannt (Benedum J, 2000). Die Monographie "Hyperici herba (Johanniskraut)", die von der Kommission E des früheren Bundesgesundheitsamtes am 05.12.1984 publiziert wurde, nennt als Anwendungsgebiet für Hypericum-Präparate: "Psychovegetative Störungen, depressive Verstimmungszustände, Angst und/oder nervöse Unruhe".

In zahlreichen Placebo-kontrollierten Studien wurde eine den klassischen Antidepressiva vergleichbare Wirksamkeit von Johanniskraut-Extrakten bei leichter bis mittelschwerer Depression belegt (Linde et al. 1996, Linde et al. 2000, Schulz V, 1996; Loew D, 1999; Wagner H, 1995; Fintelmann V, 1989). Die orale Dosierung bei der Behandlung depressiver Zustände beträgt in der Regel 600-900 mg Gesamtextrakt pro Tag (Melzer M, 1998; Schulz V, 1996;

Wagner H, 1995). Die Zahl der Verordnungen von Johanniskraut-Präparaten hat sich in Deutschland seit 1993 etwa verdreifacht. 1998 waren es etwa 140 Millionen Tagesdosen (Lohse et al. 1999).

## **1.6 Phytopharmaka**

Phytopharmaka wie *Hypericum* sind aus Pflanzen oder Pflanzenteilen zubereitete Wirksubstanzen, die zu diagnostischen, therapeutischen und prophylaktischen Zwecken verwendet werden und als Mehr- oder Vielstoffgemische eine wirksame Einheit bilden. Sie müssen die Anforderungen des Arzneimittelgesetzes hinsichtlich Qualität, Wirksamkeit und Unbedenklichkeit erfüllen. Sie zeichnen sich vor allem durch ein breites pharmakologisches Wirkprofil und eine große therapeutische Breite aus, d.h. der Abstand zwischen den erwünschten pharmakologischen Wirkungen und der toxischen Nebenwirkungen ist relativ groß. Dies rührt zum einen daher, daß sie neben den Wirksubstanzen sog. Coeffektoren enthalten und ihre Wirksamkeit in der Kombination vieler verschiedener pflanzlicher Wirksubstanzen begründet liegt. Johanniskrautextrakte enthalten neben den charakteristischen Inhaltsstoffen Hyperforin und Hypericin viele weitere Inhaltsstoffe wie Flavonoide, Gerbstoffe und Pflanzensäuren. Über deren Wirkpotential ist zum Teil sehr wenig bekannt.

## 1.7 Pharmakologie

Bei der antidepressiven Wirkung von Johanniskraut-Extrakten spielt, ähnlich wie bei anderen Antidepressiva, die Hemmung der synaptosomalen Aufnahme von Serotonin (Perovic et al. 1995) und Noradrenalin (Müller et al. 1998) eine Rolle.

Neuropharmakologische Wirkungen wurden für die Inhaltsstoffe Hypericin und Hyperforin nachgewiesen (Butterweck et al. 1998, Müller et al. 1998). In jüngster Zeit wurden wiederholt während einer systemischen Therapie mit Johanniskraut-Extrakten Interaktionen mit anderen Medikamenten beobachtet. So führte die Einnahme von Johanniskraut-Extrakt zu einer Verminderung der Plasmaspiegel von Herzmedikamenten wie Digoxin (Cheng 2000, Johnes et al. 1999), von antiviralen Medikamenten wie Indinavir bei der AIDS-Therapie (Piscitelli et al. 2000) und von Cyclosporin bei Organtransplantierten (Barone et al. 2000, Breidenbach et al. 2000, Ruschitzka et al. 2000). Johanniskraut-Extrakte beeinflussen das Cytochrom P-450-Enzymsystem und den Steroid-X-Rezeptor, wodurch es zu einem beschleunigten Abbau anderer Medikamente kommt (Moore et al. 2000, Obach 2000, Wentworth et al. 2000).

Pharmakokinetische Daten liegen zu den Hauptwirkstoffen Hypericin, Pseudohypericin und Hyperforin nach Einnahme eines standardisierten Johanniskrautextraktes vor. Die Substanzen werden rasch resorbiert (max. Plasmaspiegel nach 2-6 h) und in einer nicht linearen Kinetik eliminiert. Die Halbwertszeiten betragen ungefähr 15 Stunden für Hyperforin und 30 Stunden für Hypericine. (Brockmüller J, 1997; Kerb R, 1996; Biber A, 1998; Staffeldt B, 1994).

## 1.8 Hypericin

Der auffälligste Inhaltsstoff des Johanniskrautes ist der rote, photodynamisch aktive Farbstoff Hypericin (Abb. 1), welcher eine typische Fluoreszenz im roten Wellenlängenbereich (588 nm) aufweist. Hypericin ist ein Naphthodianthron, das in den Sekretbehältern der Pflanze (Abb. 2) angereichert ist und beim Zerreiben zum Austreten eines roten Saftes führt. Insgesamt werden ca. 0,1 % Hypericin und Pseudohypericin im getrockneten Kraut gefunden (Duran et al. 1986, Roth 1990, Kaul 2000). Die Substanz weist eine dosisabhängige photosensibilisierende Wirkung auf (Übersicht bei Schempp 2002/1). Diese zeigt sich in Form sonnenbrandähnlicher Entzündungen von Hautpartien, die stärkerer Sonnenbestrahlung ausgesetzt waren. So können Weidetiere, die größerer Mengen Johanniskraut gefressen haben, an einem phototoxischen Syndrom mit Rötung, Schwellung und Nekrosen nicht behaarter Haut, Konvulsionen und Hämolyse erkranken, ein Krankheitsbild, das als Hypericismus bezeichnet wird. (Araya OS, 1981; Hölzl J, 1991; Roth L, 1990; Duran N, 1986; Giese AC, 1980; Knox JP, 1984; ). Deshalb wird in der deutschen Monographie „Hyperici herba“ (Bundesanzeiger Nr. 228 vom 5.12.1984) speziell vor phototoxischen Hautreaktionen gewarnt. Dennoch wurden ernste, dem Hypericismus vergleichbare Krankheitsbilder beim Menschen unter Therapie nur sehr selten beobachtet.

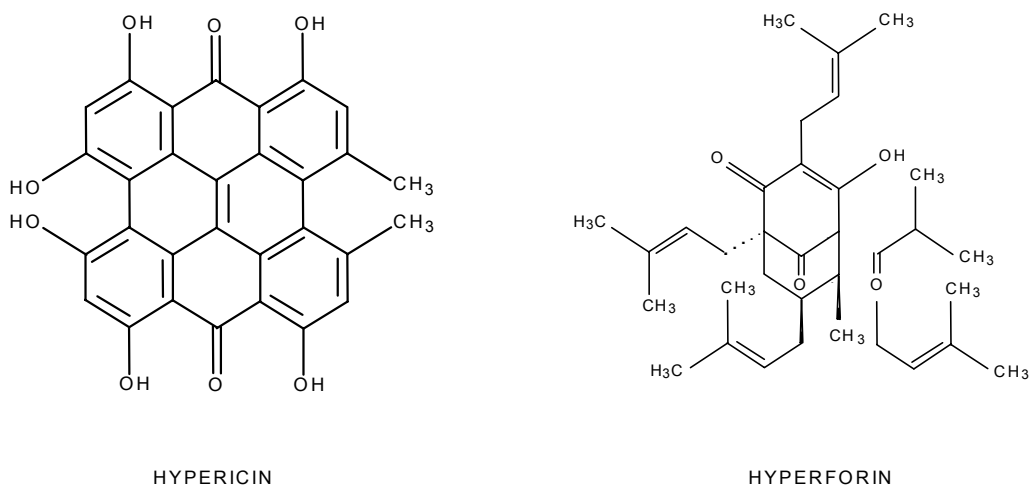
Zahlreiche Publikationen belegen, daß Hypericin bei entsprechender Dosierung und Bestrahlung Tumorzellen abtöten kann, indem es in diesen Apoptose induziert (Fox et al. 1998, Hadjur et al. 1996, Vandenbogaerde et al. 1998, Schempp et al. 2001/1). Dieser Effekt ist unter anderem mit einer Blockierung der Proteinkinase C assoziiert (Agnostis P, 1996). Vor kurzem konnten wir zeigen, dass die Hypericin-induzierte Apoptose über den Tumor-Necrosis-Factor-Related-Apoptosis-Inducing-Ligand (Trail) und Aktivierung von Caspasen vermittelt wird.

Große Beachtung fand die erstmals 1988 beschriebene antivirale Wirksamkeit des Johanniskraut-Inhaltsstoffes Hypericin. Hypericin ist *in vitro* insbesondere gegen Retroviren wirksam (Meruelo et al. 1988, Lavie et al. 1989). Allerdings zeigte die erste publizierte klinische Studie mit intravenös und oral

appliziertem reinem Hypericin keinen Effekt auf die Viruslast von HIV-Patienten (Gulick et al. 1999) bei schlechter Verträglichkeit der Substanz. Klinische Studien über die Wirksamkeit topisch applizierter Johanniskrautpräparate bei Herpesinfektionen, HPV-Infektionen, Varizellen oder Zoster liegen nicht vor. Johanniskrautöl wird jedoch traditionell auch zur adjuvanten Behandlung des Herpes zoster eingesetzt. (Weiss, 1999)

## 1.9 Hyperforin

Ein weiterer charakteristischer Inhaltsstoff des Johanniskrauts ist das Phloroglucinderivat Hyperforin, welches mit ca. 4,5 % im getrockneten Kraut gefunden wird (Bystrov et al. 1975, Maisenbacher et al. 1992). Hyperforin erreicht die höchste Konzentration in den reifen Früchten (Hänsel et al. 1993, Kaul 2000). Es ist entscheidend an der antidepressiven Wirkung von Johanniskraut beteiligt (Müller WE, 1993; Perovic S, 1995). Seit Mitte letzten Jahrhunderts wird ihm eine antibakterielle Wirkung gegen *Staphylokokkus aureus* und andere grampositive Keime zugeschrieben (Neuwald F, 1954; Gaind KN, 1959) Gurevich et al fanden heraus, dass diese auf Hyperforin beruht.(Gurevich 1971, Neuwald et al 1954, Gaind et al. 1959). Unsere Arbeitsgruppe konnte kürzlich zeigen, daß Hyperforin auch das Wachstum multiresistenter *Staphylokokkus aureus* –Stämme hemmt (Schempp 1999). Dies könnte dermatologisch von Bedeutung sein, da die traditionell zur Wundbehandlung eingesetzten Johanniskrautöle Hyperforin enthalten. In einer Studie konnte Schempp et al zeigen, dass Hyperforin in vivo und in vitro die antigenpräsentierende Funktion epidermaler Langerhanszellen beeinflusst und die Proliferation von Lymphozyten inhibierte (Schempp, 2000).



**Abb.3 Formeln der Johanniskrautinhaltstoffe Hypericin und Hyperforin**

### 1.10 Weitere Inhaltsstoffe des Johanniskrautes

Neben den gut untersuchten und sehr charakteristischen Inhaltsstoffen wie das Phloroglucinderivat Hyperforin und die Hypericine gehören allgemein im Pflanzenreich vorkommenden Inhaltsstoffen wie ätherisches Öl (0,05-0,3 %), Catechin-Gerbstoffe (3-6 %) und Xanthone, die in der Wurzel gefunden werden (ca. 0,1 %) (Hänsel et al. 1993, Kaul 2000) und Flavon- und Flavonolderivaten. Fast alle der genannten Inhaltsstoffe sind pharmakologisch wirksam.

Die qualitative und quantitative Analyse dieser Inhaltsstoffe, insbesondere der Hypericine, erfolgt mittels Hochdruck-Flüssigkeits-Chromatographie (HPLC) (Berghöfer R, 1987; Biber A, 1998; Brockmann H, 1957/1997; Erdelmaier CAJ, 1998; Guverich AI, 1971; Kerb R, 1996; Knox JP, 1984; Maisenbacher, 1991; Roth L, 1990). Zur Messung der Gesamthypericine wird nach dem "Deutschen Arzneimittel-Codex" (DAC) das photometrische Verfahren verwendet (Maisenbacher P, 1991).

### 1.10.1 Flavonoide

Johanniskraut enthält ein breites Spektrum an Flavonoiden. Es enthält sowohl Mono- als auch Biflavonoide. Letztere sind nur in den Blüten enthalten. Die Abbildung 4 gibt eine Übersicht über die im Hypericum enthaltenen Flavonoide.

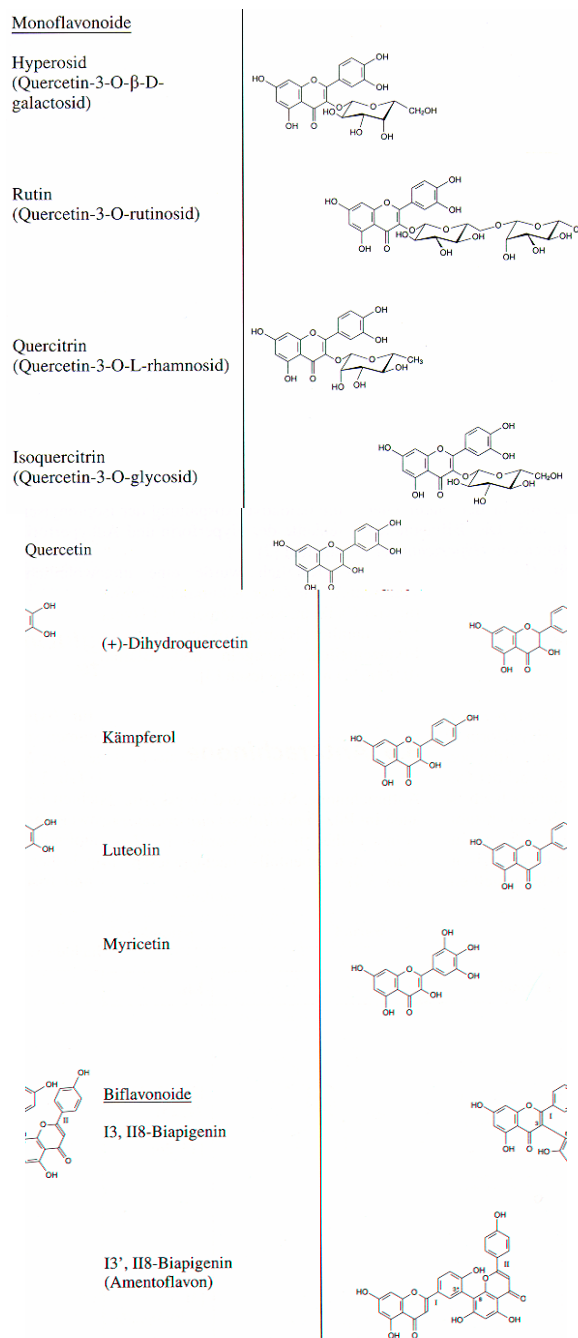


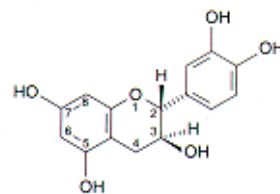
Abb. 4 Formeln der im Johanniskraut enthaltene Flavonoide



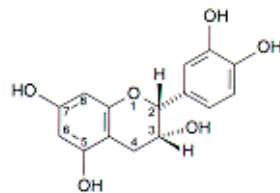
### 1.10.2 Gerbstoffe

Mit 6 – 15 % hat das Johanniskraut einen besonders hohen Gerbstoffgehalt und wird aus diesem Grund des öfteren auch als „Gerbstoffdroge“ bezeichnet. Abbildung 5 zeigt die häufigsten Gerbstoffe.

(+)-Catechin



(-)-Epicatechin



Procyanidin B2

[(-)-Epicatechin-  
(4 $\beta$ →8)-(-)- Epicatechin]

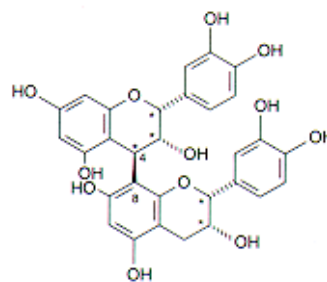
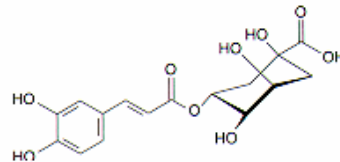


Abb. 5 Formeln der im Johanniskraut enthaltenen Gerbstoffe

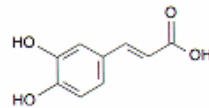
### 1.10.3 Pflanzensäuren

An Pflanzensäuren kommen im Johanniskraut die Chlorogensäure, Kaffeesäure und Ascorbinsäure vor. Die Formeln dazu sind in Abbildung 6.

Chlorogensäure



Kaffeesäure



Ascorbinsäure

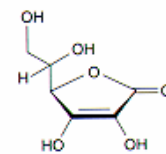
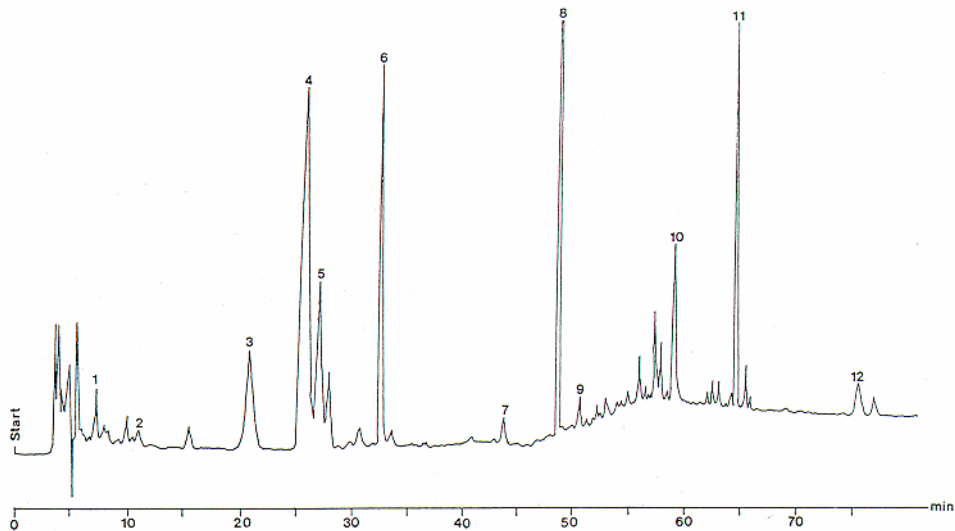


Abb. 6 Formeln der im Johanniskraut enthaltenen Pflanzensäuren



**Abb. 7 Auftrennung eines Johanniskrautblütenextraktes mittels HPLC**

1= Chlorogensäure 2= Kaffeesäure 3= Rutin 4= Hyperosid 5= Isoquercitrin  
 6= Quercitrin 7= Quercetin 8= 13,118-Biapigenin 9= 13',118-Biapigenin  
 (Amentoflavon) 10= Pseudohypericin 11= Hyperforin 12= Hypericin (nach  
 [ Roth L ]).

Über die im Johanniskraut enthaltenen Flavonoide, Gerbstoffe und Pflanzensäuren und deren Beteiligung an den vielfältigen Wirkungen des Gesamtextraktes ist sehr wenig bekannt.

Wir stellten uns die Frage, ob, inwieweit und auf welche Weise diese sog. Coeffektoren an der klinischen Wirkung von Johanniskraut bei atopischer Dermatitis beteiligt sein könnten und ob sich die von Schempp gezeigte immunmodulierende Wirkung des Gesamtextraktes mit auf diese Inhaltsstoffe und deren pharmakologisches Potential zurückführen lassen. Wir haben die Flavonoide Hyperosid, Luteolin, Amentoflavon, Myricetin, Apigenin und Biapigenin sowie die Pflanzensäuren Chlorogensäure und Kaffeesäure und der Gerbstoff Epicatechin, die alle in nicht unerheblichem Maße im Johanniskraut enthalten sind, in einem in-vitro-Screening auf deren antiproliferative Wirksamkeit hin überprüft.

## **1.11 Differenzierung zwischen Nekrose und Apoptose**

### **1.11.1 Nekrose**

Nekrose wird häufig durch extreme Abweichungen physiologischer Bedingungen, aber auch durch toxische Substanzen ausgelöst. Nekrose ist meist ein pathologischer Prozeß.

Die Schädigung der Cytoplasmamembran führt zunächst zum Einstrom von extrazellulären Ionen und Wasser. In der Folge schwellen die Zelle und die cytoplasmatischen Organellen an. Die metabolische Aktivität läßt sehr schnell nach. Durch die Lyse der Organellen und schließlich der Zelle selbst werden die Inhalte der Organellen freigesetzt. Die Folge sind lokale Entzündungsreaktionen.

Trennt man die DNA dieser Zellen auf einem Agarosegel auf, sieht man nach Färbung mit Ethidiumbromid ein Gemisch unterschiedlich langer DNA-Fragmente. Im Laboralltag wird dieses typische Resultat der Nekrose als „DNA-Schmier“ bezeichnet.

### **1.11.2 Apoptose**

Die Apoptose ist ein Mechanismus des kontrollierten Zelltods. Dadurch trägt sie zur Aufrechterhaltung der Zellhomöostase in Organen bei und entfernt geschädigte oder überalterte Zellen. In Geweben mit hoher hämatopoetischer Aktivität wie dem Knochenmark und dem Thymus oder in Organen, die eine hohe Proliferationsrate besitzen, ist Apoptose ein physiologischer Regulationsmechanismus.

Darüberhinaus werden Apoptosemechanismen auch bei einer Vielzahl von pathologischen Bedingungen, solchen wie AIDS, malignen Tumoren und Autoimmunerkrankungen beobachtet. Neben physiologischen Signalstoffen wie dem Tumornekrosefaktor oder dem Liganden des APO-1/CD95-Rezeptors können unter anderem Gamma- oder UV-Strahlen Apoptose induzieren. Chemotherapeutika, Freie Radikale und Wasserstoffperoxid, Hitzeschock

sowie Schädigungen der DNA können ebenfalls einen apoptotischen Zelltod auslösen.

Es handelt sich dabei um eine Form von Zelltod, bei dem die bei Zelltod durch Nekrose normalerweise entstehende Entzündungsreaktion ausbleibt.

Bei der Apoptose kommt es zu charakteristischen morphologischen Veränderungen. Morphologisch kann man zu Beginn der Apoptose eine Verringerung des Zellvolumens beobachten. Die Organellen bleiben im Gegensatz zur Nekrose intakt, und der Stoffwechsel der apoptotischen Zelle läuft über einen langen Zeitraum normal weiter. Chromatin- und Kern-Kondensation, Verlust der asymmetrischen Phospholipidmembrananordnung, Mitochondrien- und Zytoplasmaschwellung und DNA-Fragmentierung sind weitere Folge des apoptotischen Prozesses. Intensives *membrane blebbing* - die Bildung von Ausstülpungen und Bläschen - ist an der Cytoplasmamembran zu beobachten. Schließlich beginnen sich membranumschlossene Vesikel - die sogenannten apoptotischen Körperchen oder *apoptotic bodies* - von der Zelle abzuschnüren.

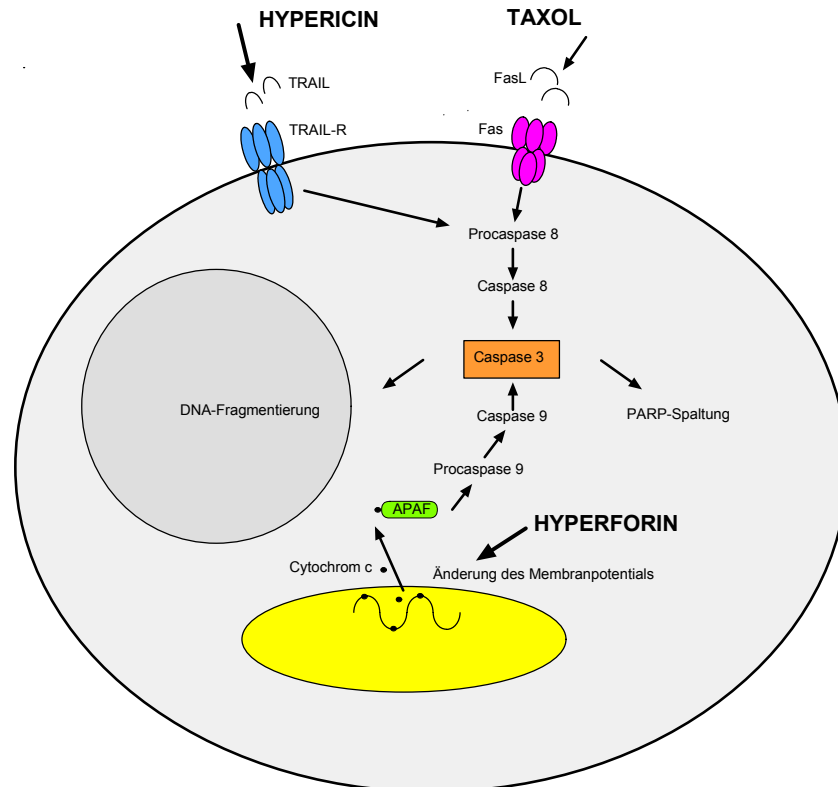
*In vivo* werden die apoptotischen Körperchen von phagozytierenden Zellen aufgenommen und somit ohne lokale Entzündungsreaktionen eliminiert. Deshalb lassen sie sich in Gewebeschnitten nur sehr selten nachweisen. *In vitro* kann man zu einem sehr späten Zeitpunkt die Lyse der apoptotischen Körperchen beobachten. Ihre Auflösung ähnelt der Nekrose - daher die Bezeichnung "sekundäre Nekrose".

Der programmierte Zelltod ist im Rahmen des Zellzyklus als Gegenstand der unkontrollierten Hyperproliferation zu sehen. Die Induktion der Apoptose wird als therapeutisches Ziel der aktiven Tumorthherapie gesehen. Außerdem gewährt die Apoptoserate Einblick in Proliferationshemmung und deren Mechanismus als Maßstab antiproliferativ-antientzündlicher Therapie.

Zum Verständnis vieler Krankheiten und für die Entwicklung neuer Therapeutika ist es essentiell, zwischen Nekrose und Apoptose differenzieren zu können. Die unterschiedlichen morphologischen und biochemischen Charakteristika bieten Ansatzpunkte für spezifische Detektionssysteme.

Ist der Zelluntergang durch Apoptose massiv, so können sich auch hier typische Nekrosezeichen zeigen als Übergang einer massiven Apoptose in

Nekrose, wobei sich überschneidend die Apoptoserate ab- und die Nekroserate zunimmt. Der Nachweis einer durch sekundäre Pflanzeninhaltsstoffe induzierten Apoptose gibt Aufschluß über die Art der Proliferationshemmung, die verschiedene Substanzen an Zelllinien auslösen. Eine Reihe von Methoden stehen dem Nachweis der Apoptose zur Verfügung, die jeweils einzelne Phasen des Apoptosegeschehens kennzeichnen.



**Abb. 8 Schematische Darstellung der durch Hypericin und Hyperforin aktivierten Apoptosewege.** Die Hypericin-induzierte Apoptose lässt sich durch einen anti-TRAIL-Antikörper blockieren. Taxol aktiviert den extrinsischen Apoptoseweg über Fas/Fas-Ligand. Im Gegensatz hierzu führt **Hyperforin** zu einer raschen Depolarisierung der Mitochondrien-Membran und einer Aktivierung der Caspase-9 (**intrinsischer Apoptoseweg**).

## 1.12 Caspasen

Apoptose wird von einer Kaskade von Enzymen schrittweise initiiert. Die wichtigsten Bestandteile dieser Enzyme sind die Caspasen. Caspasen sind Proteasen, die in ihrem aktiven Zentrum die Aminosäure Cystein enthalten und Proteine nach der Aminosäuresequenz schneiden (Cysteiny-Aspartasen). Die aktivierte Caspase triggert eine zur Apoptose führende Signalkaskade. Beim Menschen sind bisher 14 verschiedene Caspasen bekannt, die in Signalkaskaden angeordnet sind. Extrazelluläre Signale leiten die Aktivierung eines membranständigen zellulären „Todesrezeptors“ ein, der die Aktivierungen in der Caspasekaskade auszulösen scheint. An der zweiten Phase der Caspasenaktivierung sind mitochondriale Proteine wie Cytochrom C beteiligt. Caspasenaktivierung findet anfangs in einem Komplex mit dem Todesrezeptor statt, danach im Apoptosom, zu dessen Komponenten Cytochrom C, das Protein Apaf 1, Procaspase-9 und dATP zählen. Die Procaspase-9 wird proteolytisch aktiviert und freigesetzt. Sie aktiviert wiederum die Procaspasen 3, 6 und 7, die schließlich Enzyme aktivieren, die Reaktionen einleiten, die zwingend zum Absterben der Zelle führen. Hierzu zählt insbesondere der DNA-Abbau in der Zelle. Durch die Hemmung von Caspasen kann das Apoptoseprogramm unterbrochen werden.

### 1.12.1 Caspase 3

Caspase 3, die auch unter den Synonymen CPP-32, Yama und Apopain bekannt ist, ist eine intrazelluläre Cysteinprotease, die als Proenzym existiert. Dieses Proenzym wird während der Apoptosekaskade aktiviert. Caspase 3 spaltet eine Reihe von Molekülen der Zelle wie z.B. ADP-ribose-Polymerase. Die Anwesenheit von Caspase 3 legt nahe, dass sie ein Schlüsselenzym im Apoptoseweg ist.

### 1.12.2 Caspase 8

Capsase 8 wird auch FLICE, MACH und Mch5 genannt. Auch sie ist eine intrazelluläre Cysteinprotease, die als Proenzym in der Apoptasekaskade aktiviert wird. 8 verschiedene Isoformen sind beschrieben worden. Bei Aktivierung von Caspase 8 werden weitere Caspasen aktiviert, wie die Poly-ADP-Ribose-Polymerase (s.o.) und eine Untereinheit der DNA-abhängigen Proteinkinase.



## **B FRAGESTELLUNG**

Das Johanniskraut (*Hypericum perforatum* L.) hat sich in den letzten Jahren als eine Pflanze von großer therapeutischer und pharmakologischer Relevanz erwiesen.

Aufgrund der antibakteriellen und immunmodulierenden Wirkung von *Hypericum perforatum* L. wurde eine lokale Anwendung bei superinfizierten Dermatosen vorstellbar. Klinische Studien einer topischen Anwendung bei inflammatorischen Dermatitiden fehlten jedoch bisher völlig.

Wir fragten uns, ob die Anwendung von Johanniskrautcreme in der Behandlung oder Nachbehandlung subakuter Atopischer Dermatitiden erfolgsversprechend sein würde. Ziel einer ersten Pilotstudie war der Vergleich von Verträglichkeit und Wirksamkeit sowohl eines hyperforinreichen als auch eines hyperforinarmen, flavonoidreichen Johanniskrautextraktes bei subakuter Atopischer Dermatitis. Bei der zweiten Studie, einer randomisierten, placebo-kontrollierten Phase-II-Studie, untersuchten wir an einem größeren Patientenkollektiv im Halbseitenvergleich zu einem Placebo (Salbengrundlage) therapeutische Wirksamkeit und Verträglichkeit zweier verschiedener Zubereitungen von *Hypericum* im Doppelblindversuch und kamen dabei zu interessanten, signifikanten Ergebnissen.

Die im Einleitungsteil beschriebene Inflammationspathogenese, die der Atopischen Dermatitis zugrundeliegt, beruht auf einer Dysbalance von Immunzellen, die sich beim Entzündungsprozess in der Haut anreichern. Diese Zellproliferation zu unterbinden, ist der bedeutendste Effekt lokal antiphlogistischer Therapie. *Hypericum perforatum* L. enthält neben den gut untersuchten Wirkstoffen Hypericin und Hyperforin Flavonoide, Pflanzensäuren und Gerbstoffe. Untersuchungen auf deren antiphlogistisches Potential wurden bisher nicht gezielt durchgeführt. Wir fragten uns, ob diese Substanzen an der klinischen Wirksamkeit beteiligt sind. Wir führten dazu in-

vitro-Untersuchungen mit den wesentlichen Johanniskrautinhaltsstoffen durch und prüften sie auf antiproliferative Wirksamkeit und zugrundeliegende proliferationshemmenden Mechanismen.

## **C Klinischer Teil:**

### **I. PROBANDEN UND METHODEN**

#### **I.1 Studie 1: Hausinterne Pilotstudie**

##### **I. 1.1 Ethikkommission**

Die Prüfpläne der Studie 1 wurden der Ethikkommission der Universität Freiburg vorgelegt. Die Studie wurde erst nach dem positiven Votum der Ethikkommission begonnen.

Vor Studienbeginn wurden die Probanden über den Zweck und die Risiken der Studien mündlich und schriftlich durch den Projektleiter aufgeklärt. Jeder Proband gab seine schriftliche Einwilligung und bestätigte damit, dass er über Sinn, Zweck und die Nutzen-Risiko-Relation umfassend aufgeklärt wurde und jederzeit ohne Angabe von Gründen die Studie beenden kann. Weiterhin wurde der Proband davon unterrichtet, dass er sich – außer in Notfällen – nur im Einvernehmen mit dem Projektleiter einer anderen Behandlung unterziehen darf und neu aufgetretene Zeichen einer Erkrankung oder Befindensstörung dem Prüfarzt sofort anzeigen soll.

### **I. 1.2 Probanden**

16 Patienten mit subakutem allergischem Kontaktekzem oder atopischer Dermatitis mit begrenzter Ausbreitung (palmar, Extremitäten, Einzelläsionen am Körper) wurden sukzessive eingeschlossen. Die Zuordnung zu einem der Prüfpräparate erfolgte randomisiert (durch Losverfahren). Das Alter der Versuchspersonen sollte mindestens 12 Monate betragen.

### **I. 1.3 Einschlußkriterien**

Erwachsene/ Kinder mit subakutem allergischem Kontaktekzem oder atopischer Dermatitis mit begrenzter Ausbreitung (palmar, Extremitäten, Einzelherde am Körper) mit einem Alter von mindestens 12 Monaten.

### **I. 1.4 Ausschlußkriterien**

Patienten mit konsumierenden Erkrankungen, Drogenabusus, Infektionen, Photodermatosen, Infektionen, Stoffwechselstörungen, Schwangerschaft, Stillzeit, gleichzeitiger Anwendung corticoidhaltiger Externa oder Medikamente oder solche, die innerhalb der letzten 30 Tage an einer anderen Studie teilgenommen hatten, wurden von der Studie ausgeschlossen

### I. 1.5 Prüfmedikation

Alle Präparate wurden auf der Grundlage der aktuellen Richtlinien zur Herstellung und Qualitätskontrolle klinischer Prüfmuster (Good Manufacturing Practice und Good Laboratory Practice) hergestellt, kontrolliert, verpackt und freigegeben. Die Grundlagen der vier Salben sind in ihrer Zusammensetzung identisch und bestehen aus Dermatop Basissalbe.

#### Zusammensetzung:

Die Hypericum-Präparation 1 (CAELO; alkoholischer Extrakt) enthält zusätzlich zur Salbengrundlage 5,0% eines apolaren Hypericum-Extrakts. Durch das Extraktionsverfahren wurden Flavonoide und Hypericine im Extrakt bis unter die Nachweisgrenze abgereichert, der Gehalt an Hyperforin beträgt 29,2%.

Das Hypericumpräparation 2 (FLAVEX; lipophiler Extrakt) enthält zusätzlich zur Salbengrundlage 0,5% eines polaren Hypericum-Extrakts. Dieser Extrakt enthielt ca. 6% Flavonoide, 0,6% Hyperforin und 0,15% Hypericine.

### **I. 1.6 Studiendesign**

Patienten, die die Allgemeinambulanz und die Neurodermitis-Sprechstunde der Hautklinik aufsuchten und die Einschlusskriterien erfüllten, wurden nach Aufklärung und Einverständniserklärung in die Studie eingeschlossen. Der Patient oder die Eltern des minderjährigen Patienten wurden insbesondere über die übliche Standardtherapie (corticoidhaltige Creme oder Antibiotikum) informiert. Vom Patient wurde ein Initialfragebogen ausgefüllt, vom Arzt in Form eines Dokumentationsbogens der klinische Score erhoben und ein Abstrich von der betroffenen Hautstelle entnommen. Desweiteren wurde zur Objektivierung eine Photodokumentation durchgeführt. Die Johanniskrautcreme wurde in ausreichender Menge (100g) zur Verfügung gestellt. Nach einer einwöchigen Behandlungsphase wurde vom Patienten ein erster Kontrollfragebogen ausgefüllt, vom Prüfarzt erneut ein klinischer Score erhoben, ein Kontrollabstrich durchgeführt und eine zweite Photodokumentation durchgeführt. Dasselbe wurde bei der Kontrolle nach zwei Wochen durchgeführt, womit die Studie abgeschlossen war. Die Weiterbehandlung erfolgte nach Beratung durch den Prüfarzt und dem Wunsch des Patienten entsprechend weiter mit Johanniskrautcreme oder mit einer Standardtherapie.

**I. 1.7 Studie 1: Studienablauf schematisch ( Flussdiagramm)****Visite 1 / Tag 0**

Studieneinschluß nach Ein- und Ausschlusskriterien  
Randomisierung  
Probandenaufklärung- und Anamnese  
Einwilligung  
Hautstatus  
Bakterielle Besiedlung  
Körperliche Untersuchung  
Blutentnahme für Routinelabor und Differentialblutbild  
Aushändigung der Prüfmedikation  
Fotodokumentation

**Visite 2 / Behandlungsende**

Hautstatus  
Bakterielle Besiedlung  
Körperliche Untersuchung  
Blutentnahme für Routinelabor und Differentialblutbild  
Fotodokumentation

## **I.2 Studie 2: Placebokontrollierte Studie**

### **I. 2.1 Ethikkommission**

Die Prüfpläne der Studie 2 wurden der Ethikkommission der Universität Freiburg vorgelegt. Die Studie wurde erst nach dem positiven Votum der Ethikkommission begonnen.

Vor Studienbeginn wurden die Probanden über den Zweck und die Risiken der Studien mündlich und schriftlich durch den Projektleiter aufgeklärt. Jeder Proband gab seine schriftliche Einwilligung und bestätigte damit, dass er über Sinn, Zweck und die Nutzen-Risiko-Relation umfassend aufgeklärt wurde und jederzeit ohne Angabe von Gründen die Studie beenden kann. Weiterhin wurde der Proband davon unterrichtet, dass er sich – außer in Notfällen – nur im Einvernehmen mit dem Projektleiter einer anderen Behandlung unterziehen darf und neu aufgetretene Zeichen einer Erkrankung oder Befindensstörung dem Prüfarzt sofort anzeigen soll.

### **I. 2.2 Einschlusskriterien**

Männliche und weibliche Patienten im Alter zwischen 12 und 59 Jahren mit Diagnose einer subakuten atopischen Dermatitis und begrenzter Ausbreitung (SCORAD unter 80). Der „Scoring of Atopic Dermatitis“ (SCORAD)-Index ist ein etablierter Score zur Beurteilung des Schweregrades der Atopischen Dermatitis (SEARS 1997). Er basiert auf der Ausdehnung der betroffenen Hautareale, auf dem Schweregrad von Erythem, Papeln, Krustenbildung, Exkoration, Lichenifikation und Schuppung, sowie auf den subjektiven Parametern Pruritus und Schlaflosigkeit. Der SCORAD wurde berechnet entsprechend der Empfehlung der Europäischen Expertengruppe für atopische



Dermatitis (ANONYMUS 1993). Weitere Einschlusskriterien waren die schriftliche Einwilligungserklärung des Patienten nach Aufklärung, die Bereitschaft des Patienten, den Anweisungen des Prüfarztes zu folgen, d.h. die Studienbedingungen einzuhalten und Fähigkeit des Patienten zum Ausfüllen von Selbstbeurteilungsskalen im Zusammenhang mit Kontrolluntersuchungen.

### **I. 2.3 Ausschlusskriterien**

Von der Studienteilnahme ausgeschlossen wurden Patienten mit Infektionskrankheiten, schweren internistischen Grunderkrankungen (z.B. schwere kardiale, renale oder hepatische Funktionsstörungen), maligner Grunderkrankung oder stark reduziertem Allgemeinzustand (Karnowsky Index < 80%) sowie bei bekannter Alkohol-, Drogen- oder Medikamentenabhängigkeit. Frauen im gebärfähigen Alter ohne ausreichenden Kontrazeptionsschutz, in der Schwangerschaft und Stillzeit wurden ebenso wenig in die Studie aufgenommen wie Patienten, die in den letzten 4 Wochen an einer anderen klinischen Prüfung teilgenommen haben oder die gleichzeitig an einer anderen klinischen Prüfung teilnahmen; außerdem Patienten, die nicht in der Lage waren, Wesen, Bedeutung und Tragweite der Studie zu verstehen. Auch die unerlaubte Vor- oder Begleitmedikation, d.h. gleichzeitige Anwendung corticoidhaltiger Externa oder Medikamente, Einnahme von Corticosteroiden und Antihistaminika in den letzten 2 Wochen, topische Behandlung mit Corticosteroiden in der letzten Woche oder die aktuelle Behandlung mit Psychopharmaka wie trizyklischen Antidepressiva, selektiven Serotonin- Wiederaufnahmehemmer, Monoaminoxidase- Hemmer oder die medizinisch erforderliche Begleitmedikation mit Substanzen, die anti-inflammatorische, immunmodulierende oder antibiotische Wirkung besitzen galt als Ausschlußkriterium. Bekannte Überempfindlichkeit gegen Johanniskrautpräparate oder einen der Cremebestandteile schlossen wir vor Studienbeginn aus.

#### I. 2.4 Prüfmedikation

Alle Präparate wurden auf der Grundlage der aktuellen Richtlinien zur Herstellung und Qualitätskontrolle klinischer Prüfmuster (Good Manufacturing Practice und Good Laboratory Practice) hergestellt, kontrolliert, verpackt und freigegeben. Die Grundlagen der Cremes waren in ihrer Zusammensetzung identisch: Wasser, Vaseline weiß, Propylenglykol, Neutralöl, Tagat, Lanette, Eusolex T, Tegin M, Phenoxyethanol und Butylhydroxytoluol.

Das Verum 1 enthielt zusätzlich zur Salbengrundlage 5% eines apolaren Hypericum-Extraktes. Durch das Extraktionsverfahren wurden Flavonoide und Hypericine im Extrakt bis unter die Nachweisgrenze abgereichert, der Gehalt an Hyperforin betrug 29,2%.

Das Verum 2 enthielt zusätzlich zur Salbengrundlage 0,5% eines polaren Hypericum-Extrakts. Dieser Extrakt enthielt ca. 6% Flavonoide, 0,6% Hyperforin und 0,15% Hypericine.

Placebo 1 und Placebo 2 enthielt jeweils die identische Salben-Grundlage mit Zusatz chromogener Substanzen (Färbung der Grundlage zur Verblindung).

### I. 2.5 Studiendesign

Bei der Studie handelte es sich um eine prospektive, randomisierte, placebokontrollierte, doppelblinde und monozentrische Studie im Halbseitendesign. Es wurden 42 Patienten randomisiert einer der beiden Behandlungsgruppen zugeordnet und erhielten über 4 Wochen Verum 1 und Placebogrundlage 1 oder Verum 2 und Placebogrundlage 2, jeweils auf der rechten oder linken Körperhälfte. Die Medikation der jeweiligen Körperhälfte wurde zweimal täglich in die Haut einmassiert. Hauptzielkriterium war die Beeinflussung des Hautzustandes, der für jede Körperhälfte mittels eines modifizierten SCORAD- Index separat berechnet wurde. Nebenzielkriterien waren die Kolonisatin der Haut durch *Staphylokokkus aureus*, kosmetische Akzeptanz und Vertäglichkeit der Cremes.

In die Prüfung eingeschlossen wurden 12 bis 59 Jahre alte Patienten beiderlei Geschlechtes mit subakuter atopischer Dermatitis von begrenzter Ausbreitung (SCORED unter 80). Insgesamt wurden 42 Patienten aufgenommen. Patienten, die Arzneimittel mit antiinflammatorischer und / oder immunmodulatorischer Wirkung anwendeten, setzten diese ab und durchliefen eine 2-wöchige Wash-out- Phase. Sofern eine Unterbrechung der Vorbehandlung aus ärztlicher Sicht nicht vertretbar war oder mit Rebound-Phänomenen zu rechnen war, konnten solche Patienten gemäß den Ausschlusskriterien nicht aufgenommen werden. Die Behandlung der nicht betroffenen Haut mit pflegenden Externa war erlaubt und wurde mit dem Prüfarzt abgestimmt und dokumentiert. Die Patienten wurden in der Reihenfolge ihres Erscheinens, nach Aufklärung und Unterzeichnung der Einverständniserklärung in die Studie aufgenommen. Sie wurden einer der beiden Behandlungsgruppen randomisiert zugeordnet und erhielten über 4 Wochen Verum 1 und Placebogrundlage 1 oder Verum 2 und Placebogrundlage 2 auf der rechten bzw. linken Körperhälfte. Zur ergänzenden Beurteilung der Compliance sammelte der Prüfarzt zum Studienabschluß die Tuben mit der Prüfmedikation ein und führte ein „Counting“ (Wiegen der Tube).

**I. 2.6 Flußdiagramm: Studie 2: Studienablauf schematisch**

**Visite 1 / Tag 0**

Studieneinschluß nach Ein- und Ausschlusskriterien

Randomisierung

Probandenaufklärung- und Anamnese

Einwilligung

SCORAD

Bakterielle Besiedlung

Körperliche Untersuchung

Blutentnahme für Routinelabor und Differentialblutbild

Aushändigung der Prüfmedikation

Fotodokumentation

↓

**Visite 2 / Tag 7**

SCORAD

Kosmetische Akzeptanz / Verträglichkeit

Fotodokumentation

↓

**Visite 3 / Tag 14**

SCORAD

Kosmetische Akzeptanz / Verträglichkeit

Fotodokumentation

Aushändigung von Prüfmedikation

↓

**Visite 4 / Tag 27**

SCORAD

Bakterielle Besiedlung

Kosmetische Akzeptanz / Verträglichkeit

Körperliche Untersuchung

Blutentnahme für Routinelabor und Differentialblutbild

Fotodokumentation

## **I. 2.7 Methoden Studie 2:**

### **Placebokontrollierte Studie im Halbseitenvergleich**

Für die Studie wurden gesunde männliche und weibliche Probanden im Alter zwischen 18 und 59 Jahren rekrutiert. Die Zuordnung der Probanden zu den 2 Gruppen erfolgte randomisiert, so daß jeder Gruppe die Probanden zufällig zugeordnet wurden. Die betroffenen Bereiche jeweils einer Körperhälfte wurden mit Verum oder Placebo behandelt. Die beiden Cremetuben wurden dem Patienten zur Selbstapplikation nach ausführlicher Anleitung ausgehändigt, wobei Verblindung stattfand, d.h. sowohl den Prüfarzten als auch dem Probanden war unklar, bei welcher der beiden Cremes es sich um das Verum handelt.

### **I. 2.8 Hauptzielkriterium**

Das Hauptzielkriterium der Studie war der klinische Schweregrad der Hautläsionen auf der linken und der rechten Körperhälfte. Der Hautzustand wurde für jede Körperhälfte mittels des Teil- SCORAD berechnet, der auf der Ausdehnung und den Intensitäten von Erythem, Papeln, Krustenbildung, Exkoration, Lichenifikation und Schuppung beruht. Zunächst erfolgt eine prozentuale, möglichst präzise Bestimmung der betroffenen Hautareale (A). Die Summe wird unter A notiert, wobei die errechnete Summe in 5er-Intervallen auf- bzw. abgerundet wird. Bei Kindern gilt aufgrund abweichender Körperproportionen ein anderes Zahlenwertesystem. Zur Bewertung der Intensität wird ein repräsentatives Hautareal nach einzelnen Formen der Hautaffektion anhand eines vorgegebenen Punktesystems von 0 bis 3 eingeteilt. Die ermittelten Werte werden addiert und als B-Wert notiert (max. 18 Punkte). Zur Bestimmung der subjektiven Symptome gibt der Patient auf einer visuellen Analogskala (VAS) den Juckreiz und die Schlaflosigkeit der vergangenen 3 Tage/Nächte an (max.Punktzahl pro Parameter: 10). Die Werte

aus A, B und C werden in die SCORAD-Formel eingesetzt ( $A/5 + 7B/2 + C$ ). Wir verwendeten den Punktwert des *Teil-SCORAD*, der sich wie folgt ergibt: Quotient aus Prozent der betroffenen Hautfläche geteilt durch 5 addiert zum Produkt aus Intensitäten multipliziert mit 3,5. Dies entspricht dem SCORAD ohne die subjektiven Parameter Juckreiz und Schlaflosigkeit (Dermatology 1993: 186, 23-31).

### **I. 2.9 Nebenzielkriterium**

Als Nebenzielgrößen wurden die Keimbesiedlung der Hautläsionen in Form der koloniebildenden Einheiten am Tag 0 und am Tag 28, die subjektive Verträglichkeit und die kosmetische Akzeptanz der Zubereitung gewertet. Bei Beginn und Abschluß der Studie wurde an je einem definierten Behandlungsareal der linken und rechten Körperhälfte ein Abklatsch von der Haut mit Hilfe spezieller Blutagarplatten durchgeführt. Wir verwendeten dazu Columbia-Agarplatten mit Zählrastrer und einem Durchmesser von 6 cm von Becton & Dickinson, Heidelberg. Diese wurden bei 37° C für 24h inkubiert und anschließend die koloniebildenden Einheiten (CFU) ausgezählt. Die üblichen Hautkeime wurden makroskopisch ohne weitere Subtypologie identifiziert.

Die Anzahl der CFU's auf der diagonalen Zählachse wurde nach folgendem Score bewertet:

- (0 CFU)
- + (1-10 CFU)
- ++ (11-20 CFU)
- +++ (>20 CFU)

Die Verträglichkeit und die kosmetische Akzeptanz der Zubereitungen wurde von den Patienten selbst bei den Visiten 2-4 nach folgendem Score bewertet:

Verträglichkeit: sehr gut – gut – mäßig – schlecht

Kosmetische Akzeptanz: sehr gut – gut – mäßig – schlecht

### **I. 2.10 Laboruntersuchungen**

Die Laboruntersuchungen erfolgten vor Studienbeginn und bei Visite 4 und beinhalteten Serumuntersuchungen des Hämoglobin, Hämatokrit, Erythrozyten, Leukozyten, Kreatinin, SGOT, SGPT, Gamma-GT, AP und des Bilirubin. Zusätzlich wurde der Urinstatus (Blut, Eiweiss, Bakterien) bestimmt. Außerdem wurde vor Beginn der Studie bei Frauen im gebärfähigen Alter ein Schwangerschaftstest (Urin) durchgeführt.

### **I. 2.11 Statistische Methoden**

Als Hauptzielkriterium wurde der Teil-SCORAD definiert, der auf der Ausdehnung der Hautläsion und den Parametern Erythem, Papeln, Krustenbildung, Exkoration, Lichenifikation und Schuppung beruht. Nebenzielkriterien waren die Beeinflussung der mikrobiellen Besiedlung der Hautläsionen sowie der Verträglichkeit und kosmetische Akzeptanz der Zubereitungen. Die statistische Auswertung führten wir in Zusammenarbeit mit Herrn Dr. Collet (CRO: Winicker Norimed GmbH) und dem Projektleiter bei der Firma Lichtwer Pharma AG durch.

Eine erste Qualitätsprüfung der dokumentierten Daten sicherten wir im Rahmen des regelmäßigen Monitorings der Studie. Nach Eingang der Patientenprüfbogen sahen wir diese zunächst auf berichtete unerwünschte Ereignisse durch, die wir in einer Safety-Datenbank verwalteten und von denen wir den Leiter der klinischen Prüfung kontinuierlich unterrichteten.

Dabei nahmen wir folgende Kodierungen vor:

- > Unerwünschte Ereignisse (WHO ART),
- > Begleitmedikation ( WHO Drug Dictionary),

> Begleiterkrankungen (ICD-10).

Wir überprüften die Patientenprüfbögen auf Vollständigkeit, Plausibilität und Einhaltung der GCP-Vorschriften der Dokumentation. Dabei überprüften wir Korrekturen sowie die lückenlose Dokumentation. Korrekturen wurden entweder in Form von „Self Evident Correction Forms“ durch die Dokumentation bei Lichtwer Pharma oder in Form von „Query Forms“, bei denen wir die Dokumente selbst überarbeiteten. Die Dateneingabe erfolgte zweifach. Nicht übereinstimmende Eingaben konnten dadurch korrigiert werden. Nach Eingabe sämtlicher Eintragungen im Patientenprüfbogen schlossen wir die Datenbank und dokumentierten diesen Vorgang. Dem Pilotcharakter der Studie entsprechend wurde die Fallzahl anhand pragmatischer Erwägungen auf 42 Patienten festgelegt. Eine Fallzahlschätzung wurde nicht durchgeführt, da hierzu keine Vergleichsdaten vorlagen.

Die Wirksamkeit der Johanniskraut-Extrakte wurde anhand der Veränderungen im Teil-SCORAD beurteilt. Hierzu werteten wir die in den Visiten 1, 2, 3 und 4 erhobenen Daten deskriptiv aus. Ergänzend zu den deskriptiven Statistiken wurden folgende explorative Tests zum Niveau von 5% durchgeführt: pro Behandlungsgruppe wurde für jede Behandlung die Differenz des Teil-SCORAD nach und vor Behandlung gebildet. Ein Wilcoxon-Rangsummen-Test für abhängige Stichproben wurde anhand dieser Differenzen zum Vergleich der Placebo- mit der jeweiligen Verum-Behandlung angewendet. Hierzu wurden 95%-Konfidenzintervalle für die Mediane der Differenzen in den Behandlungsgruppen berechnet. Ferner wurde pro Patient zusätzlich die Differenz der oben beschriebenen Differenzen gebildet (Adjustierung auf Placebo). Per Wilcoxon-Rangsummen-Test für unabhängige Stichproben wurden die so adjustierten Behandlungsgruppen wiederum miteinander verglichen und es wurden 95%-Konfidenzintervalle für den Median der Behandlungsdifferenz berechnet.

Die Nebenzielkriterien mikrobielle Besiedelung, Verträglichkeit und kosmetische Akzeptanz wurden ebenfalls deskriptiv statistisch ausgewertet (Berechnung von statistischen Kenngrößen bzw. Häufigkeitstabellen).

Es wurden zunächst drei Analyse-Kollektive betrachtet. Die per Protokoll (PP)-Analyse wurde mit allen Patienten durchgeführt, die die Studie



prüfplangemäß mit der vorgesehenen Behandlungsdauer und mit höchstens geringfügigen Protokollverletzungen durchliefen. Patienten, die mindestens über einen Zeitraum von 10 Tagen behandelt wurden, bilden das Intent to treat (ITT)-Kollektiv. Da ITT- und PP-Kollektiv (per-Protokoll) identisch waren, wurden sie zu einem Kollektiv (ITT-/PP-Kollektiv) zusammengefaßt. Die Wirksamkeit wurde mit dem ITT-/PP-Kollektiv ermittelt. Die demografischen und anamnestischen Daten wurden mit Verträglichkeits- und ITT-/PP-Kollektiv ausgewertet. Die Festlegung der Auswertungskollektive erfolgte vor Schließen der Datenbank.

Alle statistischen Analysen wurden mit dem SAS-System durchgeführt.

## II Ergebnisse des klinischen Teils

### II. 1 Ergebnisse Studie 1 (hausinterne Pilotstudie)

#### II. 1.1 Tabellen und Graphiken

Von den 16 in die Studie eingeschlossenen Patienten zeigten 62,5% eine Verbesserung des Hautzustandes. 8 von 16 Patienten, d.h. 50% der Probanden zeigte eine Verbesserung, bei zwei Patienten heilten die Ekzeme ganz ab. Bei drei Patienten blieben die Symptome unverändert, bei einem Patient kam es zur einer Verschlechterung des Hautzustandes. Zwei Patienten beendeten die Studie nicht.

**Tabelle 1: Wirksamkeitsvergleich CAELO versus FLAVEX**

Caelo = alkohol. Extrakt; Flavex = lipophiler Extrakt.

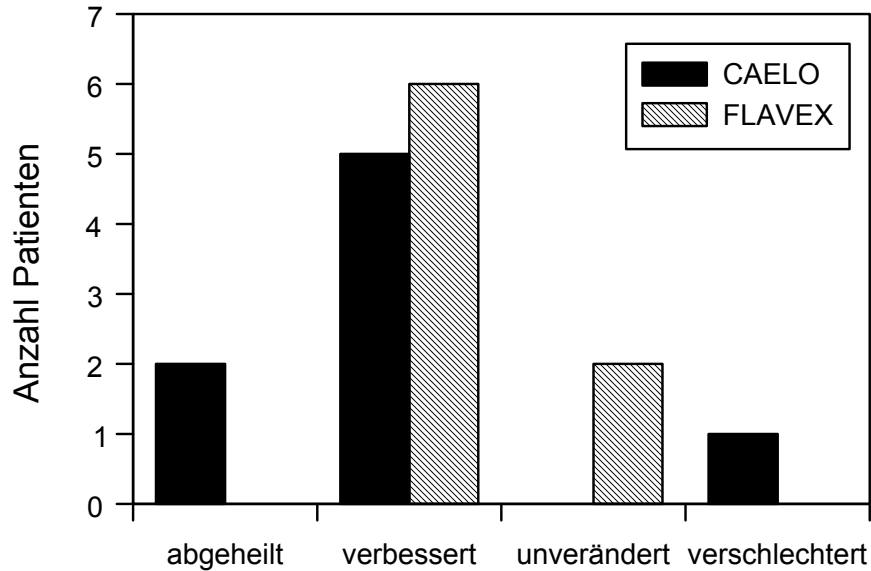
	<b>CAELO</b> (polarer Extr.)	<b>FLAVEX</b> (apolarer Extr.)
Abheilung	25%	25%
Besserung	62,5%	50%
Keine Veränderung	-	25%
Abbruch Studie	25%	-
Verschlechterung	12,5%	-

**Tabelle 2: Ergebnisse Pilotstudie**

Caelo = alkohol. Extrakt; Flavex = lipophiler Extrakt; AD = Atopische Dermatitis

<b>Ergebnis</b>	<b>Geschl.</b>	<b>Alter</b>	<b>Diagnose</b>	<b>Lokalisation</b>	<b>Extrakt</b>	<b>Dauer (d)</b>
verbessert	w	50	Prurigo	Unterschenkel	Caelo	21
abgeheilt	w	27	AD	Ellenbeugen	Caelo	10
verbessert	w	61	Ekzem	Unterschenkel	Caelo	11
verbessert	m	26	AD	Ellenbeugen	Caelo	14
verbessert	w	28	Ekzem	Hände	Caelo	16
verschlechtert	w	19	AD	Ellenbeugen	Caelo	7
verbessert	w	18	AD	Ellenbeugen	Caelo	10
verbessert	m	25	AD	Ellenbeugen	Flavex	10
unverändert	w	36	AD	submammär	Flavex	8
unverändert	w	49	AD	Ellenbeugen	Flavex	7
verbessert	m	27	Ekzem	Finger	Flavex	8
verbessert	w	20	AD	Hände	Flavex	7
abgeheilt	m	2	AD	Gesicht	Flavex	35
unverändert	w	9	AD	Hände	Flavex	30
abgebrochen	m	18	AD	Ellenbeugen	Caelo	
abgebrochen	m	21	AD	Hände	Caelo	

Graphische Darstellung der Studienergebnisse im direkten Vergleich der beiden Extrakte CAELO und FLAVEX:



**Abb. 9 : Wirksamkeitsvergleich der Extrakte CAELO und FLAVEX**

Im Kollektiv der mit CAELO behandelten Patienten kam es in 25% zur Abheilung und in 62,5% zur Symptomverbesserung, allerdings in einem Fall ( das entspricht 12,5% des CAELO-Probandenkollektivs ) auch zur Verschlechterung.

Demgegenüber war im es im FLAVEX-Kollektiv zur weder zur Abheilung noch zur Verschlechterung gekommen, in 75% aber zur Verbesserung des Hautbildes. 25% des Kollektivs zeigte keine Wirkung.

Wenn man nun sowohl Abheilung als auch Verbesserung als positives Studienergebnis definiert, so kam es im Falle von CAELO in 87,5% zum positiven Ergebnis, im Falle FLAVEX nur in 75%.

## II. 1.2 Photodokumentation (Beispiele vor/ nach Therapie)



**Abb. 10 Photodokumentation Studie 1 (Beispiele)**

## **II. 2 Ergebnisse Studie 2 (placebokontrollierte, randomisierte Doppelblindstudie im Halbseitendesign)**

### **II. 2.1 Auswertungskollektive**

An der Studie nahmen 42 Patienten teil. Den beiden Behandlungsgruppen Verum 1 (hyperforinreich) – Verum 2 (hyperforinarm) teilten wir mittels Randomisierung jeweils 21 Patienten zu. Für die Auswertung verwendeten wir 2 Kollektive: das Verträglichkeitskollektiv und das ITT-/PP-Kollektiv.

Das Verträglichkeitskollektiv enthielt alle 42 Patienten, ins ITT-/PP-Kollektiv wurden 37 Patienten eingeschlossen. Davon waren 18 Patienten in der Behandlungsgruppe Verum 1 (hyperforinreich) bzw. 19 Patienten in der Behandlungsgruppe Verum 2 (hyperforinarm). Gründe für den Ausschluss aus dem ITT-/PP-Kollektiv und demografische Daten der Kollektive sind nachfolgend in Tabelle 3 dargestellt.

### **II. 2.2 Gründe für den Ausschluss aus den Auswertungskollektiven**

Aus dem Kollektiv „Verum 1“ wurden insgesamt 3 Patienten ausgeschlossen, aus dem Kollektiv „Verum 2“ waren es 2 Patienten.

In Kollektiv 1 war bei einem Patienten nach zehn Tagen noch keine Wirksamkeit nachzuweisen; zwei Patienten hatten die Medikation weniger als zehn Tage angewandt, was als Ausschlussgrund galt.

Im Kollektiv 2 schied ein Patient wegen fehlender Wirksamkeit innerhalb von zehn Tagen aus; ein weiterer Patient, weil Wirksamkeitsdaten unter Medikation fehlten bzw. nicht vorlagen.

### II. 2.3 Demographische Daten der Auswertungskollektive (siehe Tabelle 3)

Die Anzahl des ITT-/PP-Kollektivs beträgt bei Kollektiv „Verum 1“ 18, bei Kollektiv „Verum 2“ 19. Das Durchschnittsalter lag bei Kollektiv 1 bei 30,4 versus 28,1 bei Kollektiv 2, die Körpergrösse bei 171,6 cm versus 170,3 cm und das Körpergewicht bei 71,6 versus 66,1. In Kollektiv 1 waren 4/5 männliche Probanden, in Kollektiv 2 dagegen etwas mehr Frauen (Männer / Frauen = 6/13). Der Unterschied in der Geschlechtsverteilung ist zufällig und wird im Hinblick auf die Wirksamkeit als nicht relevant eingestuft.

**Tabelle 3 : Demografische Daten der Auswertungskollektive**

	Verum 1 (hyperforinreich)	Verum 2 (hyperforinarm)
ITT-/PP-Kollektiv (Anzahl)	n=18	n=19
Alter (Jahre)	30,4 ± 12,9	28,1 ± 11,3
Körpergrösse (cm)	171,6 ± 10,2	170,3 ± 10,8
Körpergewicht (kg)	71,6 ± 16,7	66,1 ± 12,5
Geschlecht (männlich/ weiblich)	10/8	6/13

## II. 2.4 Wirksamkeit im Halbseitenvergleich (siehe Tab. 4)

Hauptzielparameter war der Teil-SCORAD, der sich aus prozentualer Bestimmung der Fläche der betroffenen Hautareale und der Bewertung der Intensität zusammensetzt. Zur Bestimmung der Intensität der Hautaffektionen wurden die Kriterien Erythem, Krustenbildung, Lichenifikation, Papelbildung, Exkoration und Schuppung auf einer Skala von 0 – 3 (fehlend – leicht – mittel – stark) beurteilt. Aus der Summe der Einzelwerte wurde für jede Seite ein Teil-Score errechnet (siehe Methoden).

Im Halbseitenvergleich zwischen Verum 1 (hyperforinreich) und Placebo 1 ließ sich eine stärkere Wirksamkeit bei Verum 1 (im Vergleich zum Placebo 1) feststellen. Der Unterschied zwischen diesen beiden Behandlungen ist für alle Visiten (Tag 7, 14, 28) statistisch signifikant (Tabelle 3).

Im Gegensatz dazu konnte kein statistisch signifikanter Unterschied zwischen Verum 2 und Placebo 2 gefunden werden, was aber primär auf die deutlich ausgeprägteren Effekte der Placebocreme 2 zurückzuführen ist.

Im direkten Vergleich der beiden Verum-Salben sind diese nicht signifikant unterschiedlich ( $p=0,36$  an Tag 7,  $p=0,75$  an Tag 14,  $p=0,60$  an Tag 28). Erst nach Adjustierung auf das jeweilige Placebo (Differenz der Differenzen) ergibt sich ein signifikanter Unterschied. Dieser scheint auf der besseren Wirksamkeit von Placebo 2 zu beruhen.



**Tabelle 4 : Teil-SCORAD im Halbseitenvergleich – Differenz zur Baseline**

Visite	Behandlung	Mittelwert $\pm$ Std.	Median [Min.; Max.]	95% Konf. int. für Median	p-Wert**
Tag 7	Verum 1*	-3,0 $\pm$ 3,1	-3,0 [-10,0; 5,0]	[-5,0; -2,0]	0,002
	Placebo 1	-0,6 $\pm$ 1,2	-0,5 [-2,0; 2,0]	[-2,0; 0,0]	
	Verum 2*	-2,2 $\pm$ 2,1	-2,0 [-6,0; 2,0]	[-4,0; -1,0]	0,597
	Placebo 2	-1,7 $\pm$ 2,8	-2,0 [-7,0; 6,0]	[-3,0; 0,0]	
Tag 14	Verum 1*	-4,7 $\pm$ 3,3	-6,0 [-10,0; 2,0]	[-7,0; 3,0]	0,016
	Placebo 1	-2,1 $\pm$ 3,0	-2,0 [-10,0; 4,0]	[-4,0; 0,0]	
	Verum 2*	-4,4 $\pm$ 2,6	-5,0 [-11,0; 0,0]	[-6,0; -2,0]	0,309
	Placebo 2	-3,6 $\pm$ 3,0	-6,0 [-9,0; 0,0]	[-5,0; -1,0]	
Tag 28	Verum 1*	-5,4 $\pm$ 4,9	-6,5 [-12,0; 5,0]	[-9,0; -4,0]	0,022
	Placebo 1	-2,3 $\pm$ 3,3	-2,5 [-8,0; 5,0]	[-4,0; -1,0]	
	Verum 2*	-4,6 $\pm$ 4,3	-4,0 [-13,0; 5,0]	[-7,0; -2,0]	0,541
	Placebo 2	-3,5 $\pm$ 4,3	-3,0 [-11,0; 4,0]	[-7,0; 0,0]	

\* Verum 1 = hyperforinreich, Verum 2 = hyperforinarm

\*\* Wilcoxon-Rangsummen-Test

## II. 2.5 Keimbesiedelung

Die antibakterielle Wirksamkeit der Therapie wurde anhand der Anzahl der CFU's (koloniebildende Einheiten) von *Staphylokokkus aureus* und anderen Keimen zu Studienbeginn und Studienende bestimmt. Tendenziell scheint anhand der deskriptiven Statistik die Anzahl der CFU's von *Staphylokokkus aureus* bei Verum 1 verglichen mit Placebo 1, Verum 2 und Placebo 2 stärker abzunehmen. Ein statistisch signifikanter Unterschied zwischen Verum 1 und Placebo 1 konnte aber nicht nachgewiesen werden ( $p=0,064$ ). Ein Unterschied zwischen Verum 2 und Placebo 2 konnte ebenfalls nicht festgestellt werden ( $p=0,278$ ). Hinsichtlich anderer Keime bestanden keine Unterschiede zwischen allen 4 Behandlungen.

## II. 2.6 Verträglichkeit und kosmetische Akzeptanz (siehe Tab. 5 und 6)

Die Verträglichkeit der Salbenzubereitung wurde bei allen Visiten für alle Behandlungen von mehr als 80% der Patienten als gut oder sehr gut bezeichnet (Tabelle 5 nächste Seite).

**Tabelle 5 : Verträglichkeit der Präparate**

Visite	Urteil	Verum 1		Placebo 1		Verum 2		Placebo 2	
		N	%	N	%	N	%	N	%
Tag 7	sehr gut, gut	18	94,7	16	84,2	17	85,0	19	95,0
	mäßig, schlecht	1	5,3	3	15,8	3	15,5	1	5,0
Tag 14	sehr gut, gut	18	100	15	83,3	16	84,2	17	89,5
	mäßig, schlecht	-	-	3	16,7	3	15,8	2	10,5
Tag 28	sehr gut, gut	18	100	17	94,4	15	83,3	16	88,9
	mäßig, schlecht	-		1	5,6	3	16,7	2	11,1

Die kosmetische Akzeptanz der Salbenzubereitung wurde bei allen Visiten für alle Behandlungen von mehr als 65% der Patienten als gut oder sehr gut bezeichnet. Dabei war die kosmetische Akzeptanz am geringsten unter Verum 1, am besten in den beiden Placebogruppen (Tabelle 5)

**Tabelle 6: Kosmetische Akzeptanz der Präparate**

Visite	Urteil	Verum 1		Placebo 1		Verum 2		Placebo 2	
		N	%	N	%	N	%	N	%
Tag 7	sehr gut, gut	13	72,2	16	88,9	16	80,0	18	90,0
	mäßig, schlecht	5	27,8	2	11,1	4	20,0	2	10,0
Tag 14	sehr gut, gut	13	72,2	16	88,9	14	73,7	17	89,5
	mäßig, schlecht	5	27,8	2	11,1	5	26,3	2	10,5
Tag 28	sehr gut, gut	12	66,6	16	88,9	13	72,2	16	88,9
	mäßig, schlecht	6	33,4	2	11,1	5	27,8	2	11,1

## II. 2.7 Laborparameter

Hinsichtlich der Bewertung der Laborparameter (im Normbereich, außerhalb des Normbereichs) konnten bei keinem der erhobenen Parameter Unterschiede zwischen den Behandlungsgruppen Verum 1 (hyperforinreich) und Verum 2 (hyperforinarm) gefunden werden.

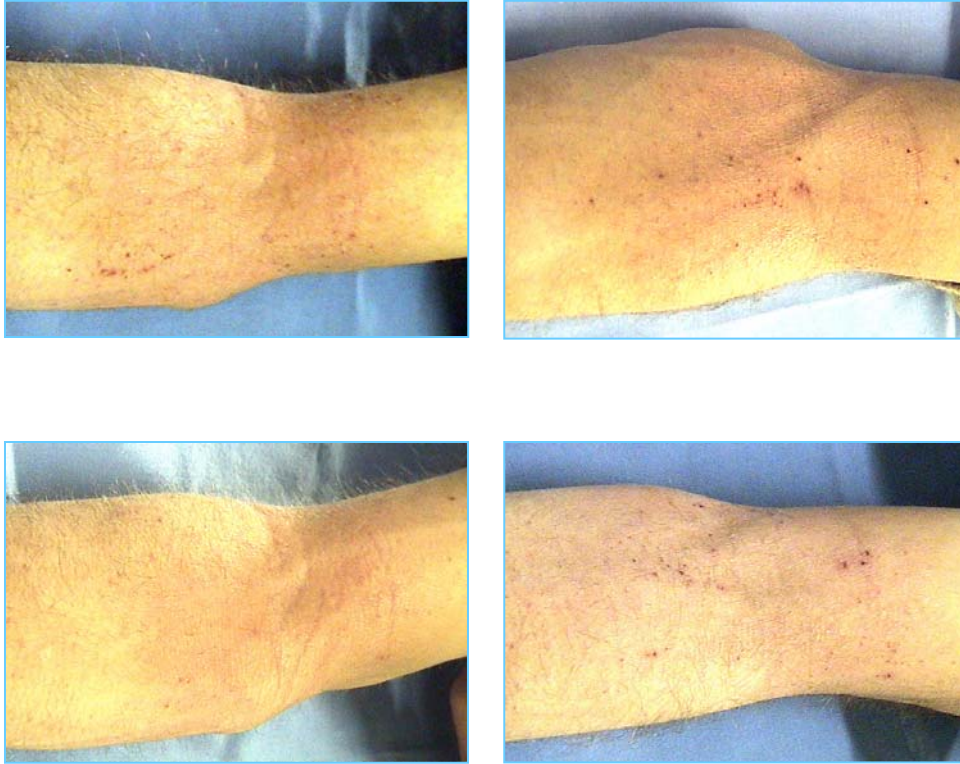
## II. 2.8 Unerwünschte Ereignisse

Insgesamt traten 6 unerwünschte Ereignisse (UEs) bei 5 Patienten (11,9 %) auf. Davon entfielen auf die Behandlungsgruppe Verum 1 (hyperforinreich) 4 UEs bei 3 Patienten und auf die Behandlungsgruppe Verum 2 (hyperforinarm) 2 UEs bei 2 Patienten. In einem Fall (Verum 1) wurde ein Zusammenhang mit der Prüfmedikation als wahrscheinlich angesehen.

Ein schwerwiegendes unerwünschtes Ereignis trat bei einem Patienten der Behandlungsgruppe Verum 2 (hyperforinarm) auf. Es handelte sich dabei um eine Einweisung ins Krankenhaus wegen psychischer Instabilität und Suizidgefahr. Ein Zusammenhang mit der Prüfmedikation wurde vom Prüfarzt nicht gesehen.

Bei 3 Patienten führte das unerwünschte Ereignis zum Studienabbruch (Verum 1: 2 Patienten, Verum 2: 1 Patient).

## II. 2.9 Photodokumentation



**VERUM**

**PLACEBO**

**Abb. 11 Klinisches Beispiel für Studie 2**

Obere Reihe: U1 (vor Therapie)

Untere Reihe: U4 (nach Therapie)

## D Experimenteller Teil

### I. Material und Methoden

#### I.1 Lösungsverhalten der Johanniskrautinhaltstoffe

Da in vorherigen Lösungsversuchen einige Johanniskrautinhaltstoffe schwerlöslich erschienen und damit Laborexperimenten vorbehalten waren, führten wir mit allen Substanzen Lösungsversuche mit verschiedenen Lösungsmitteln wie Pyridin, DMSO, 70% Ethanol, Aqua bidest., RPMI Medium und PBS 1X durch.

Tabelle 6 zeigt das Lösungsverhalten der Substanzen.

**Tabelle 7: Lösungsverhalten von Johanniskrautinhaltstoffen**

Inhaltsstoff	Pyridin	DMSO	70% Ethanol	H2O bidest.	RPMI- Medium	PBS 1X
Myricetin	löslich	löslich	löslich	unlöslich	löslich	löslich
Luteolin	löslich	löslich	löslich	unlöslich	löslich	löslich
Amentoflavon	löslich	löslich	löslich	unlöslich	löslich	löslich
Hyperosid	löslich	löslich	mäßig	unlöslich	löslich	löslich
Kaffeensäure	löslich	löslich	löslich	unlöslich	löslich	löslich
Chlorogensäure	löslich	löslich	löslich	löslich	löslich	löslich
Apigenin	löslich	löslich	unlöslich	unlöslich	mäßig	mäßig
Biapigenin	löslich	löslich	unlöslich	unlöslich	löslich	löslich
Epicatechin	löslich	löslich	löslich	unlöslich	löslich	löslich

Für unsere Experimente entschieden wir uns für 1% DMSO und PBS für alle Substanzen mit Ausnahme des Apigenins, das wir in Pyridin / PBS lösten.

Wir bildeten konzentrierte Stocklösungen, die wir als Ausgangsstocks für unsere Verdünnungsreihen verwendeten.

Für Stock 1 lösten wir 5mg Substanz in 500ul DMSO und 4,5 ml PBS. Er erhielt damit eine Endsubstanzkonzentration von 1mg/ml.

Stock 2 sollte eine Endsubstanzkonzentration von 10ug/ml enthalten, wozu wir 10ul Stock 1-Lösung mit 990ul PBS 1X in Lösung brachten.

## **I.2 Bestimmung der IC 50 / Verdünnungsreihen**

Der IC50-Wert ist derjenige Wert, bei dem 50% der Zellproliferation durch eine zugegebene Substanz inhibiert wird und ist damit ein Maß für das antiproliferative Potential einer Substanz.

Hierzu haben wir eine grobgefächerte Verdünnungsreihe aufgestellt, mit der wir herausfinden wollten, ab welchen Konzentrationen der zugegebenen Inhaltsstoffe die Proliferationshemmung stattfindet. Diesen Bereich haben wir dann weiter aufgeschlüsselt und untersucht. Ziel war es, genau herauszufinden, ab welcher Dosis ein Inhaltsstoff eine Zellwachstumshemmung erreicht.

## **I.3 Jurkatzellen**

Jurkatzellen sind humane T- Zell – Leukämiezellen, die sehr schnell wachsen (splitting:

1:10,2 x pro Woche) und als Suspensionszellen in c`RPMI- Medium mit 10% FCS (Seromed) bei 37° C gezüchtet werden.



#### **I. 4 Proliferationsassay**

Mit diesem Assay bestimmten wir das Zellwachstum unterschiedlicher von uns hierfür angezuchteter Zelllinien (s.o.) bei Zugabe der Johanniskrautinhaltsstoffe in steigenden Konzentrationen und quantifizierten die Proliferationshemmung durch Johanniskrautinhaltsstoffe.

##### Zellpräparation:

Nach Anzuchtung von Zelllinien in RPMI'-Medium im Brutschrank bei 37°C haben wir diese täglich unter dem Mikroskop beobachtet und in frische Zellkulturflaschen umgesetzt, wobei wir die Zellsuspension in konstantem Verhältnis mit frischem RPMI'-Medium versetzten.

##### Zentrifugation und Zellwaschung:

Dies führten wir je zwei Mal mit PBS-Buffer durch bis der Überstand klar war. Im Anschluß lösten wir die Pellets (abzentrifugierte Zellen am Boden des Zentrifugationsröhrchens) in 2ml RPMI'-Medium zu einer einheitlichen Zellsuspension auf.

##### Zellzählung und Ausplattierung:

Je nach Konzentration der Zellsuspension bzw. Zellausbeute berechneten wir im Dreisatz die notwendige Menge und Konzentration der Zellsuspension, die wir für unser Experiment benötigten. Wir bezogen uns dabei auf die Zielvorgabe von 20 000 benötigten Zellen/well bei Jurkatzellen und Zellen/well bei PBMC-Zellen (Beschreibung der verwendeten Zelllinien siehe unten). Die Zellsuspension pipetierten wir anschließend gleichmäßig in 96-well Flachboden-Mikrotiterplatten, wobei jedes well die gleiche Menge an Zellsuspension erhielt. Die Zellen wurden anschließend bei 37°C eine Stunde lang inkubiert. Nach Schema pipetierten wir die jeweiligen Johanniskrautinhaltsstoffe in 96-well Flachboden-Mikrotiterplatten, wobei wir von jedem Johanniskrautinhaltsstoff aus den vorbereiteten Stocks eine

ansteigende Konzentrationsreihe von vier Konzentrationen erstellen (z.B. 0,1ug/ml – 1ug/ml – 10ug/ml – 100ug/ml). Die Höhe der Konzentrationen war abhängig davon, ob wir -wie zu Beginn- ein allgemeines Screening durchführen wollten, bei dem jede Substanz mit der gleichen oben genannten Verdünnungsreihe getestet wurde oder ob wir nach Bestimmung der IC50 einen kleineren Bereich genauer untersuchen wollten. Zusätzlich ließen wir immer eine Lösungsmittelkontrolle mitlaufen und eine Reihe Zellsuspension ohne jede weitere Zugabe. Diese sechs Vergleichsfelder vervierfachten wir für jedes Experiment, d.h. wir führten parallel vier gleiche Experimente zu jedem zu untersuchenden Inhaltsstoff durch, um Zufallsfehler wie Pipetierfehler o.ä. möglichst gering zu halten.

Nach Zugabe der Inhaltsstoffe inkubierten wir die Zellen bei 37°C über Nacht. Am nächsten Morgen führten wir dann den Proliferationsassay entweder mit 3H-Thymidin oder als BrdU-ELISA durch.

## **I. 5 3H- Thymidinproliferationsassay**

Der 3H-Thymidinproliferationsassay ist ein radioaktiver Proliferationstest, bei dem durch die Inkorporation von radioaktiv-markiertem Thymidin in die Zell-DNA die DNA- Synthese quantifiziert werden kann. Dem Zellkulturmedium zugefügtes [3H]-Thymidin wird während der Replikation in die DNA eingebaut. Die bei der Zellyse freigesetzten DNA-Bruchstücke lassen sich aufgrund der radioaktiven Markierung im Szintillationszähler quantifizieren. Je nach Dauer der Inkubation mit [3H]-Thymidin benötigt man zur Durchführung und Auswertung dieses Assays neun bis 25 Stunden.

Da die genomische DNA *in vivo* im Rahmen der Replikation markiert wird, können nur teilungsaktive Zellen für diese Methode verwendet werden. Er ist den colometrischen Proliferationstests (s.u.) an Genauigkeit überlegen. Deshalb führten wir zum größten Teil unsere Proliferationshemmtests mit dieser Methode durch und verwendeten den BrdU-Elisa als zusätzlichen Test zur Verifizierung der Ergebnisse.

Zur Durchführung:

Am Morgen nach Inkubation über Nacht gaben wir im Radioaktiv-Labor 20ul/well <sup>3</sup>H-Thymidin zu und ließen nochmals über Nacht bei 37°C inkubieren. Für das Zellwachstum, das bei Inkubation stattfindet, benötigen die Zellen Nährstoffe und Bausteine für die DNA-Synthese. Dabei wird das radioaktive Thymidin in die Zellen aufgenommen und während der Synthesephase in die DNA eingebaut. Die inkorporierte Menge an radioaktivem Thymidin kann gemessen werden und korreliert mit der Zellmenge. Dadurch lässt sich das Ausmaß der Proliferationshemmung messen. Dies geschieht durch das sog. Ernten (Überführen der in den einzelnen wells enthaltenen radioaktiven Zellsuspension auf spezielle Messplatten, die vom  $\beta$ -Counter ausgewertet werden können) und anschließende Radioaktivitätsmessung im  $\beta$ -Counter.

## **I. 6 BrdU-Elisa**

Der BrdU- Proliferationsassay ist ein colometrischer Proliferationstest, bei dem durch Inkorporation von 5-bromo-2-deoxyuridine (BrdU) die DNA-Synthese und damit die Zellproliferation mittels ELISA gemessen werden kann.

Voraussetzung ist die Fähigkeit der verwendeten Zellen das BrdU nach der Zellyse in ihre DNA einzubauen. Spectrophotometrisch wird dann das Zellwachstum quantitativ bestimmt, wobei die ermittelte Absorption genau mit der Zellzahl korreliert. Verwendet wird dieses Verfahren zur Quantifizierung der Wachstumsstimulierung durch Zytokine, Wachstumsfaktoren oder Nährstoffe sowie zur Bestimmung der Zytotoxizität und Proliferationshemmung bestimmter Substanzen und ist damit eine nicht-radioaktive Alternative zum oben beschrieben <sup>3</sup>H-Thymidinassay. Die radioaktive Markierung, die im Falle von [<sup>3</sup>H]-Thymidin eine besonders aufwendige Entsorgung der radioaktiven Abfälle erforderlich macht, kann man durch Verwendung des Thymidinanalogs Bromdesoxyuridin, BrdU, ersetzen. In diesem Fall werden die in den Zellkulturüberstand freigesetzten DNA-Bruchstücke über spezifische Antikörper gegen BrdU nachgewiesen.

Die Sensitivität entspricht dem des radioaktiven Proliferationstests (schon geringe Zellzahlen können gemessen werden), zeigt aber eine signifikant geringere Variabilität im einzelnen sowie zwischen den einzelnen Experimenten und einen niedrigeren background.

Im Labor sah die Versuchsdurchführung folgendermaßen aus:

Wir verwendeten für unsere Experimente den „BrdU Cell Proliferation ELISA“ von Boehringer Mannheim. Für die Zellkultivierung stellten wir die Jurkatzelllinie auf 100 000Zellen/ml, die PBMC-Zellen auf 1 000 000/ml ein.

Nach den oben beschriebenen Vorarbeiten und der Zellinkubation bei 37°C über Nacht zentrifugierten wir die Zellen 10 min bei 1000 Umdrehungen (acc. 6; dec. 3), kippten den Überstand ab und gaben 200ul „Fixative/Denaturierungs-Solution“/well hinzu. Anschließend ließen wir die Suspension 30 min auf dem Schüttler bei Raumtemperatur inkubieren und gaben dann 100ul/well „Anti-BrdU 100X-Antibody Dilution –Buffer“ hinzu, ein Antikörper gegen BrdU. Nach einer Stunde Inkubation folgten vier Waschschrte mit „Wash-Buffer“, in deren Anschluß wir 100ul/well „conjugate diluent plus peroxidase goat anti-mouse IgG HRP- conjugate“ zugaben und 30 min inkubierten.

Nach vier weiteren Waschschrten versetzten wir das ganze mit 100ul/well „substrate solution“, inkubierten 15 min bei Dunkelheit und bestimmten im Spectrophotometer nach Zugabe von „stopp solution“ bei 450-540nm die Absorption.

## **I.7 Apoptoseassay**

Der Apoptoseassay ist für die Reinigung von Nukleinsäuren aus kultivierten Zellen bestimmt. Nach der Lyse der Zellen in Binde-Puffer haben wir das Lysat in ein Filterröhrchen mit Glasfaser-Vlies übertragen und durch Zentrifugation durch das Glasfaser-Vlies getrieben. Die Nukleinsäuren binden dann in Gegenwart eines chaotropen Salzes an die Oberfläche der Glasfasern. In einem Waschschrift haben wir verbleibende Verunreinigungen entfernt und die DNA anschließend in Elutionspuffer gelöst.

An verschiedenen Zellkulturmodellen und am histologischen Präparat kann induzierte oder spontane Apoptose bestimmt werden. Mit dem Nukleosomennachweis (Apoptose-Detection-kit) wird an Zellkulturen die DNA-Fragmentierung quantitativ bestimmt. Dabei erfolgt über die Analyse des Zellüberstandes eine sichere Abgrenzung gegenüber der Nekrose. Um Fehler bei der Interpretation auszuschließen, arbeiteten wir parallel mit weiteren Techniken zur Bestimmung der Chromatinfragmente und der enzymatischen Aktivität von Caspasen (ELISA). Zur Bestimmung der Apoptose-vermittelten Signale in der Frühphase verwenden wir ein Substrat des Apopains (CPP-32), das nach Spaltung fluoresziert

## **I.8 Caspase- Inhibitoren**

Durch die Hemmung von Caspasen kann das Apoptoseprogramm unterbrochen werden. Zur Bestimmung der Apoptose-vermittelten Signale in der Frühphase verwenden wir ein Substrat des Apopains (CPP-32), das nach Spaltung fluoresziert. Zellen, die in Apoptose gegangen sind werden zuerst lysiert, um die intrazellulären Bestandteile zu gewinnen. Wir haben das Zellysat dann auf Proteaseaktivität getestet, indem wir ein caspasespezifisches Peptid hinzugefügt haben, das an ein farbiges Molekül p-nitroanilide gebunden ist. Die Spaltung des Peptids durch Caspase setzt das p-NA frei, welches dann spectrometrisch bei einer Wellenlänge von 405 nm quantitativ gemessen

werden kann. Die Farbreaktion ist dann der Caspaseaktivität direkt proportional.

### **I. 9 Toxizitätsassay (LDH-Release)**

Der Nachweis des Zelluntergangs durch Apoptose kann entweder direkt durch Apoptosenachweis im Apoptoseassay oder durch Caspaseinhibitoren erfolgen oder indirekt über den Ausschluß eindeutiger Nekrosezeichen wie dies der Anstieg der zytoplasmatischen LDH-Konzentration ist. Während die Nucleosomen apoptotischer Zellen im Zytoplasma zurückgehalten werden, geben die nekrotischen Zellen ihre DNA-Fragmente direkt in den Zellkulturüberstand ab.

Der LDH-Release beruht daher auf der Tatsache, daß die Zerstörung der Cytoplasmamembran zur Freisetzung cytoplasmatischer Bestandteile führt. Auf diese Weise gelangen auch cytoplasmatische Enzyme in das Zellkulturmedium. Die Freisetzung der Enzyme kann man durch den spezifischen Nachweis ihrer Aktivität quantifizieren. Das Enzym Lactatdehydrogenase LDH ist auch außerhalb der Zelle sehr stabil. Seine Freisetzung kann man durch den spezifischen Nachweis seiner Aktivität quantifizieren. Im LDH-Release-Assay wird die Aktivität des Enzyms durch die Umsetzung eines Formazansalzes nachgewiesen. Dadurch kommt es zu einem Farbumschlag des gelösten Salzes, den man in einem Photometer quantifizieren kann. Der LDH-Release-Assay wird mit Zellen in Mikrotiterplatten durchgeführt. Wir inkubierten die Zellen zunächst mit den verschiedenen Johanniskrautinhaltsstoffen. Während der Inkubationszeit wird LDH durch die Zerstörung der Cytoplasmamembran freigesetzt. Anschließend wurden die Zellen abzentrifugiert.

Ein Teil des Zellkulturüberstandes haben wir abgezogen und in Eppendorfhütchen überführt. Hierin erfolgt die Inkubation mit Natriumlactat, NAD<sup>+</sup>, Jodtetrazolchlorid (INT) und Diaphorase. Die aus den Zellen freigesetzte LDH setzt das Natriumlactat mit NAD<sup>+</sup> als Coenzym zu Pyruvat um. Dabei entstehen NADH und positiv geladener Wasserstoff. Die

Wasserstoffatome werden von der Diaphorase zur Reduktion des Jodtetrazolchlorids eingesetzt. Während das Tetrazoliumsalz eher orange ist, besitzt das gebildete Formazansalz eine rote Farbe. Dieser Farbumschlag läßt sich in einem Photometer bei 490 Nanometer quantifizieren. Bei diesem Assay-Verfahren ist keine vorherige Markierung der Zellen notwendig, und auch alle Nachteile des Arbeitens mit radioaktiven Substanzen entfallen

Der Meßbereich ist über einen weiten Bereich linear. Für den LDH-Release-Assay sind mindestens 103 bis 104 Zellen pro Vertiefung der Mikrotiterplatte notwendig. Da ausschließlich LDH-Aktivität quantifiziert wird, korrelieren die im Photometer gemessenen Werte sehr gut mit der Zelltodrate.

## **I. 10 Statistische Methoden**

Zunächst wurden die Meßwerte bezüglich ihrer Kontrollmessungen korrigiert. Hierzu wurde von jedem Meßwert die interne Negativkontrolle der Zellproliferation abgezogen. Von allen derartig korrigierten Meßwerten wurde dann der Mittelwert der externen Proliferationshemmung bestimmt. Insgesamt wurden alle Messungen in Quadruplicaten durchgeführt und 2-3 Mal, mindestens jedoch einmal wiederholt. Zur Bestimmung der Mittelwerte sowie der Standardabweichung lagen uns daher mindestens acht Einzelwerte vor. Die deskriptiven Analysen beruhen auf den Mittelwerten der jeweiligen korrigierten Proliferationsmessungen. Diese Daten wurden unter MS-EXEL elektronisch erfasst und in das statistische Auswertungsprogramm SAS eingelesen und dort weiterverarbeitet.

## II. Ergebnisse Experimenteller Teil

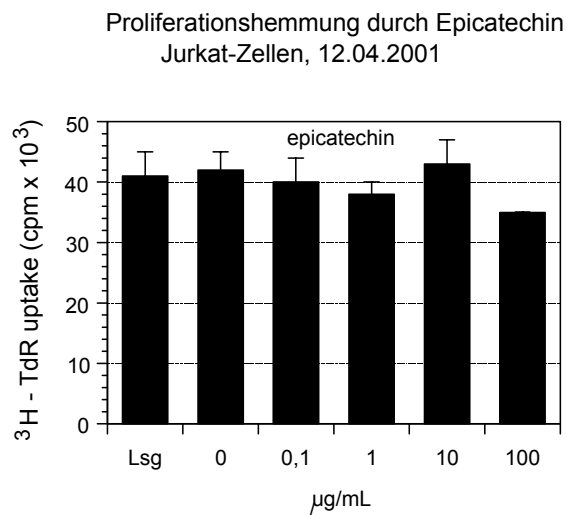
### 1. In-vitro-Untersuchungen zu Johanniskrautinhaltsstoffen

#### 1.1 Proliferationsverhalten von Jurkat-Zellen durch einen im Johanniskraut enthaltenen Gerbstoff

Als Sceningreihe wählten wir die folgenden Konzentrationen an Johanniskrautinhaltsstoff: nur Lösungsmittel – 0 ug/ml – 0,1 ug/ml – 1 ug/ml – 10 ug/ml – 100 ug/ml Pflanzeninhaltsstoff.

#### Epicatechin

Bei Zugabe des Johanniskrautinhaltsstoff Epicatechin konnten wir keine eindeutige Proliferationshemmung im untersuchten Bereich feststellen. Bei Konzentrationen im Bereich von 0,1ug/ml – 100ug/ml blieb die <sup>3</sup>H-Thymidin-Inkorporation der von uns untersuchten Zelllinien ohne wesentliche Veränderung.



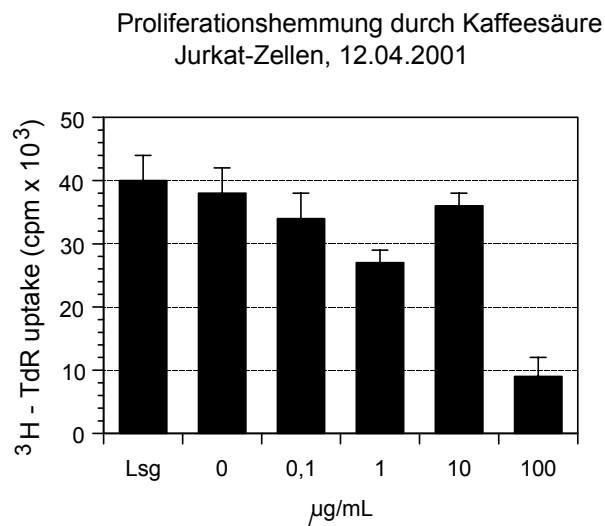
**Abb. 13 Proliferationsassay Epicatechin**



## 1.2 Proliferationsverhalten von Jurkat-Zellen durch im Johanniskraut enthaltene Pflanzensäuren

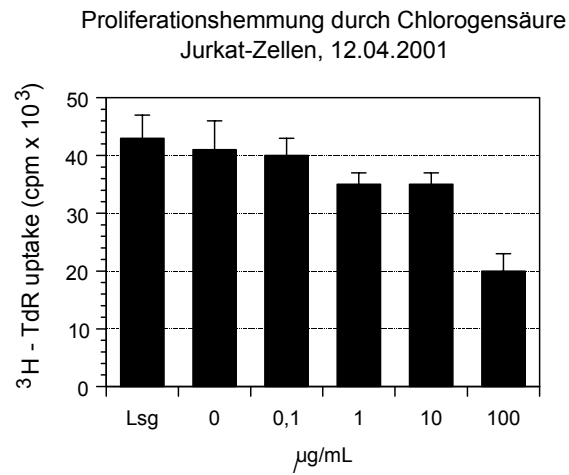
Als Sceningreihe wählten wir auch hier die Konzentrationsreihe: nur Lösungsmittel – 0 ug/ml – 0,1 ug/ml – 1 ug/ml – 10 ug/ml – 100 ug/ml Pflanzeninhaltsstoff.

Der Johanniskrautinhaltsstoff Kaffeesäure hatte im Screeningbereich keinen wesentlichen Einfluß auf das Proliferationsverhalten der verwendeten Zelllinien und blieb bei Konzentrationen im Bereich von von 0,1ug/ml – 100ug/ml ohne wesentliche Änderung in der DNA-Syntheserate.



**Abb. 14 Proliferationsassay Kaffeesäure**

Durch den Johanniskrautinhaltsstoff Chlorogensäure konnte kein entscheidender Effekt auf das Proliferationsverhalten der Zelllinien im untersuchten Bereich ausgelöst werden.

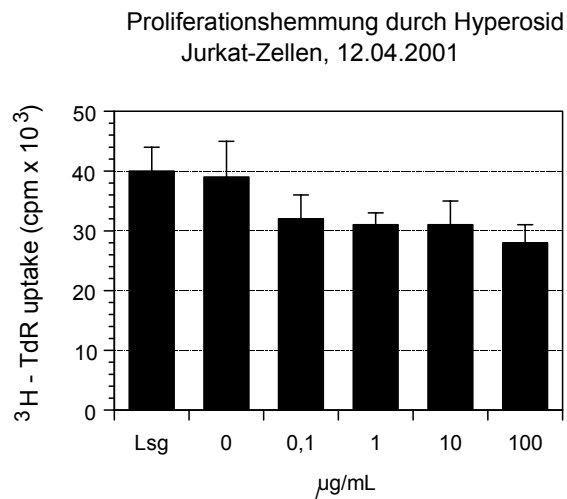


**Abb. 15 Proliferationsassay Chlorogensäure**

### 1.3 Proliferationsverhalten von Tumorzelllinien bei Zugabe von Flavonoiden des Johanniskraut

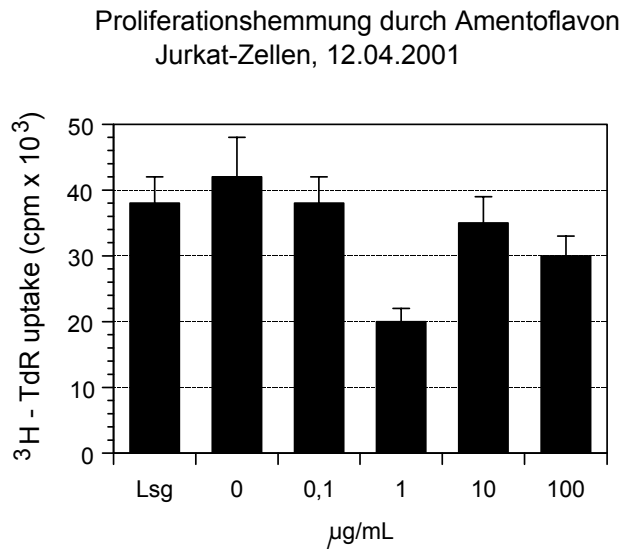
Als Sceeningreihe wählten wir für alle Flavonoide die folgenden Konzentrationen: nur Lösungsmittel – 0 ug/ml – 0,1 ug/ml – 1 ug/ml – 10 ug/ml – 100 ug/ml Pflanzeninhaltsstoff.

Der Johanniskrautinhaltsstoff Hyperosid zeigte im Proliferationsassay keine eindeutige Proliferationshemmung und blieb bei Konzentrationen im Bereich von von 0,1ug/ml – 100ug/ml ohne Änderung in der <sup>3</sup>H-Thymidin-Inkorporation.



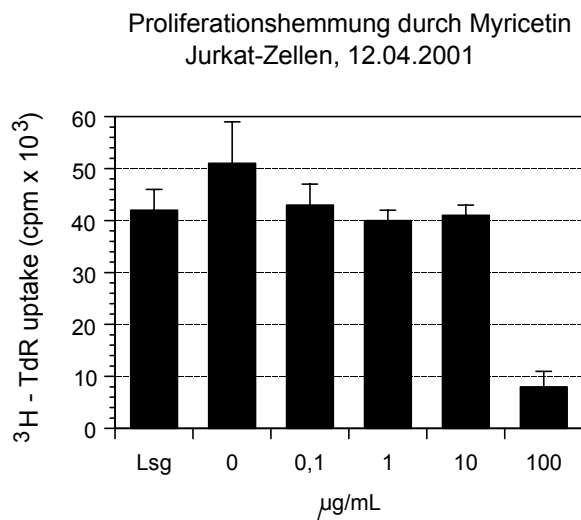
**Abb. 16 Proliferationshemmung durch Hyperosid**

Bei Zugabe des Johanniskrautinhaltsstoff Amentoflavon zeigte sich keine wesentliche Proliferationsinhibierung auf die Tumorzelllinien im Bereich der von uns verwendeten Konzentrationen.



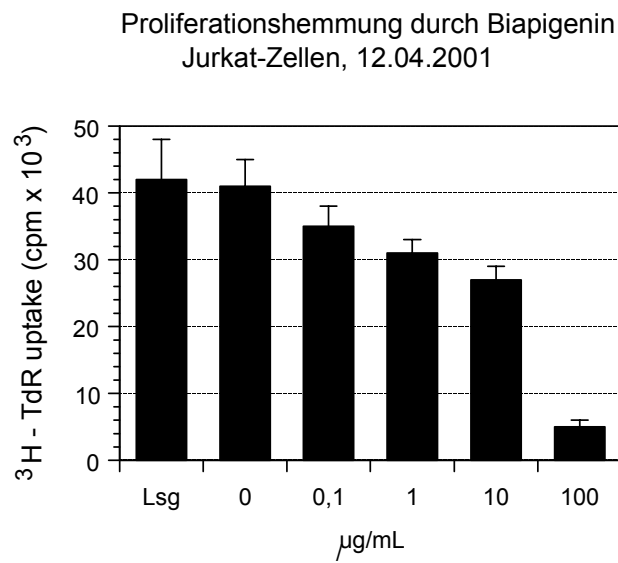
**Abb. 17 Proliferationshemmung durch Amentoflavon**

Durch den Johanniskrautinhaltsstoff Myricetin wurde erst im Bereich von 100 µg/ml ein eindeutig proliferationshemmender Effekt auf in-vitro-Zellen ausgelöst.



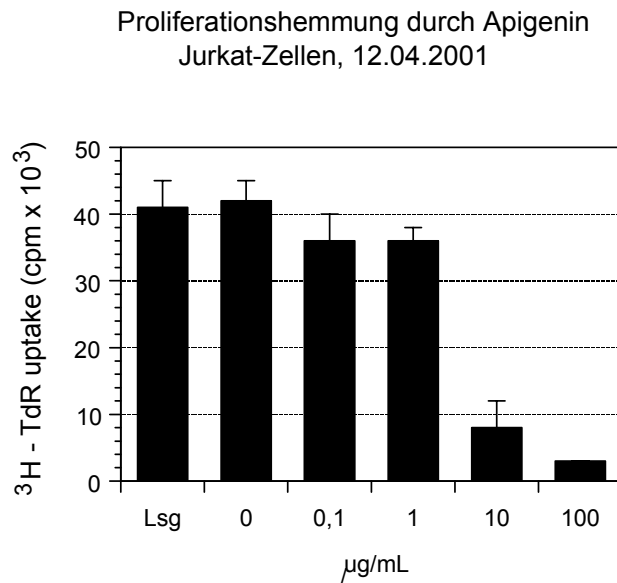
**Abb. 18 Proliferationshemmung durch Myricetin**

Bei Zugabe des Johanniskrautinhaltstoff Biapigenin konnten wir eine kontinuierliche Abnahme der Zellzahl feststellen, eine bedeutende Abnahme war allerdings erst bei Konzentrationen von 100  $\mu\text{g/ml}$  nachzuweisen.



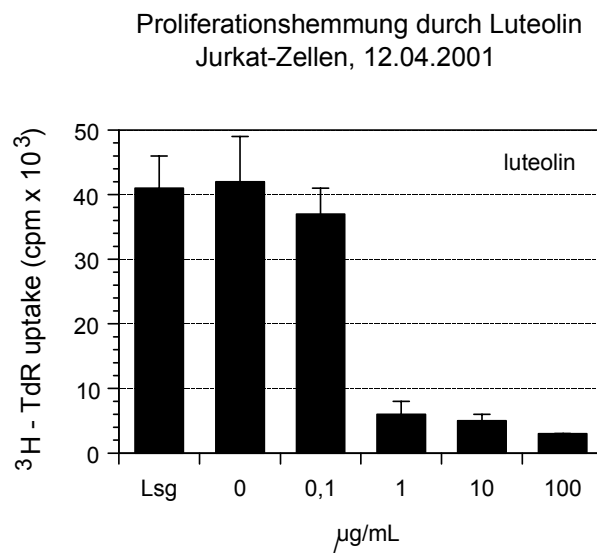
**Abb. 19 Proliferationshemmung durch Biapigenin**

Bei Zugabe von Apigenin stellten wir im Proliferationsassay eine Proliferationshemmung bereits im Bereich von 10 µg/ml fest. Die DNA-Syntheserate wurde ab dieser Konzentration Apigenin in der Zellsuspension dosisabhängig deutlich inhibiert.



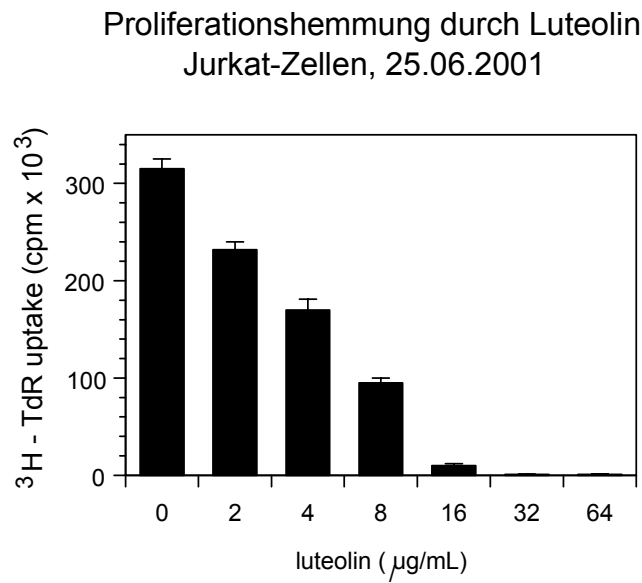
**Abb. 20 Proliferationshemmung durch Apigenin in Jurkatzellen**

Beim Johanniskrautinhaltsstoff Luteolin stellten wir die in unserem Screening effektivste und stärkste Proliferationshemmung im Proliferationsassay - sowohl im  $^3\text{H}$ -Thymidineinbau sowie im BRDU-ELISA - fest. Die dosisabhängige Proliferationsinhibierung trat schon bei Luteolinkonzentrationen von 1  $\mu\text{g}/\text{ml}$  ein und zeigte im Vergleich zu den Messwerten bei 0,1  $\mu\text{g}/\text{ml}$  einen deutlichen Abfall.



**Abb. 21 Proliferationshemmung durch Luteolin in Jurkatzellen**

Den steilen Abfall der Proliferationsmesswerte zwischen den Luteolinkonzentrationen von 0,1  $\mu\text{g/ml}$  und 1  $\mu\text{g/ml}$  schlüsselten wir mit einer neuen Konzentrationsreihe ( 0  $\mu\text{g/ml}$  – 2  $\mu\text{g/ml}$  – 4  $\mu\text{g/ml}$  – 8  $\mu\text{g/ml}$  – 16  $\mu\text{g/ml}$  – 32  $\mu\text{g/ml}$  – 64  $\mu\text{g/ml}$  ) genauer auf.



**Abb. 22 Bestimmung der IC 50 von Luteolin (Jurkat-Zellen)**



#### 1.4 Ausschluß einer durch Luteolin induzierten Nekrose

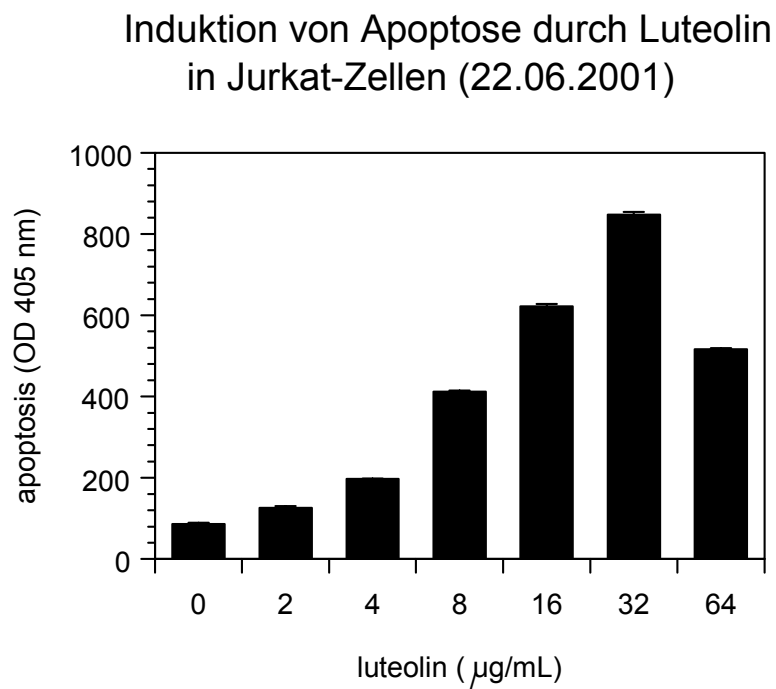
**Tabelle 8: LDH-Freisetzung bei Luteolinzugabe**

<b>Luteolinkonzentration (ug/ml)</b>	<b>LDH-Wert (U/l)</b>
<b>0</b>	<b>15</b>
<b>2</b>	<b>8,5</b>
<b>4</b>	<b>11,5</b>
<b>8</b>	<b>17</b>
<b>16</b>	<b>26</b>
<b>32</b>	<b>23</b>
<b>64</b>	<b>18,5</b>

Durch einen fehlenden eindeutigen Anstieg der zytoplasmatischen LDH-Konzentration verschiedener Zelllinien unter Luteolinzugabe konnten wir Nekrose durch Toxizität der Substanz ausschließen und den Nachweis des Zelltods durch Apoptose verifizieren. Der leichte Anstieg der LDH-Konzentration mit zunehmender Luteolinkonzentration ist im Zusammenhang mit einem Übergang von Apoptose in Nekrose bei massivem Zelltod durch Apoptose zu sehen.

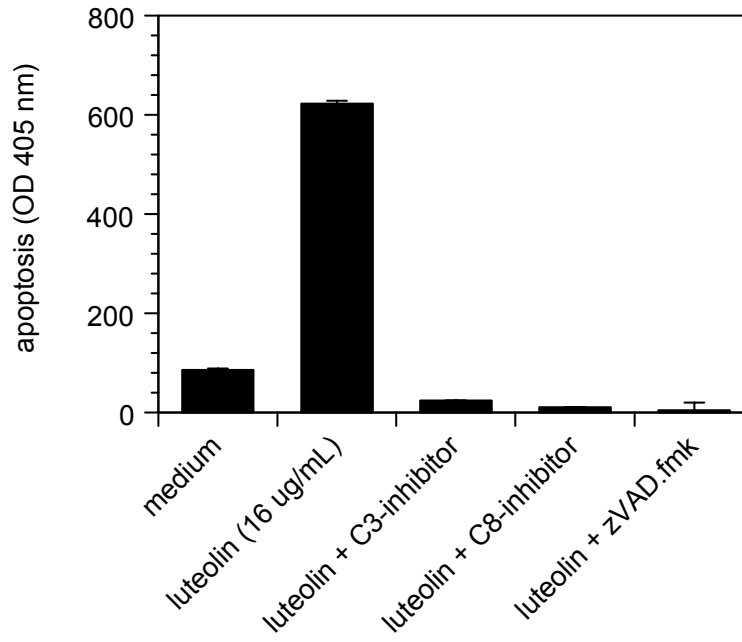
### 1.5 Caspase-vermittelte Apoptose durch Luteolin

Die Wirkung der Apoptose auslösenden Substanz Luteolin auf die Apopainaktivität in Jurkatzellen ist nachfolgend gezeigt. Jurkatzellen werden hierfür kultiviert und nach 12 h Anheftung mit den entsprechenden Substanzen zeitabhängig inkubiert. Nach den entsprechenden Zeitintervallen werden die Zellen gewaschen, homogenisiert und die Apopainaktivität mittels Fluoreszenzdetektion der Spaltprodukte bestimmt.



**Abb. 23 Induktion von Apoptose durch Luteolin in Jurkatzellen**

Die Luteolin-induzierte Apoptose ist  
Caspase-abhängig (Jurkat, 22.06.2001)



**Abb. 24 Die Luteolin-induzierte Apoptose ist Caspase-abhängig**

## E Diskussion

### I. Klinischer Teil

Schon in der ersten Anwendungsbeobachtungsstudie zeigte sich eine bessere Wirkung einer auf 1,5% Hyperforin eingestellten Johanniskrautcreme gegenüber Plazebo bei der Behandlung der Atopischen Dermatitis. Trotz der relativ geringen Patientenzahl (n=18) ermöglicht das Halbseitendesign einen intraindividuellen Vergleich, bei dem (halbseitige) psychologische Effekte weitgehend ausgeschlossen sind. Im Vergleich zu den wenigen anderen Studien, bei denen die Wirkung von Phytotherapeutika auf Ekzemkrankheiten untersucht wurde, ist dies nach unserer Kenntnis die einzige Studie, die einen eindeutigen Vorteil eines Phytotherapeutikums gegenüber Plazebo zeigt. Dies ist als großer Erfolg auf dem Weg der Verbesserung und Weiterentwicklung therapeutischer Optionen bei leichten bis mittelschweren inflammatorischen Ekzeme zu werten.

Im folgenden soll ein kurzer Überblick über die bisherigen Studien mit Phytotherapeutika bei Ekzemkrankheiten gegeben werden. *Hamamelis virginiana* L. enthält verschiedene Gerbstoffe, unter denen besonders Hamamelitannine von Bedeutung sind (Schneider 1999). In einer randomisierten Doppelblind-Studie wurden 22 Neurodermitis-Patienten mit Hamamelissalbe im Vergleich zu dem Antiphlogistikum Bufexamac im Halbseitenvergleich behandelt. Die Behandlungsdauer war nicht einheitlich und betrug 5 bis 22 Tage. Es zeigte sich eine dem Bufexamac vergleichbare Besserung des Ekzemescores durch die Hamamelissalbe (Swoboda 1991). In einer dreiarmligen randomisierten Doppelblind-Studie wurden je 36 Patienten mit Atopischer Dermatitis entweder mit Hamamelisdestillat-Creme, 0,5% Hydrokortison-Creme oder Vehikel über 14 Tage behandelt. Die Hamamelisdestillat-Creme war im Vergleich zu Hydrocortison deutlich

schwächer wirksam und nicht signifikant vom Vehikel verschieden (Korting 1995). Weitere in der Ekzemtherapie verwendete Phytopräparate sind Kamille, Bittersüss und Ringelblume. Die Kamille (*Matricaria recutita* L.) enthält ätherische Öle (vor allem alpha-Bisabolol und Chamazulen) und Flavonoide (hauptsächlich Apigenin) (Schneider 1999). Äußerlich wird die Kamille wegen ihrer entzündungshemmenden Eigenschaften bei schlecht heilenden Wunden und kleinen Hautverletzungen angewendet.

In einer dreiarmligen vergleichenden Prüfung (Halbseitendesign) bei der Erhaltungstherapie von Ekzemerkrankungen war eine Kamillencreme so wirksam wie eine 0,25%ige Hydrocortisoncreme und wirksamer als eine 0,75%ige Fluocortinbutylester-Creme bzw. eine 5%ige Bufexamac-Creme. Allerdings wurden bei dieser Studie alle Patienten mit einer 0,1%igen Diflucortolonvalerat-Creme vorbehandelt, der Zeitraum der Vorbehandlung (3 bis 14 Tage) und Nachbehandlung (3 bis 4 Wochen) war unterschiedlich lang und die Vergleichskollektive waren unterschiedlich groß (72, 58, 31 Patienten) (Aertgeerts 1985). Die Ergebnisse sind deshalb mit großer Zurückhaltung zu interpretieren.

Dieselbe Kamillencreme wurde in einer monozentrischen vierarmigen teilweise doppelblinden Phase III-Studie im Halbseitenvergleich mit der entsprechenden Grundlage (Placebo) und einer 0,5%igen Hydrocortisoncreme bei Patienten mit atopischer Dermatitis angewendet. Insgesamt wurden 72 Patienten eingeschlossen und über zwei Wochen behandelt. Die Kamillencreme war der Hydrocortisoncreme leicht überlegen, der eigenen Grundlage gegenüber war sie jedoch nur grenzwertig überlegen. Über die Signifikanz der Unterschiede werden in der Publikation keine Aussagen gemacht (Patzelt-Wenzler 2000). Die Ringelblume (*Calendula officinalis* L.) enthält Flavonoide (Flavonol, Glykoside), die sich vom Quercetin und Isorhamnetin ableiten, außerdem Triterpenglykoside, Triterpenalkohole, Carotinoide, ätherisches Öl und Polysaccharide (Schneider 1999). Traditionell wird Ringelblumensalbe bei der Behandlung von Ekzemen, schlecht heilenden oder eiternden Wunden, sowie Verbrennungen und Krampfadern eingesetzt. Es gibt hierzu jedoch bisher keine klinischen Prüfungen, die eine Wirksamkeit bei diesen Indikationen belegen. Auch *Solanum dulcama* L. (Bittersüss)-Creme wird zur Behandlung der Neurodermitis verwendet. Jedoch ist die

entzündungshemmende Wirkung der Bittersüß-Steroidalkaloide und –saponine bisher nicht durch kontrollierte klinische Studien belegt und der postulierte Wirkmechanismus umstritten (Niedner 1996).

Das im Vergleich zu Plazebo signifikant bessere Abschneiden der Hyperforincreme in der ersten Anwendungsbeobachtung ist insofern beachtlich, als es in der dermatologischen Lokalthherapie keine Plazebos im eigentlichen Sinne, sondern nur blande Grundlagen gibt. Es ist bekannt, daß gerade bei Ekzemkrankheiten mit der richtigen Wahl der Grundlage erhebliche therapeutische Effekte erzielt werden können (Patzelt-Wenzler 2000, Thumm 2000), was sich auch bei der vorliegenden Studie bestätigt. Auch die Erfahrung, daß im Halbseitendesign die nicht behandelte bzw. Plazebo-behandelte Seite der mit Verum behandelten Seite im Verlauf der Behandlung nachzieht, wird hier bestätigt: es zeigt sich eine kontinuierliche Verringerung des Unterschiedes zwischen Verum und Plazebo im Verlauf der Behandlung, erkennbar an der Abnahme des Signifikanzniveaus an Tag 7, 14 und 28. Vorteile der hier getesteten Hyperforincreme sind das Fehlen einer Photosensibilisierung durch Verwendung eines hypericinfreien Johanniskrautextraktes und ein wahrscheinlich sehr geringes Sensibilisierungsrisiko, da typische pflanzliche Allergene wie Sesquiterpenlaktone, Terpene und Polyacetylene (Übersicht bei Schempp 2002/2) im Extrakt fehlen. Auch sind Sensibilisierungen gegenüber traditionell angewendetem Johanniskrautöl nicht bekannt.

Nach unserer Einschätzung besteht für ein topisches Phytotherapeutikum wie die hier vorgestellte Hyperforincreme ein besonderer hoher Bedarf bei der Behandlung der kindlichen Atopischen Dermatitis, da einerseits die (zum Teil berechnigte) Kortikophobie der Eltern zunimmt, andererseits die häufig von Pädiatern eingesetzte Alternative Bufexamac ein relativ hohes Sensibilisierungsrisiko bei geringer Wirksamkeit aufweist (Gniazdowska 1999). Zusammenfassend wurde im Halbseitenvergleich eine gegenüber der Grundlage signifikant bessere Wirkung der hyperforinreichen Johanniskrautcreme nachgewiesen. Dies war der Anlass, Johanniskrautcreme als Phytotherapeutikum bei der Behandlung der leichten bis mittelschweren Atopischen Dermatitis an einem grösseren Patientenkollektiv im Rahmen einer doppelblinden Phase-II-Studie zu untersuchen.

Aus den Ergebnissen der auf die Pilotstudie folgenden Phase-II-Studie lässt sich entnehmen, dass sich die Wirksamkeit von Johanniskrautcreme (Verum 1 als apolarer [5%ig] und Verum 2 als polarer [0,5%] Hypericum-Extrakt) bei Atopischer Dermatitis – wie in der Anwendungsstudie bereits zu vermuten war - in unserer placebokontrollierten Doppelblindstudie signifikant gegenüber den jeweiligen Placebos durchsetzte ( $p < 0,05$ ). Im Halbseitenvergleich wurde eine gegenüber der Grundlage signifikant bessere Wirkung der hyperforinreichen Johanniskrautcreme nachgewiesen.

Es ist damit der empirische Beweis gelungen, dass eine hyperforinreiche Johanniskrautcreme eine wirksame pflanzliche Alternative bei der Behandlung der leichten bis mittelschweren Neurodermitis darstellt. Pflanzliche Alternativtherapeutika zu der klassischen topischen Corticosteroidtherapie sind wegen der oft schwerwiegenden Nebenwirkungen langjähriger Lokalthherapie sowie der nach wie vor ablehnenden Haltung der Bevölkerung gegenüber Corticosteroiden allgemein sehr gefragt und eine große Hilfe und Erleichterung für die Patienten im Sinne einer positiveren Einstellung zur Therapie mit der Folge besserer Compliance. Bei schweren Fällen und akuter starker Exazerbation ist jedoch die Corticoidtherapie nach wie vor unverzichtbar.

Die Studien sind in Übereinstimmung mit den von unserer Arbeitsgruppe bisher veröffentlichten Erkenntnissen zu sehen, die ich bereits in dem Kapitel Hintergründe erwähnt habe. Es handelt sich dabei um die antibakterielle Wirksamkeit des im Johanniskraut enthaltenden Hyperforins, welches auch die allostimulatorische Kapazität epidermaler Zellen inhibiert, sowie um topisch immunmodulatorische Wirkung in der Größenordnung der UV-induzierten Immunsuppression.

Diese von Schempp et al untersuchten Wirkungen waren die Voraussetzung für die Annahme, dass lokal appliziertes *Hypericum perforatum* durch seine immunmodulatorische und antibakterielle Wirkung bei Atopischer Dermatitis wirksam sein könnte, was wir durch unsere Studien folgerichtig belegen konnten.

Zur Feststellung der exakten Potenz einer solchen Creme müssen allerdings noch weiterführende Studien mit noch größeren Patientenkollektiven und der Vergleich mit einer Standardtherapie (Korticosteroid) erfolgen.

Trotz der Signifikanz der Ergebnisse war die vergleichende Bewertung der beiden Verumpräparate hinsichtlich ihrer Wirksamkeit schwierig. So zeigte Verum 1 eine stärkere Wirksamkeit im Vergleich zu Placebo 1 als dies bei Verum 2 und Placebo 2 der Fall war. Dieser Unterschied zeigte sich allerdings erst nach Adjustierung auf das jeweilige Placebo. Gründe dafür liegen in der unterschiedlichen Wirksamkeit der beiden Placebos, die mit statistischen Verfahren nur unzureichend wiedergegeben werden können. Erst die Adjustierung auf das jeweilige Placebo als Differenz der Differenzen ergab sich für alle Visiten ein signifikanter Unterschied. Placebo 2 scheint demnach gegenüber Placebo 1 eine bessere Wirksamkeit zu haben.

Zwar versuchte man bei der Salbenherstellung die Placebos (lat. Placebo = ich werde gefallen) als sog. Scheinmedikament pharmakologisch unwirksam, also indifferent zu gestalten. Dies ist doch besonders im dermatologischen Bereich deshalb schwierig, weil schon allein die Salbengrundlage, die unter anderem Neutralöle und Vaseline enthält, bei der sebo-statischen Haut des Neurodermitikers eine gewisse Wirksamkeit aufweist. Desweiteren wurde im Zuge der farblichen Angleichung an die Verumpräparate Chlorophyll als Farbstoff benützt. Da die Verumpräparate durch ihren unterschiedlich hohen Gehalt an Hypericum verschieden stark gefärbt waren, wurde dem Placebo 2 eine größere Menge an Chlorophyll zugesetzt, was ein Grund für die stärkere Wirksamkeit von Placebo 2 im Vergleich zu Placebo 1 sein könnte.

So kann man annehmen, dass beide Verumpräparate gleichermaßen besser wirksam wären als die Placebos, wäre die Placebowirkung 2 gleich schwach wie die des Placebos 1. Dies gilt es bei Folgestudien zu beachten.

Bei der Auswertung war außerdem festzustellen, dass die Verblindung im Sinne des Doppelblindcharakters nur unvollständig war, da der charakteristische Geruch der Johanniskrautextrakte in den Cremezubereitungen nicht vollständig überdeckt werden konnte. Wir vermuten zwar, dass dadurch keine Auswirkungen auf die Studienergebnisse entstanden, dennoch sollte zukünftig versucht werden, durch geruchliche Korrigenzen die Verblindung zu vervollständigen.



Die Keimbesiedlung, die wir als Nebenkriterium untersuchten, war unter beiden Vera nur tendentiell rückläufig, obwohl Hyperforin bekanntermaßen antibakteriell wirksam ist und Schempp et al 1999 den Rückgang der CFU (koloniebildender Einheiten) von *Staphylokokkus aureus* nachwies. Dies mag daran liegen, dass die Auswertung der Keimbesiedlung nur deskriptiv erfolgte. Unser Schwerpunkt lag auf der Bewertung der klinischen Wirksamkeit im Gesamten. Eine andere Erklärungsmöglichkeit mag die zu geringe Menge an Hyperforin in den verwendeten Cremes im Vergleich zu den Experimenten von Schempp et al sein. Die Verträglichkeit war unter beiden Vera vergleichbar (sehr gut bis gut). Die unterschiedliche Zusammensetzung an Hyperforin und polaren Johanniskrautinhaltsstoffen wie Flavonoiden scheint diesbezüglich ohne Auswirkung zu sein.

Die kosmetische Akzeptanz war mit 65% weniger befriedigend bewertet worden. Am geringsten war sie unter dem apolaren Verum 1, dessen Hyperforingehalt mit 29% wesentlich höher liegt als der des apolaren Verums 2 (Hyperforingehalt 0,6%), das mit 6% Flavonoiden einen höheren Anteil apolarer Substanzen enthielt (diese waren bei Verum 1 unter der Nachweisgrenze). Die kosmetische Akzeptanz scheint somit mit dem Gehalt an Hyperforin abzunehmen, wohingegen die apolaren Substanzen keinen negativen Einfluß zu haben scheinen.

Im gesamten war die Studie mit dem Nachweis einer signifikanten klinischen Wirksamkeit im Vergleich zu den Placebos erfolgreich und es sollten weitere Studien mit größerem Patientenkollektiv zu exakten Bestimmung der Potenz von Johanniskrautsalben in der Behandlung und Nachbehandlung atopischer Ekzeme folgen.

## II. Experimenteller Teil:

Das Inhaltsstoffmuster des Johanniskrauts wurde in den letzten Jahren intensiv analysiert. Charakteristisch sind die Naphthodiantrone, zu denen unterschiedliche Vertreter des Hypericins (Hypericin und Pseudohypericin sowie Biosynthesestufen Protohypericin und Protopseudohypericin) gehören. Diese Substanzgruppe wurde in den vergangenen Jahren auf Eigenschaften und Wirksamkeiten hin ausführlich untersucht. So weiß man, dass Hypericin Viren mit Lipidhülle inaktiviert (Tang J, 1990; Hudson JB, 1991; Lopez-Bazzocchi I, 1979; Schimazi RF, 1990), wobei Ereignisse zwischen den Viren und der Zellmembran bei hohen Lichtdosen in Form einer photodynamischen Typ 2-Reaktion, bei geringen Lichtdosen virale Kapselproteinänderungen durch Typ 1-Reaktionen entstehen sollen (Carpenter S, 1991). Diese chemiluminiszenten Reaktionen werden durch Bestrahlung mit sichtbarem Licht um nahezu das Hundertfache gesteigert (Hudson JB, 1991; Carpenter S, 1991). Die Bildung von Superoxidanionen, Singulett-Sauerstoff sowie die Hemmung der reversen Transkriptase und der Proteinkinase C sind weitere Erkenntnisse (Andreoni A, 1994; Utsumi T, 1995), die mit der antiviralen und antiretroviralen Wirksamkeit des Hypericins in Zusammenhang stehen. Desweiteren wurde Zytotoxizität gegenüber Tumorzelllinien nachgewiesen (Chung PS, 1994; Ebermann R, 1996; Hadjur C, 1996; Kil KS, 1996; Koren H, 1996; Thomas C, 1992). Mögliche Gründe dafür wurden auf unterschiedlichen zellulären Ebenen gesucht und gefunden. Beispiele dafür sind die Hemmung des epidermalen Wachstumsfaktor-Rezeptors und der P56 (lck) Proteintyrosin-kinase, die Hemmung der EGF-Bindung an EGF-rezeptorpräsentierende Karzinomzellen, die lichtabhängige Inhibierung Wachstumsfaktor-abhängiger Proteinkinasen (Agnostis P, 1996; Vandenbogaerde AL, 1997). Diverse photodynamische, photosensibilisierende und phototoxische Hypericin-wirkungen wurden beschrieben (Araya OS, 1981; Hölzl J, 1991; Rothe L, 1990). Inzwischen weiß man, dass durch Hypericin phototoxische Reaktionen sowohl vom Typ 1 als auch vom Typ 2 ablaufen (Krutmann J, 1997; Duran N, 1986; Yu H, 1996).

Bisher beschäftigte sich unsere Arbeitsgruppe vor allem mit einer weiteren wichtigen Substanz des Johanniskrauts, dem Hyperforin, und konnte antibakterielle Wirksamkeit gegenüber grampositiven Keimen und multiresistenten *Staphylokokkus aureus* nachweisen (Schempp CM, 1999).

All diese Wirkungskomponenten kommen der klinischen Wirksamkeit bei Atopischen Dermatitiden zugute, d.h. sind Teil der Wirksamkeit oder haben einen günstigen Einfluß auf Sekundäreffekte wie bakterielle oder virale Kontamination.

Offen blieb die Frage nach der Wirksamkeit und Bedeutung weiterer Johanniskrautinhaltsstoffe wie den Flavonoiden, den Gerbstoffen und Pflanzensäuren. Die im Einleitungsteil besprochene Immunpathogenese der Atopischen Dermatitis äussert sich auf zellulärer Ebene vor allem durch eine Akkummulation von Immunzellen in der Haut. Dabei infiltrieren T-Helferzellen – je nach Chronizität zeigt sich zuerst eine Dysbalance zugunsten der Th2-Zellen, bei eher chronischen Stadien der Inflammation ist sie zugunsten der Th1-Zellen verschoben – sowie dendritische, antigenpräsentierende Zellen und Langerhanszellen die Dermis und Epidermis. Durch Freisetzung von Entzündungsmediatoren und Zytokinen kommt es zu Chemotaxis und Stimulation weiterer Immunzellen. Um diesen Circulus vitiosus der Inflammationspathogenese zu unterbrechen, muß die Zellproliferation inhibiert werden. Dadurch werden lokale Entzündungsprozesse therapeutisch beeinflusst. Dies ist auch der wesentliche Wirkungsmechanismus lokaler Antiphlogistika. Da der Atopischen Dermatitis eine Inflammationspathogenese zugrunde liegt, lässt sich Wirkungseffektivität lokaler Antiphlogistika durch deren Fähigkeit zur Proliferationshemmung von Zelllinien messen. Wir haben daher die wichtigsten Johanniskrautinhaltsstoffe auf deren antiproliferative, antiphlogistische Wirkung auf Jurkatzellen überprüft. Interessant war dies zum einen, da sich weitere Inhaltsstoffe des pharmakologisch wie therapeutisch äusserst interessanten Johanniskrauts in vitro wirksam gezeigt haben, zum anderen, um die Wirkungsbeitrag dieser Inhaltsstoffe im Sinne der Wirkung des Gesamtextraktes zu überprüfen. Mit unseren in-vitro-Untersuchungen haben wir größtenteils mit bisherigen Erkenntnissen übereinstimmende, teils etwas differierende Ergebnisse erzielt.

Die größte von uns untersuchte Inhaltsstoffgruppe war die der **Flavonoide**. Zu dieser heterogenen Gruppe, die je nach Oxidationsgrad unterschieden werden in Flavone, Flavanone, Flavonole und Isoflavonoide (sog. Phytoöstrogene) zählen eine große Anzahl an natürlich vorkommenden Substanzen. Sie kommen im Pflanzensaft, in ätherischen Ölen, Holzparenchym oder Blättern vor. Sie finden Verwendung bei Venenerkrankungen (Ruteosid), koronaren und peripheren Durchblutungsstörungen (Crataegus- und Ginkgo-Flavonoide) und Lebererkrankungen (Flavonoidkomplex aus Mariendistel). Flavonoide aus Kamillenblüte und Passionsblume wirken spasmolytisch, aus Birkenblättern und Schachtelhalmkraut diuretisch. Einige Flavonoide beeinflussen die Kapillarpermeabilität und wurden daher als Vitamin P bezeichnet (z.B. Rutin, Hesperiden).

Im folgenden gebe ich einen kurzen Einblick in bisherige wissenschaftlich-experimentelle Arbeiten mit und an Flavonoiden.

1988 schon forschten Krakauer Pharmakologen um Robak et al an der Beeinflussung der Lipoxygenase, der Cyclooxygenase und der nicht-enzymatischen Lipidoxidation durch Flavonoide (Robak et al, 1988). Sie fanden beim Screening 13 verschiedener Flavonoide heraus, dass alle als Antioxidantien fungierten und die Cyclooxygenase stimulierten. 11 Flavonoide waren zusätzlich Inhibitoren der Lipoxygenase, wobei eine Korrelation zwischen chemischer Struktur und Aktivität beobachtet worden war. Luteolin und Myricetin gehörten diesbezüglich zu den aktivsten Substanzen.

Eine Studie von Takahashi et al zeigte, dass Apigenin und Luteolin das Wachstum humaner Leukämiezellen stark inhibierte und obendrein die Zellen zur Differenzierung anregte (Takahashi T, 1998). Apigenin und Luteolin veranlassen Leukämiezellen dazu, zu Monocyten und Makrophagen heranzureifen.

Auch bei Studien mit Schilddrüsenzelllinien waren Apigenin und Luteolin die wirkungsstärksten Inhibitoren. Hier konnte nachgewiesen werden, dass Apigenin die Signaltransduktion in Tumorzellen inhibiert und Apoptose induziert. Man vermutet deshalb, dass Apigenin in näherer Zukunft als neue Therapeutikaklasse beim anaplastischen Thyroidkarzinom, für das bisher keine effektive Therapie verfügbar ist, genutzt werden kann. Fotsis et al wiesen 1997 sowohl Zellproliferationshemmung von normalen und Tumorzellen nach

als auch eine in vitro Angiogenesehemmung durch Luteolin und Apigenin (Fotsis et al, 1997).

Agullo et al klassifizierten 1997 Myricetin als potentesten Protein 3-kinase-Inhibitor bei einem Screening der 14 häufigsten Flavonoide, gefolgt von Luteolin und Apigenin (Agullo et al, 1997).

1998 verglich Noroozi die antioxidativen Effekte einiger Flavonoide mit denen des Vitamin C und stellte dabei folgende Reihenfolge der Reparaturfähigkeit oxidativer DNA-Schäden auf: Luteolin (9% der DNA-Schäden), Myricetin (10%), Kaempferol (32%), Apigenin (59%) und Vitamin C (78%) (Noroozi et al, 1998). 1998 konnte eine Gruppe japanischer Forscher um Takahashi zeigen, dass besonders Apigenin und Luteolin starke Wachstums - Inhibitoren sind und darüber hinaus eine morphologische Differenzierung in Granulozyten bewirken (Takahashi et al, 1998).

Von besonderem Interesse für die zukünftige Forschung an Flavonoiden und Flavonoidextrakten ist die hocheffektive Proliferationshemmung auf Tumor- und normale Zelllinien und deren Verwendbarkeit im therapeutischen Bereich sowie die anti-inflammatorische Wirksamkeit des Luteolins für die Behandlung allergisch-inflammatorischer Dermatitiden. Somit ist es durchaus vorstellbar, dass die im Johanniskraut enthaltenen Flavonoide an der klinischen Wirksamkeit der Johanniskrautcreme bei Atopischer Dermatitis beteiligt sind.

Die von uns untersuchten Flavonoide im Johanniskraut waren Amentoflavon, Hyperosid, Myricetin, Biapigenin, Luteolin und Apigenin.

**Amentoflavon** zeigte in den von uns verwendeten Konzentrationen keine eindeutige Proliferationshemmung. Der Proliferationswert bei einer Amentoflavon-konzentration von 1ug/ml ist im Sinne der Plausibilität als Zufallsfehler zu werten.

Auch **Hyperosid** zeigte keine Wirksamkeit und blieb bei Konzentrationen im Bereich von 0,1ug/ml – 100ug/ml nahezu ohne Änderung in der 3H-Thymidin-Inkorporation. Auch beim Myricetin war erst im Bereich von 100ug/ml ein eindeutiger Effekt auf Jurkatzellen sichtbar.

Bei **Biapigenin** konnten wir eine kontinuierliche Abnahme der Zellzahl feststellen, eine bedeutende Abnahme war allerdings auch erst bei Konzentrationen von 100ug/ml nachzuweisen.

Bei unseren In-vitro-Experimenten konnten wir beim **Luteolin** die größte proliferationshemmende Potenz der von uns untersuchten Johanniskrautinhaltstoffen nachweisen. Die dosisabhängige Proliferationshemmung in Jurkatzellen trat schon bei Zugabe einer Luteolinkonzentration von 1ug/ml auf und zeigte im Vergleich zu einer Konzentration von 0,1 ug/ml einen deutlichen Abfall der Zellproliferation. Wir haben daher diesen Bereich etwas genauer aufgeschlüsselt. Es zeigte sich ein dosisabhängig exponentieller Abfall der 3H-Thymidinaufnahme der Zellen. Ab einer Konzentration von 32ug/ml war die 3H-Thymidinaufnahme nicht mehr nachweisbar. Die sinkende Thymidinaufnahme der Zelllinien korreliert direkt mit dem Zelluntergang. Als stark antiproliferative Substanz könnte Luteolin daher im Sinne des Gesamtextraktes durchaus an der antiphlogistischen Wirkung des Gesamtextraktes beteiligt sein. Aufgrund der verhältnismässig geringen Menge an Luteolin im Extrakt, dürfte die Wirkung allerdings hinter der des Hypericins weit zurücktreten. Interessant wäre jedoch die Wirksamkeitstestung eines isolierten Luteolinextraktes im Rahmen einer klinischen Studie bei Patienten mit leichter bis mittelschwerer Atopischer Dermatitis, um die in vitro erzielte antiproliferative Wirkung in vivo zu überprüfen.

Die bisherige Forschung zeigt wie unsere in-vitro-Untersuchungen die herausragende Bedeutung der Substanzen Luteolin und Apigenin unter den Flavonoiden. Daher will ich auf diese beiden Substanzen nochmals gesondert eingehen.

Luteolin wird in ähnlichen Pflanzen vorgefunden wie Apigenin (Petersilie, Artischocken, Basilikum, Stangensellerie, aber auch in Johanniskraut und anderen Pflanzen). Es besitzt einige vergleichbare, jedoch auch eigene, spezifische Effekte. So zeigen beide Substanzen antiproliferative, antioxidative und antikanzerogene Wirksamkeit. Wie auch das Apigenin (siehe unten) inhibiert Luteolin Effekte des epidermalen Wachstumsfaktors und der Tyrosinkinase und hat daher antikanzeröse und antimetastatische Potenz (Huang YT, 1999).

Verglichen mit 27 weiteren Zitrusflavonoiden wies Luteolin die größte antiproliferative Potenz gegenüber mehrerer Tumor-, aber auch normalen

Zelllinien auf (Ma JT, 1999). Dieses Ergebnis deckt sich mit den Erkenntnissen unserer in-vitro-Untersuchungen, differiert aber von den Ergebnissen von Hirano et al, die Apigenin als stärker antiproliferativ angaben.

Shimoi et al zeigten 1994, dass Luteolin eines der Flavonoide ist, dass den größten radioprotektiven Effekt in Gammastrahlen-geschädigten Mäusen hatte, was auf die antimutagene Potenz zurückzuführen ist

Elangovan et al führten interessante Experimente an Mäusen durch. Nach subkutaner Injektion einer stark kanzerogenen Substanz entwickelten die Mäuse innerhalb von 9 Wochen mit einer Inzidenz von 100% verschiedene Tumore, während die Tumorinzidenz in einem mit einer Luteolin- und Quercetindiät behandelten Kollektiv 60% und 52% betrug. Die mit der Testdiät behandelten Tiere zeigten eine Reduktion der Lipidperoxide und der Cytochrom 450 und eine gesteigerte GST-Aktivität. Bei der in-vitro 3H-Thymidin-Inkorporation wiesen sie DNA-Synthesehemmung durch Flavonoide in Fibrosarkomzellen nach. Außerdem stellten Wissenschaftler fest, dass verglichen mit Vitamin C die antioxidative Potenz (also die Reduktion oxidativer DNA-Schäden) des Luteolins höher war (Noroozi M, 1998).

Mehrere Studien zeigten, dass Luteolin Aromataseenzyme und dadurch erhöhte Östrogenbildung unterdrückte und die Bindung von Östrogenen an Brustkrebszellen verminderte (Wang C, 1994; Joshi SC, 1999).

Mäuse, bei denen durch chemische Karzinogene Fibrosarkome induziert worden waren, zeigten unter Luteolindiät einen Rückgang der Inzidenz um 40% (Makino T, 1998).

Wie effektiv aber können diese Flavonoide wirklich vor Krebs schützen?

Eine epidemiologische Studie zeigte eine Verminderung von Magenkarzinomen um 56% bei dem Kollektiv, das die höchste Flavoniddosis erhielt verglichen mit dem, das die geringsten Mengen an Flavonodern zu sich nahm (Garcia-Closas R, 1999).

Verglichen mit anderen Flavonoiden besitzen aber nur Luteolin und Quercetin inhibierende Eigenschaften auf den Plättchenaktivierenden Faktor und inflammatorische Reaktionen, die durch Allergene induziert sind. So vermuteten Wissenschaftler schon 1996, dass Luteolin ein neuer Typus anti-inflammatorischer, anti-allergischer Medikamente werden könnte (Yanoshita R, 1996) und griffen dadurch voraus, was wir durch unsere Experimente

ebenfalls vermuteten. Damit gilt das Luteolin für die Forschung an Alternativtherapeutika bei Atopischer Dermatitis allergischer und inflammatorischer Genese als Substanz von besonders großer Bedeutung.

Bei **Apigenin** konnten wir eine Proliferationshemmung ab einer Konzentration von 10 µg/ml feststellen. Auch hier war ein abruptes Abfallen gegenüber der nächstkleineren Konzentration von 1 µg/ml festzustellen. Dieses Ergebnis steht teilweise im Widerspruch zu bisherigen Erkenntnissen über die Wirkungsstärke des Apigenins im Vergleich zum Luteolin. So sahen Wissenschaftler um Hirano et al bei ihren Experimenten an humanen Brustdrüsenzellen Apigenin als potenteste antiproliferative Substanz der großen Gruppe von Flavonoiden.

Apigenin ist ein Flavonoid, das in Petersilie, Artischocken, Basilikum, Stangensellerie, aber auch in Johanniskraut und anderen Pflanzen enthalten ist. Im Laufe der letzten drei Jahre haben eine große Anzahl an Studien die anti-karzinogene Wirkung des Apigenins nachgewiesen. Eine Studie aus 21 verschiedenen Flavonoiden, mit denen die Untersuchungen an humanen Brustkrebszellen durchgeführt wurden, schrieb dem Apigenin die effektivste antiproliferative Potenz zu (Hirano T et al, 1999) – ein zu unseren Experimenten differierendes Ergebnis, da wir Luteolin als effektiver antiproliferativ als Apigenin bewerten konnten. Eine verwandte Studie zeigte, dass Apigenin an in der Zellmembran enthaltenen Östrogenrezeptoren bindet, um eine Hyperproliferation dieser Zellen bei Östrogenreiz zu verhindern (Kuiper GG et al, 1998).

Eine weitere Studie testete das Zellreparaturpotential nach oxidativer DNA-Schädigung. Dabei zeigten sich Apigenin, Quercetin und Rutin wirksamer als Vitamin C (Noroozi M, 1998).

Apigenin wurde auch hinsichtlich seines Effekts auf humane Leukämiezellen untersucht mit dem Ergebnis, dass Apigenin effektiver als andere getestete Flavonoide Apoptose induzierte (Wang IK, 1999). Bei einer Studie an kolorektalen Tumorzelllinien interferierten Apigenin und Quercetin mit epidermalem Wachstumsfaktor und griffen dadurch in die Signaltransduktion des Tumorstwachstums ein, welche sowohl für das Tumorstwachstum als auch die Tumordifferenzierung essentiell ist (Richter M, 1999).



Gelatinasen, die in humanen Tumoren exprimiert werden und vermutlich bei der Metastasierung und Tumorinvasion eine Rolle spielen, wurden von Apigenin inhibiert. Über diesen dualen Mechanismus hofft man im Apigenin eine neue Möglichkeit therapeutischer Intervention gefunden zu haben (Reddy KB, 1999).

Proteinkinase C wird in vielen Tumoren überexprimiert. Einige Wissenschaftler konnten zeigen, dass Apigenin mehrere Stellen im Prozeß des Tumorpromoting blockiert. Dazu gehören solche, die Kinasen inhibieren, Transkriptionsfaktoren reduzieren und den Zellzyklus regulieren (Birt DF, 1996).

Ein andere Experimentenreihe demonstrierte, dass Apigenin über mehrere den Kinasen zugehörnde Signalwege Mammazellproliferation inhibierte, ein Effekt, der auch durch Luteolin gezeigt werden konnte. Der Einfluß der einiger Flavonoide auf den Östrogenmetabolismus brachte Wissenschaftler dazu über den Flavvonoideinsatz bei Prävention oder Therapie östrogen-abhängiger Erkrankungen zu spekulieren (Makela S, 1998).

Darüberhinaus inhibieren Flavonoide einen weiteren Mechanismus über den Malignomentwicklung stattfinden kann, die "sulfation". Apigenin war auch hier ein potenter Inhibitor (Eaton E, 1999).

Einige andere Wissenschaftler beschäftigen sich mit UV-induzierten Hauttumoren bei Mäusen und fanden heraus, dass auch hier durch Apigenin Tumorgenese inhibiert wurde. Weiterführende Experimente zeigten, dass Apigenin die Bindungsaktivität mehrerer Tumorsuppressorgene einschließlich des wichtigen p53 erhöhten.

Um die Mechanismen durch die Apigenin Krebsentstehung verhindern könnte besser zu verstehen, beobachteten Wissenschaftler die Effekte dieser Flavonoide auf die Neoangiogenese. Apigenin inhibierte dabei einige Faktoren, die in den Prozeß der tumorösen Neoangiogenese involviert sind (Trochon V, 2000).

Diese Entdeckungen machen das Apigenin zu einer vielversprechenden Substanz, die ihre Zukunft vor allem als Chemotherapeutikum zur Verhinderung von Tumorentstehung, -wachstum und -verbreitung haben könnte. Dies liegt vor allem daran, dass Apigenin in unterschiedlichste Signaltransduktionswege des Tumorpromoting und -processing sowie -

metastasierung eingreift und durch dieses Nebeneinander diverser antikanzerogener Effekte besonders effektiv ist.

Neben den Flavonoiden im Johanniskraut haben wir auch die **Pflanzensäuren** Chlorogensäure und Kaffeesäure und den **Gerbstoff** Epicatechin auf antiprolative Eigenschaften geprüft.

Bei der **Kaffeesäure** war die Proliferationshemmung erst in einem physiologisch und pharmakologisch uninteressanten Bereich festzustellen, nämlich bei 100ug/ml. Auch hier ist der Wert bei 10ug/ml im Sinne der Plausibilität und Wahrscheinlichkeit korrigierend zu überprüfen.

Vergleichbar war dies bei **Chlorogensäure** - auch hier kam es erst bei 100ug/ml zu einer Reduktion der Zellzahl auf die Hälfte im Vergleich zur Kontrolle ohne Substanzzugabe.

Bei **Epicatechin** blieb die 3H-Thymidin-Inkorporation im von uns untersuchten Konzentrationsbereich von 0,1ug/ml bis 100ug/ml ohne wesentliche Veränderung, d.h. ohne antiproliferative Effekte.

Im Anschluß an die Proliferationsassays untersuchten wir, welche Art von Zelluntergang bei der starken Proliferationshemmung des Luteolin vorliegt und führten dazu Toxizitätstests und Apoptoseexperimente durch.

Es zeigte sich ein Zelluntergang durch Apoptose. den häufigsten Apoptosemechanismus, die Caspase-abhängige Apoptose, bei der Caspase 3, 8, 9 und Pancaspase eine Rolle spielen.

Wir konnten zeigen, dass es sich bei der durch das Luteolin ausgelösten Apoptose um den häufigen, Caspase-abhängigen Apoptosemechanismus handelt, bei dem die Caspasen 3, 8, 9 und die Pancaspase eine Rolle spielen.

Durch Ausschluß des nekrotischen Zelluntergangs mittels LDH-Release verifizierten wir diese Ergebnisse. Es war kein für eine primäre Nekrose charakteristischer zytoplasmatischer LDH-Anstieg zu verzeichnen. Der leichte Anstieg des LDH bei hohen Luteolinkonzentrationen ist als Übergang der massiven Apoptose in die Nekrose als sog. Sekundäre Nekrose zu interpretieren.

Es drängt sich nun die Frage auf, inwiefern die Wirksamkeit des Luteolins an der Gesamtwirkung des Johanniskrauts beteiligt sein könnte. Ist das Luteolin

zusammen mit der leicht antiproliferativen Wirkung der anderen Flavonoide neben Hypericin und Hyperforin in nachweisbarem Maße beteiligt oder sind diese Konzentrationen im Johanniskraut zu gering, um klinische Wirksamkeit zu entfalten?

Durch weiterführende Klinische Studien sowie In-vitro-Untersuchungen sollte die pharmakologische und klinische Potenz des Luteolins, eventuell auch im Vergleich mit proliferationshemmenden Substanzen, noch weitergehend untersucht werden. Es liegt nahe, die Potenz dieser Substanz für neue Therapeutika inflammatorisch-allergischer Erkrankungen wie der Atopischen Dermatitis zu erproben und zu nützen.

## **F Zusammenfassung und Ausblick**

### Klinische Studien:

Zusammenfassend wurde im Halbseitenvergleich eine gegenüber der Grundlage signifikant bessere Wirkung der hyperforinreichen Johanniskraut-Creme nachgewiesen. Diese Johanniskraut-Creme kann eventuell ein wirksames Phytotherapeutikum bei der Behandlung der leichten bis mittelschweren Atopischen Dermatitis sein. Allerdings müssen zur Feststellung der Potenz einer solchen Creme noch weitere Studien mit grösseren Patientenzahlen und ein Vergleich mit einer Standardtherapie (Corticosteroid) durchgeführt.

### Experimenteller Teil:

Da der Atopischen Dermatitis eine Inflammationspathogenese zugrunde liegt, haben wir die wichtigsten Johanniskrautinhaltstoffe auf deren antiproliferative, antiphlogistische Wirkung hin überprüft. Bei unseren In-vitro-Experimenten konnten wir beim Luteolin, gefolgt von dem Flavonoid Apigenin, die größte proliferationshemmende Potenz der von uns untersuchten Johanniskrautinhaltstoffe nachweisen. Die weiteren Substanzen wie Biapigenin, Amentoflavon, Myricetin, Epicatechin, Hyperosid, Kaffeesäure und Chlorogensäure zeigten keine therapeutisch wirksame Proliferationshemmung im Proliferationsessay mit 3H-Thymidin oder im BRDU-Elisa. Wir haben den Apoptosemechanismus, der durch Luteolin an Jurkatzellen ausgelöst wird, untersucht und konnten eine Caspasen-abhängige Apoptose nachweisen, die wir vom Zelluntergang durch Nekrose im LDH-Release abgrenzen konnten.

Als stark antiproliferative Substanz könnte Luteolin im Sinne des Gesamtextraktes durchaus an der antiphlogistischen Wirkung des Gesamtextraktes beteiligt sein. Aufgrund der verhältnismässig geringen Menge an Luteolin im Extrakt, dürfte die Wirkung allerdings hinter der des Hypericins weit zurücktreten. Interessant wäre jedoch die Wirksamkeitstestung eines isolierten Luteolinextraktes im Rahmen einer klinischen Studie bei Patienten mit leichter bis mittelschwerer Atopischer Dermatitis, um die in vitro erzielte antiproliferative Wirkung in vivo zu überprüfen.

Von besonderem Interesse für die zukünftige Forschung an Flavonoiden und Flavonoidextrakten ist die hocheffektive Proliferationshemmung auf Tumor- und normale Zelllinien, die es pharmakologisch und therapeutisch noch genauer zu erforschen gilt.

## G Literaturverzeichnis

- (1) Aertgeerts P, Albring M, Klaschka F, Nasemann T, Patzelt-Wenzler, Rauhut K, Weigl B (1985) Vergleichende Prüfung von Kamillosan-Creme gegenüber steroidal (0,25% Hydrocortison, 0,75% Fluocortinbutylester) und nichtsteroidal (5% Bufexamac) Externa in der Erhaltungstherapie von Ekzemerkrankungen. *Z Hautkr* 270-277
- (2) Agostinis P, Donella-Deana A, Cuveele J, Vandenberghe A, Sarno S, Merlevede W, de Witt P (1996) A comparative analysis of the photosensitized inhibition of growth-factor regulated protein kinases by hypericin-derivates. *Biochem Biophys Res Comm* 220:613-617
- (3) Agullo G et al. (1998) Relationship between structure and inhibition of phosphatidylinositol 3-kinase. A comparison with tyrosin kinase and protein kinase C. *Int J. Cancer*, 42: 382-88
- (4) *AIDS weekly plus* (1996) Trial results for AIDS oral dose VIMRxyn presented. 10/1996
- (5) Anonymous (1993) Severity Scoring of Atopic Dermatitis: The SCORAD Index. Consensus Report of the European Task force on Atopic Dermatitis. *Dermatology* 186:23-31
- (6) Araya OS, Ford EJH (1981) An investigation of the type of photosensitization caused by the investigation of St John's wort (*Hypericum perforatum*) by calves. *J Comp Path* 91: 135-141
- (7) Bayerl Ch, Jung EG. (1996) Neurodermitis – präventive und therapeutische Strategien der Umweltdermatose. *Akt Dermatol*; 2: 298-305
- (8) Berghöfer R (1987) Analytik und Isolierung phenolischer Inhaltsstoffe von *Hypericum perforatum* L. aus Anbau und Wildvorkommen und Vergleich mit anderen heimischen *Hypericum* -Arten. *Dissertationes Botanicae, Cramer, Berlin/Stuttgart, Germany*
- (9) Biber A, Fischer H, Römer A, Chatterjee SS (1998) Oral bioavailability of hyperforin from hypericum extracts in rats and human volunteers. *Pharmacopsychiatry* 31 (Suppl 1): 36-43
- (10) Bieber Th. (1986) Die Langerhans-Zelle: Vorposten des Immunsystems in der Epidermis. *Der Hautarzt* 37: 424-431

- (11) Birt DF, Mitchell. (1997) Inhibition of the ultraviolet light induced skin carcinogenesis in SKH-1 mice by apigenin. *Cancer Res* 17, 85-92
- (12) Birth DF, Walker (1986). Anti-mutagenesis and antipromotion by apigenin. *Carcinogenesis* 7 (6), 959-963
- (13) Bladt S, Wagner H (1994) Inhibition of MAO by fractions and constituents of hypericum extract. *J Geriatr Psychiatry Neurol* 7 (Suppl 1): 57-59
- (14) Brockmann H, Hashad NM, Maier K, Pohl F (1939) Über das Hypericin, den photodynamisch wirksamen Farbstoff aus *Hypericum perforatum*. *Naturwiss* 27:550-555
- (15) Brockmann H, Kluge F, Nuxfeldt H (1957) Totalsynthese des Hypericins. *Chem Ber* 90: 2302-2318
- (16) Brockmüller J, Reum T, Bauer S, Kerb R, Hübner WD, Roots I (1997) Hypericin and pseudohypericin: pharmacokinetics and effects on photosensitivity in humans. *Pharmacopsychiatry* 30: 56-63
- (17) Buske-Kirschbaum A, Hellhammer D H. (1999) Psychobiologische Aspekte der Atopischen Dermatitis. *Zf Dermatol* 185: 67-71
- (18) Bystrov NS, Chernov BK, Dobrynin VN, Kolosov MN (1975) The structure of hyperforin. *Tetrahedron Lett* 32: 2791-2794
- (19) Carpenter S, Kraus GA (1991) Photosensitization is required for inactivation of equine infectious anemia virus by hypericin. *Photochem Photobiol* 53: 169-174
- (20) Chung PS, Saxton RE, Paiva MB, Rhee CK, Soudant J, Mathey A, Foote C, Castro DJ (1994) Hypericin uptake in rabbits and nude mice transplanted with human squamous cell carcinomas: study of a new sensitizer for laser phototherapy. *Laryngoscope* 104: 1471-1476
- (21) Diepgen TL, Fartasch M. (1992) Recent epidemiological and genetic studies in atopic dermatitis. *Acta Derm Venerol Suppl Stockh* 176: 13-18
- (22) Dittmar HC, Weiss JM, Termeer CC et al. (1999) In vivo UVA-1 and UVB (1999) differentially perturbs the antigen presenting function of human epidermal Langerhans cells. *J Invest Dermatol*: 112: 322-325
- (23) Dressler U (1992) Alternative Therapieansätze bei HIV-Infektionen. *Therapiewoche* 42: 34-37
- (24) Duran N, Song PS (1986) Hypericin and its photodynamic action. *Photochem Photobiol* 43: 677-680

- (25) Eaton EA, (1996). Flavonoids, potent inhibitors of the human p-form phenolsulfotransferase. *Drug Metab. Dispos*, 24 (2), 232-237
- (26) Ebermann R, Alth G, Kreitner M, Kubin A (1996) Natural products derived from plants as potential drugs for the photodynamic destruction of tumor cells. *J Photochem Photobiol (B)* 36: 95-97
- (27) Edwards C (1995) The Mexameter MX 16TM. In: Berardesca E, Elsner P, Wilhelm KP, Maibach HI (eds) Bioengineering of the skin: methods and instrumentation. *Boca Raton, CRC press*: 127-129
- (28) Erdelmeier CAJ (1998) Hyperforin, possibly the major non-nitrogenous secondary metabolite of hypericum perforatum L. *Pharmacopsychiatry* 31 (Suppl): 2-6
- (29) European Task force on Atopic Dermatitis (1993) Severity Scoring of Atopic Dermatitis: The SCORAD Index. Consensus Report of the European Task force on Atopic Dermatitis. *Dermatology* 186:23-31
- (30) Fotsis T, Pepper, Ms. Aktas, E, Breit S, (1997) *Cancer Res* 57 (14), 2916-2921
- (31) Fox FE, Niu Z, Tobia A, Rook AH (1998) Photoactivated hypericin is an anti-proliferative agent that induces a high rate of apoptotic death of normal, transformed, and malignant T lymphocytes: implications for the treatment of cutaneous lymphoproliferative and inflammatory disorders. *J Invest Dermatol* 111: 327-332
- (32) Gaiind KN, Ganjoo TN (1959) Antibacterial principle of Hypericum perforatum L. *Ind J Pharm* 21: 172-175
- (33) Garcia-Closas R, et al.(1999) Intake of specific carotenoids and flavonoids and the risk of gastric cancer in Spain. *Cancer Causes Contr.* Feb, 10 (1): 71-5
- (34) Giese AC (1980) Hypericium. *Photochem Photobiol Rev* 5: 29-255
- (35) Gniazdowska B, Rueff F, Przybilla B (1999) Delayed contact hypersensitivity to non-steroidal anti-inflammatory drugs. *Contact Dermatitis* 40:63-65.
- (36) Golsch S, Vocks E, Rakoski J, Brockow K, Ring J (1997) Reversible Erhöhung der Photosensivität im UV-B-Bereich durch Johanniskrautextrakt-Präparate. *Hautarzt* 48: 49-252
- (37) Gurevich AI, Dobrynin VN, Kolosov MN, Popravko SA, Ryabova ID, Chernov BK, Derbentseva NA, Aizenman BE, Garagulya AD (1971) Hyperforin, an antibiotic from Hypericum perforatum L. *Antibiotik* 16: 10-513
- (38) Hadjur C, Richard MJ, Parat MO, Jardon P, Favier A (1996) Photodynamic effects of hypericin on lipid peroxidation and antioxidant status in melanoma cells. *Photochem Photobiol* 64: 75-381

- (39) Hirano T et al. (1989) Antiproliferative effects of synthetic and naturally occurring flavonoids on tumor cells of the human breast carcinoma cell line, ZR-75-1. *Res Commun Chem Pathol Pharmacol Apr.*; 64 (1): 69-78
- (40) Hölzl J (1991) Ist Johanniskraut phototoxisch? *Med Mo Pharm* 14: 304-306
- (41) Horsley CH (1933) Investigation into the action of St. John's Wort. *J Pharmacol* 50: 310-322
- (42) Holland MB, et al. (1995) Estrone-induced cell proliferation and differentiation in the mammary gland of the female Noble rat. *Carcinogenesis* Aug; 16 (8): 1955-61.
- (43) Huang YT, et al. (1999) Effects of luteolin and quercetin, inhibitors of tyrosine kinase on cell growth and metastasis-associated properties in A431 cells overexpressing epidermal growth factor receptor. *Br J Pharmacol* Nov, 128 (5) :999-1010
- (44) Hudson JB, Lopez-Bazzocchi I, Towers GHN (1991) Antiviral activity of hypericin. *Antiviral Res* 15: 101-112
- (45) Joshi S.C, et al. (1999) Inhibition of 17 beta-estradiol formation by isoflavonoids and flavonoids in cultured JEG-3 cells: Search for aromatase-targeting dietary compound. *Journal of Medical Food* 2/3-4 (235-238).
- (46) Kerb R, Brockmüller J, Staffeldt B, Ploch M, Roots I (1996) Single-dose and steady-state pharmacokinetics of hypericin and pseudohypericin. *Antimicrob Ag Chemother* 40: 2087-2093
- (47) Kil KS, Yum YN, Seo SH, Lee KT (1996) Antitumor activities of hypericin as a protein tyrosine kinase blocker. *Arch Pharmacol Res* 19: 490-496
- (48) Knox JP, Dodge AD (1984) Isolation and activity of the photodynamic pigment hypericin. *Plant Cell and Environment* 8: 19-25
- (49) Koren H, Schenk GM, Jindra RH, Alth G, Ebermann R, Kubin A, Konderhold G, Kreitner M (1996) Hypericin in phototherapy. *J Photochem Photobiol (B)* 36: 113-119
- (50) Korting HC, Schafer-Korting M, Klovekorn W, Klovekorn G, Martin C, Laux P (1995) Comparative efficacy of hamamelis distillate and hydrocortisone cream in atopic eczema. *European Journal of Clinical Pharmacology* 48:461-465
- (51) Kuiper GG et al. (1998) Interaction of estrogenic chemicals and phytoestrogens with estrogen receptor beta. *Endocrinology* Oct; 139 (10): 1517-25
- (52) Lavie G, Valantine F, Levin B, Mazur Y, Gallo G, Lavie D, Weiner D, Meruolo D (1989) Studies of the mechanism of action of the antiretroviral agents hypericin and pseudohypericin. *Proc Nat Acad Sci USA* 86: 5963-5967



- (53) Lenard J, Rabson A, Vanderoef R (1993) Photodynamic inactivation of infectivity of human immunodeficiency virus and other enveloped viruses using hypericin and rose bengal: inhibition of fusion and syncytia formation. *Proc Natl Acad Sci USA* 90: 158-162
- (54) Linde K, Ramirez G, Muirow CD, Pauls A, Weidenhammer W, Melchart D (1996) St John's wort for depression - an overview and metaanalysis of randomized clinical trials. *Brit Med J* 313: 253-258
- (55) Lomagno P, Lomagno RC (1979). Activity of Hypericum perforatum oil in the treatment of the bedsores in old people. *Fitoterapia* 1979 50: 201-205
- (56) Lopez-Bazzocchi I, Hudson JB, Towers GHN (1991) Antiviral activity of the photoactive plant pigment hypericin. *Photochem Photobiol* 54: 95-98
- (57) Ma JY, et al. (1999) A sesquiterpene lactone glucoside from *Ixeris denticulata* f. *pinnatipartita*. *Phytochemistry* Jan. 50 (1): 113-5
- (58) Madaus G (1989) Hypericum. In: *Lehrbuch der biologischen Heilmittel, Mediamed*, Ravensburg, Band 7: 1587-1594
- (59) Matsukawa Y. et al. (1993) Genistein arrests cell cycle progression at G2-M. *Cancer Res* 53 (6): 1328-31.
- (60) Maisenbacher P (1991) Untersuchungen zur Analytik von Johanniskrautöl. Dissertation, Eberhard-Karls-Universität, Tübingen, Germany
- (61) Maisenbacher P, Kovar KA (1992) Analysis and stability of Hyperici oleum. *Planta Med* 58:351-354
- (62) Maisenbacher P, Kovar KA (1992/2) Adhyperforin: a homologue of hyperforin from *Hypericum perforatum*. *Planta Med* 58: 291-293
- (63) Makela S et al. (1998) Inducible cyclooxygenase by apigenin and related flavonoids. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med*, Mar, 217 (3): 310-6
- (64) Makino T. (1998) Inhibitory effect of *Perilla frutescens* and its phenolic constituents on cultured murine mesangial cell proliferation. *Planta Med*. Aug, 64 (6): 541-5
- (65) Martinez B, Kasper S, Ruhrmann S, Möller HJ (1993) Hypericum in der Behandlung von saisonal abhängigen Depressionen. *Nervenheilkunde* 12: 302-307
- (66) Meruelo D, Lavie G, Lavie D (1988) Therapeutic agents with dramatic antiretroviral activity and little toxicity at effective doses: aromatic polycyclic diones hypericin and pseudohypericin. *Proc Natl Acad Sci USA* 85: 5230-5234

- (67) Mezger J (1991) Gesichtete homöopathische Arzneimittellehre: Hypericum perforatum. Haug Verlag, Heidelberg, pp 761-765
- (68) Miskovski P, Sureau F, Chinsky L, Turpin PV (1995) Subcellular distribution of hypericin in human cancer cells. *Photochem Photobiol* 62: 546-549
- (69) Morhenn V, Orenberg E, Kaplan J, Pfendt E, Terrell C, Engleman E (1983) Inhibition of a Langerhans cell-mediated immune response by treatment modalities useful in psoriasis. *J Invest Dermatol* 81: 23-27
- (70) Müller WE, Singer A, Wonnemann M, Hafner U, Rolli M, Schäfer C (1998) Hyperforin represents the neurotransmitter reuptake inhibiting constituent of hypericum extract. *Pharmacopsychiatry* 31 (Suppl 1): 16-21
- (71) Neuwald F, Hagenström U (1954) Untersuchungen über die antibakterielle Wirkung von Hypericum perforatum L. *Arch Pharm* 287: 439-441
- (72) Niedner R (1996) Solanum dulcamara L. - a "plant cortisone"? *Medizinische Monatsschrift für Pharmazeuten*. 19:339-340
- (73) Noroozi M, et al. (1998) Effects of flavonoids and vitamin C on oxidative DNA damage to human lymphocytes. *Am J Clin Nutr*. Jun; 67 (6): 1210-8
- (74) Otto J, Urbanek R. (1991) Neurodermitis im Kindesalter. Differentialdiagnose-Komplikationen-Therapie. *Fortschr Med* 109: 141 – 144
- (75) Pace N (1942) The etiology of hypericism, a photosensitivity produced by St. Johnswort. *Am J Physiol* 136: 650-656
- (76) Pace N, Mackinney G (1941) Hypericin, the photodynamic pigment from St. John's wort. *J Chem Soc* 63: 2570-2574
- (77) Patzelt-Wenzler R, Ponce-Poschl E (2000) Proof of efficacy of Kamillosan(R) cream in atopic eczema. *Eur J Med Res* 19:171-175
- (78) Perovic S, Müller WEG (1995) Pharmacological profile of hypericum extract - effect on serotonin uptake by postsynaptic receptors. *Drug Res* 45: 1145-1148
- (79) Post JF, et al. (1992) Growth inhibitory effects of bioflavonoids and related compounds of human leukemic CEM-C1 and CEM-C7 cells. *Cancer Lett* Dec 24; 67 (2-3): 207-13.
- (80) Reddy KB et al. (1999) Signal pathways involved in apigenin inhibition of growth and induction of apoptosis of human anaplastic thyroid. *Nutr. Cancer* 34 (1): 88-99
- (81) Reddy KB et al. (1999) Mitogen-activated protein kinase regulates the expression of progelatinase B in breast epithelial cells. *Int J Cancer*, 82: 268-73

- (82) Ree K (1982). Reduction of Langerhans cells in human epidermis during PUVA therapy: a morphometric study. *J Invest Dermatol* 78: 488-492
- (83) Richter A, Davies DE (1995) Effects of anthralin and hypericin on growth factor signalling and cell proliferation in vitro. *Biochem Pharmacol* 50: 2039-2045
- (84) Richter M, Ebermann R, (1999): Quercetin-induced apoptosis in colorectal tumor cells: possible role of EGF receptor signaling. *Nutr. Cancer* 1999, 34 (1): 88-99
- (85) Robak J, Gryglewski, RJ, (1988). Flavonoids are scavengers of superoxide anions. *Biochemistry and Pharmacology* 37: 837-841
- (86) Roth L (1990) Hypericum - Hypericin. Botanik, Inhaltsstoffe, Wirkungen. Ecomed Arzneipflanzen-Monographie. Ecomed, Landsberg/Lech
- (87) Rothe MJ, Grant-Kels JM. (1996) Atopic dermatitis: an update. *J Am Acad Dermatol* 35: 1 – 13
- (88) Ruzicka T, Wüthrich B. (1997) Das Atopische Ekzem. *Deutsches Ärzteblatt* 26
- (89) Ruzicka T, Wüthrich B. (1997) Das integrierte Therapiekonzept des atopischen Ekzems. *Deutsches Ärzteblatt* 27: 42 – 48
- (90) Schempp CM, Schöpf E, Simon JC (1996) Phototesting in bath-PUVA. Marked reduction of 8-methoxypsoralen (8-MOP) activity within one hour after an 8-MOP bath. *Photodermatol Photoimmunol Photomed* , 12: 100-102
- (91) Schempp CM, Blümke C, Schulte-Mönting J, Schöpf E, Simon JC (1998) Der Einfluß verschiedener Salzlösungen auf die Ultraviolett B-vermittelte Induktion von Erythem und Pigmentierung. *Hautarzt* 49: 482-486
- (92) Schempp CM, Winghofer B, Langheinrich M, Schöpf E, Simon JC (1999/1). Hypericin levels in human serum and interstitial skin blister fluid after oral single-dose and steady-state administration of Hypericum perforatum extract (St. John's wort). *Skin Pharmacol* 12: 299-304
- (93) Schempp CM, Müller K, Schulte-Mönting J, Schöpf E, Simon JC (1999/2) Saltwater bathing prior to UVB irradiation leads to a decrease of the minimal erythema dose and an increased erythema index without affecting skin pigmentation. *Photochem Photobiol* 69 (3): 341-344
- (94) Schempp CM, Simon-Haarhaus B, Heine A, Schöpf E, Simon JC (1999/3) In vitro and in vivo activation of hypericin with the incoherent light source PDT 1200 SOA (520-750 nm) and with solar simulated radiation (290-2500 nm). *Photodermatol Photoimmunol Photomed* 15: 13-17

- (95) Schempp CM, Pelz K, Wittmer A, Schöpf E, Simon JC (1999/4) Antibacterial activity of hyperforin from St John's wort, against multiresistant *Staphylococcus aureus* and gram-positive bacteria. *Lancet* 1999, 353:212
- (96) Schempp CM, Winghofer B, Lüdtke R, Simon-Haarhaus B, Schöpf E, Simon JC (1999) Topical application of St. John's wort (*Hypericum perforatum*) and of its metabolite hyperforin inhibits the allostimulatory capacity of epidermal cells. *Br J Dermatol*, 2000, 142: 979-984
- (97) Schempp CM, Winghofer B, Lüdtke R, Simon-Haarhaus, Schöpf E, Simon JC (2000/1) Effect of topical application of *Hypericum perforatum* extract (St. John's wort) on skin sensitivity to solar simulated radiation. *Photodermatol Photoimmunol Photomed* 16:125-128
- (98) Schempp CM, Müller KA, Winghofer B, Schöpf E, Simon JC (2002/1) Johanniskraut (*Hypericum perforatum* L.)- eine Pflanze mit Relevanz für die Dermatologie. *Hautarzt* 2002, 53: 316-321
- (99) Schempp CM, Schöpf E, Simon JC (2002/2) Durch Pflanzen ausgelöste toxische und allergische Dermatitis (Phytodermatitis). *Hautarzt* 53:93-97
- (100) Schinazi RF, Chu CK, Babu CK, Oswald BJ, Saalman V, Cannon DL, Eriksson BFH, Nasr M (1990) Anthraquinones as a new class of antiviral agents against human immunodeficiency virus. *Antiviral Res* 13: 265-272
- (101) Schneider G, Hiller K (1999) Arzneidrogen. *Spektrum Akademischer Verlag*, Heidelberg
- (102) Schulz V, Hänsel R (1996) Johanniskraut als Antidepressivum. In: Schulz V, Hänsel R (Hrsg.) Rationale Phytotherapie, Ratgeber für die ärztliche Praxis. *Springer* Berlin, 3. Auflage, pp 56-71
- (103) Sears HW, Bailer JW, Yeadon A (1997) Efficacy and Safety of Hydrocortisone Buterate 0,1% Cream in Patients with Atopic Dermatitis. *Clin Ther* 19:710-719
- (104) Shimo K, et al. (1996) Radioprotective effects of antioxidative plant flavonoids in mice. *Mutat Res* 1996 Feb, 19,350 (1): 153-61
- (105) Simon JC, Krutmann J, Czech W, Kapp A, Schöpf E. (1992) Die epidermale Langerhans-Zelle: Wachposten des Immunsystems gegenüber der Außenwelt. *Hautarzt* 43: 241-249
- (106) Skov L, Baadsgaard O (1996) Ultraviolet B-exposed major histocompatibility complex class II positive keratinocytes and antigen-presenting cells demonstrate a

differential capacity to activate T cells in the presence of staphylococcal superantigens.

*Br J Dermatol* 134: 824-830

- (107) Staffeldt B, Kerb R, Brockmüller J, Ploch M, Roots I (1994) Pharmacokinetics of hypericin and pseudohypericin after oral intake of the hypericum perforatum extract LI 160 in healthy volunteers. *J Geriatr Psychiatry Neurol* 7 (Suppl 1): 47-53
- (108) Suzuki O, Katsumata Y, Oya M, Bladt S, Wagner H (1984) Inhibition of monoamine oxidase by hypericin. *Planta Med* 45: 272-274
- (109) Swoboda M, Meurer J (1991) Therapie von Neurodermitis durch Hamamelis virginiana-Extrakt in Salbenform. *Z Phytother* 12:114-117
- (110) Takahashi T et al. (1998) Structure-activity relationships of flavonoids and the induction of granulocytic- or monocytic - differentiation in HL60 human myeloid leukemia cells. *Biosci Biotechnol Biochem Nov, 62 (11): 2199-204*
- (111) Tang J, Colacino JM, Larsen SH, Spitzer W (1990) Virucidal activity of hypericin against enveloped and non-enveloped DNA and RNA viruses. *Antiviral Res* 13: 313-326
- (112) Thiele B, Brink I, Ploch M (1994) Modulation of cytokine expression by hypericum extract. *J Geriatr Psychiatry Neurol* 7 (Suppl 1): 60-62
- (113) Thomas C, Pardini RS (1992) Oxygen dependence of hypericin phototoxicity to EMT6 mouse mammary carcinoma cells. *Photochem Photobiol* 55: 831-837
- (114) Thomas C, Randall S, MacGill S, Miller GC, Pardini RS (1992) Photoactivation of hypericin generates singlet oxygen in mitochondria and inhibits succinyl oxidase. *Photochem Photobiol* 55: 47-53
- (115) Thumm EJ, Stoss M, Bayerl C, Schürholz T (2000) Überprüfung der Wirksamkeit einer 20%igen und 10%igen Sanddornkernölcreme bei Patienten mit leichter bis mittelgradiger atopischer Dermatitis. *Akt Dermatol* 26:285-290
- (116) Trochon V, (2000). Type p 53 stability and transactivational activity by the chemopreventive agent apigenin in keratinocytes. *Carcinogenesis, 2000, 21 (4), 633-9*
- (117) Utsumi T, Okuma M, Utsumi T, Kanno T, Yasuda T, Kobuchi H, Horton HH, Utsumi K (1995) Light-dependent inhibition of protein kinase C and superoxide generation of neutrophils by hypericin, an antiretroviral agent. *Arch Biochem Biophys* 316: 493-497
- (118) Vandenbogaerde AL, Cuvelle JF, Proot P, Himpens BE, Merlevede WJ, de Witt PA (1997) Differential cytotoxic effects induced after photosensitization by hypericin. *J Photochem Photobiol (B)* 38: 136-142

- (119) Vandenberg AL, Delaey EM, Vantieghem AM, Himpens BE, Merlevede WJ, de Witte PA (1998) Cytotoxicity and antiproliferative effect of hypericin and derivatives after photosensitization. *Photochem Photobiol* 67: 119-125
- (120) Vanderwerf QM, Saxton RE, Chang A, Horton D, Paiva MB, Anderson J, Foote C, Soudant J, Mathey A, Castro DJ (1996) Hypericin: a new laser phototargeting agent for human cancer cells. *Laryngoscope* 106: 479-483
- (121) Voigtländer V. (1977) Genetiki der Neurodermitis. *Ztsch für Hautkrankh* 52: 65 – 71
- (122) Vorbach EU, Hübner OW, Arnoldt KH (1994) Effectiveness and tolerance of the hypericum extract LI 160 in comparison with imipramin: randomized double blind study with 135 outpatients. *J Geriatr Psychiatr Neurol* 7 (Suppl 1): 19-23
- (123) Wang IK et al. (1999) Induction of apoptosis by apigenin and related flavonoids through cytochrome c release and activation of caspase-9 and caspase-3 in leukaemia HL-60 cells. *Eur J Cancer* Oct; 35 (10): 1517-26
- (124) Wang C, et al. (1994) Lignants and flavonoids inhibit aromatase enzyme in human preadipocytes. *J Steroid Biochem Mol Biol* Aug; 50 (3-4): 205-12
- (125) Weiss JM, Renkl AC, Denfeld RW, de Roche R, Spitzlei M, Schöpf E, Simon JC (1995) Low-dose UVB radiation perturbs the functional expression of B7.1 and B7.2 co-stimulatory molecules on human Langerhans cells. *Eur J Immunol* 25: 2858-2862
- (126) Woelk H, Burkard D, Grünwald J (1994) Benefits and risks of the hypericum extract LI 160: drug monitoring study with 3250 patients. *J Geriatr Psychiatry Neurol* 7 (Suppl 1): 34-38
- (127) Wüthrich B. (1996) Epidemiology and natural history of atopic dermatitis. *ACI International* 8: 77 – 82
- (128) Yanoshita R, et al. (1996) Inhibition of lysoPAF acetyltransferase activity by flavonoids. *Inflamm Res*. Nov, 45 (11): 546-9.
- (129) Yu H, Wolford ST, Kegode R, Zhao W, Osweiler D (1996) Hypericin-induced phototoxicity in cultured fibroblasts and swine erythrocytes. *Photochem Photobiol* 64: 168-173

## **CURRICULUM VITAE:**

### **Personalien:**

**Svea Silja Hezel, geb. 04.05.1977 in Schorndorf**

**Eltern:** Vater: Dr. med. Ruland Hezel, Internist

Mutter: Annelie Hezel, geb. Hudelmaier, Gymnasiallehrerin

3 Geschwister

### **Werdegang:**

<b>1983 – 87</b>	Grundschule Winterbach
<b>1988 – 96</b>	Max-Planck-Gymnasium Schorndorf
<b>Juni 1996</b>	Abitur am Max-Planck-Gymnasium Schorndorf
<b>Oktober 1996</b>	Beginn des Studiums Humanmedizin Universität Homburg/Saar
<b>Oktober 1997</b>	Fortsetzung des Studiums Humanmedizin Universität Freiburg i.Br.
<b>August 1999</b>	Erstes Staatsexamen Humanmedizin
<b>Oktober 1999</b>	Faculté de Médecine Cochin Port-Royal, Université René Descartes, Paris
<b>März/April 2002</b>	Zweites Staatsexamen Humanmedizin, Albert-Ludwig-Universität
<b>Mai 2002</b>	Beginn des Praktischen Jahres an der Ludwig-Maximilian- Universität München
<b>August- November 2002</b>	Innere Medizin (generalinternistische Station, Notfallstation, Kardiologie), Universitätsspital Zürich
<b>November 2002-</b>	Chirurgie (Notfallambulanz, Traumatologie, Viszeralchirurgie,

**Februar 2003**

Herzchirurgie), Universitätsspital Zürich

**März-Juni 2003:**Dermatologie, Klinikum Innenstadt der  
Ludwig-Maximilian-Universität, München**Oktober 2003:**Drittes Medizinisches Staatsexamen, Ludwig-Maximilian-  
Universität, München**Praktika/Famulaturen:****März 1997:**

Plastische Kinderchirurgie, Marienhospital Stuttgart

**Februar/März 1999:**

Chirurgie (Notfallambulanz), Bürgerhospital Stuttgart

**März/April 1999:**

Gynäkologie, Universitätsklinik Freiburg

**Oktober/November 1999:**

Kinderchirurgie, Hôpital Cochin Port-Royal , Paris

**Dezember/Januar 2000:**

Oto-Rhino-Laryngologie, Hôpital Cochin Port-Royal, Paris

**Februar 2000:**

Neurologie, Hôpital Sainte-Anne, Paris

**WS 2000/01:**

Wissenschaftsjournalismusseminar i.R. Studium Generale

**Juli 2001:**

Hospitation Wissenschaftsredaktion des SWR, Baden-Baden

**Interessen:** Lesen, Schreiben, Kunst, Ski, Tennis, Segeln.



## **Danksagung:**

Zuerst möchte ich mich bei **Prof. J.C. Simon** aus der Universitätshautklinik Freiburg ganz herzlich bedanken für die Überlassung dieses interessanten und sehr vielseitigen Themas. Die Möglichkeit eine sowohl experimentelle wie klinische Fragestellung zu bearbeiten, hat mir einen interessanten Einblick in wissenschaftliches Arbeiten gegeben.

Ganz besonders möchte ich mich bei **PD Dr. C. Schempp** für die ausgezeichnete Betreuung dieser Arbeit bedanken. Dr. Schempp ist mir jederzeit mit Rat, offenem Ohr und Engagement zur Seite gestanden. Ohne ihn wäre die Arbeit in dieser Form nicht zustande gekommen, wofür ich mich an dieser Stelle nochmals ganz herzlich bedanken möchte.

**Prof. Dr. Runnebaum** möchte ich für die Übernahme des Zweitgutachtens danken.

Ein Dankeschön geht auch an **Birgit Simon-Haarhaus**, die mich im Labor tatkräftig unterstützt hat, mich in Labor- und Zellkulturarbeit eingeführt und jederzeit für Fragen offen war. Auch hier nochmals ein ganz großes Dankeschön an dieser Stelle.

Zuletzt, aber von Herzen, möchte ich mich bei meiner **Familie und all meinen Freunden** bedanken, dass sie mich während meiner Arbeit so interessiert und aufmunternd begleitet haben. Sie haben mir immer wieder neue Kraft für produktives Arbeiten und Schreiben gegeben. Das war für mich eine sehr schöne Erfahrung, für die ich mich herzlichst bedanken möchte.