Untersuchungen zu Wirksubstanzen pflanzlicher Immunstimulanzien und ihrer Wirkungsweise bei peroraler Applikation

E. Teuscher, C. Bodinet, U. Lindequist, J. Freudenstein

Die immunstimulierende Wirkung peroral angewendeter Zubereitungen aus einer Reihe von Pflanzen, z.B. aus Sonnenhut-(*Echinacea*-)Arten, aus der Färberhülse [*Baptisia tinctoria* (L.) VENT.], aus dem Abendländischen Lebensbaum (*Thuja occidentalis* L.) (**Abb. 1**), von Mischungen dieser Zubereitungen oder von Spezialextrakten aus Mischungen dieser Drogen ist gut bekannt. Die Zubereitungen zeigten nicht nur am pharmakologischen Testmodell immunmodulatorische Aktivität [Übersicht bei (2, 3)], sondern sie haben auch in klinischen Versuchen bewiesen, dass sie bei prophylaktischer Anwendung zur Überwindung von temporärer Immunschwäche beitragen und dadurch die Häufigkeit des Auftretens von Atemwegsinfektionen verringern. Bei therapeutischem Einsatz können sie die Symptomatik derartiger Erkrankungen mildern, die Erkrankungsdauer verkürzen und die Rezidivhäufigkeit einschränken. In klinischen Studien konnte ihre Wirksamkeit bei der Prophylaxe und Therapie von anderen Infektionskrankheiten ebenfalls nachgewiesen werden (2, 26, 31, 35, 36).

Die Art der wirksamkeitsbestimmenden Inhaltsstoffe dieser Pflanzen ist jedoch noch nicht völlig geklärt. Als Wirksubstanzen der Sonnenhut-Arten werden Alkamide, Kaffeesäurederivate, z.B. Cichoriensäure, und Polysaccharide bzw. Glykoproteine (1, 31, 34) diskutiert. Bei *Thuja occidentalis* und *Baptisia tinctoria* könnten ebenfalls Polysaccharide bzw. Glykoproteine (6, 8, 19, 33), bei *Thuja occidentalis* darüber hinaus auch Lignane (31) die Wirksubstanzen sein. Möglich ist jedoch auch, dass mehrere Inhaltsstoffe an der Wirkung beteiligt sind (3).

Zusammenfassung

Mit dem Ziel, zur Aufklärung der Art der Wirksubstanzen peroral applizierter Extrakte aus immunstimulierend wirkenden Pflanzen und ihres Wirkungsmechanismus beizutragen, wurden In-vitro-, Ex-vivo- und In-vivo-Untersuchungen mit Extrakten aus den Wurzeln von Echinacea-Arten und von Baptisia tinctoria sowie aus Triebspitzen von Thuja occidentalis, aus Mischungen dieser Drogen sowie mit den makromolekularen Komponenten dieser Extrakte durchgeführt. Die Ergebnisse zeigen, dass die makromolekularen Komponenten invitro, verglichen mit den Gesamtextrakten, die gleiche oder stärkere immunstimulierende Wirkung besitzen; dass immunkompetente Zellen des Darmes sowie die der Milz durch perorale Applikation der Extrakte aktiviert werden können; dass eine Immunsuppression durch perorale Applikation der Extrakte aufgehoben werden kann; dass die perorale Applikation der Extrakte an mit Influenzaviren infizierten Mäusen zur Abschwächung der Erkrankungssymptome und zur Erhöhung der Überlebensrate führt; dass Extrakte aus Drogenmischungen eine günstigere Wirkung als Einzelextrakte aufweisen.

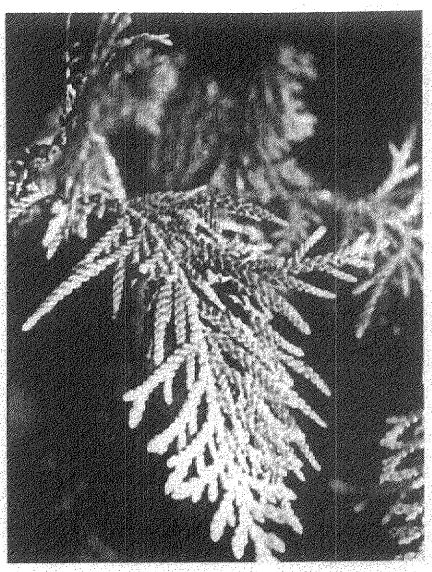
Es wird gefolgert, dass die makromolekularen Komponenten der Extrakte, besonders die Polysaccharide/Glykoproteine, bei Kontakt mit den immunkompetenten Zellen der Schleimhäute des Rachens und Darmes diese Zellen in erhöhte Alarmbereitschaft versetzen. Die Bereitschaft zur sofortigen Abwehrreaktion nach Kontakt mit fremden Makromolekülen, besonders mit Mikroorganismen, wird durch Rezirkulation der aktivierten Zellen auf andere Bereiche des Körpers übertragen.

Forschungsbedarf bei Wirkungsweise

Auch über die Wirkungsweise der Zubereitungen herrscht keine völlige Klarheit. Zunächst wurde eine Einschränkung der Ausbreitung von Infektionserregern durch Hemmung der Hyaluronidase (24) oder eine virostatische Wirkung (4, 7, 23) angenommen. Heute gehen die meisten Autoren davon aus, dass die Wirkung durch Stimulation immunkompetenter Zellen zustande kommt.

Während bei parenteraler, vorwiegend intravenöser Anwendung von Extrakten aus den Drogen, wie sie früher praktiziert wurde, eine direkte Einwirkung der Wirksubstanzen auf die immunkompetenten Zellen des Blutes und der Gewebe anzunehmen ist, bleibt es bei der heute üblichen peroralen Anwendung in Form von Tabletten oder flüssigen Arzneiformen unklar, wie eine systemische Wirkung erreicht wird. Nach peroraler Applikation einer *Echinacea*-Tinktur konnten die in der Droge vorkommenden isomeren Alkamide Dodeca-2*E*,4*E*,8*Z*,10*E*-tetraensäure-isobutylamid und Dodeca-2*E*,4*E*,8*Z*,10*Z*-tetraensäure-isobutylamid zwar im Blut von Patienten nachgewiesen werden (15), da jedoch auch an Alkamiden arme wässrige Extrakte bzw. Presssäfte aus *Echinacea*-Arten, von Alkamiden freie Extrakte aus *Thuja occidentalis* und *Baptisia tinctoria* sowie makromolekulare Fraktionen von Drogenextrakten volle Wirksamkeit besitzen, bleibt die Frage ihrer Beteiligung an der immunstimulierenden Wirkung weiterhin offen.

Denkbar ist, dass die Wirkung durch direkten Kontakt der Extrakte mit immunkompetenten Zellen der Schleimhäute hervorgerufen wird. Als derartige Reaktionspartner kommen in Betracht:



▲ *Abbildung 1: Pflanzen, deren Extrakte als Immunstimulanzien verwendet werden: Echinacea purpurea (Wurzeln), Baptisia tinctoria (Wurzeln), Thuja occidentalis (Sprossspitzen)*

- Zellen des Waldeyer-Rachenringes (auch als NALT bezeichnet, nasal-associated lymphoid tissue, u.a. aus Rachenmandeln, Zungenmandeln, Gaumenmandeln, Tubenmandeln bestehend),
- Zellen des Schleimhaut-assoziierten lymphatischen Gewebe des Darmes (GALT, gut-associated lymphoid tissue), das besonders die Zellen der Peyer'schen Plaques (kleine in der Dünndarmschleimhaut liegende weiße Knötchen aus lymphoidem Gewebe) umfasst,
- und möglicherweise auch Zellen der oberen Bronchienabschnitte, d.h. des Bronchus-assoziierten lymphatischen Gewebes (BALT, bronchus-associated lymphoid tissue) (18, 31).

Sollte diese Annahme Bestätigung finden, bleibt unklar, ob und wie die Signaltransduktion von den Kontaktstellen in diesen Geweben zu anderen immunkompetenten Zellen des Körpers erfolgt.

Um zur Klärung dieser Fragen beizutragen, wurde im Rahmen einer Dissertation (9), aufbauend auf früher gewonnene eigene experimentelle Daten und die anderer Autoren, in Versuchen an immunkompetenten Zellen in vitro sowie an Versuchstieren (Mäusen) in vivo und ex vivo zu klären versucht,

- ob immunkompetente Zellen durch die makromolekularen Komponenten der Pflanzenextrakte in vitro aktiviert werden können,
- ob bei der Entfernung der mikromolekularen Komponenten aus den Extrakten Wirkungsverluste auftreten,
- ob ex vivo/in vivo Veränderungen der immunologischen Parameter von immunkompetenten Zellen eines mit den Extrakten behandelten Versuchstieres, die mit den Extrakten nicht direkt in Kontakt gekommen sind, nachgewiesen werden können,
- ob Zytokine für die Signaltransduktion verantwortlich sind,
- ob temporäre Immunschwäche, z.B. hervorgerufen durch partielle Immunsuppression, oder ob altersbedingte chronische Immunschwäche durch perorale Applikation der Extrakte gemildert werden kann,
- ob Effekte der peroral applizierten Extrakte im Tierversuch bei Virusinfektionen nachweisbar sind,
- ob der Einsatz von Extrakten aus Gemischen verschiedener immunmodulatorisch wirkender Drogen gegenüber Extrakten aus Einzeldrogen Vorteile bietet.

Material und Methoden

Einzeldrogenextrakte wurden durch zehntägige Mazeration von Triebspitzen des Abendländischen Lebensbaums (*Thuja occidentalis* L.), von Wurzeln der Färberhülse [*Baptisia tinctoria* (L.) VENT.], des Purpur-Sonnenhutes [*Echinacea purpurea* (L.) MOENCH] oder des Bleichen Sonnenhutes [*Echinacea pallida* (NUTT.) NUTT.] mit der 10fachen Menge 30%igen Ethanols bei Raumtemperatur gewonnen. Nach Filtration über eine G4-Fritte wurde im Umlaufverdampfer eingeengt und gefriergetrocknet.

Zur Bereitung des Mischextraktes wurde eine Mischung der genannten Drogen (entsprechend dem Herstellungsverfahren für den Immunmodulator Esberitox® N[1]) im Verhältnis von 1:5:1,875:1,875 (*Thuja* : *Baptisia* : *Echinacea purp.* : *Echinacea pall.*) mit der 11fachen Menge 30%igen Ethanols (V/V) vormazeriert und anschließend perkoliert. Das Perkolat wurde im Vakuum eingeengt und gefriergetrocknet (Mischextrakt) oder zur Befreiung von den kleinmolekularen Bestandteilen über Tiefenfilter (KS 80) filtriert, in einer Dialyseanlage (SP 20, Fa. Amicon) über eine S10Y10-Patrone (Cut off 10000 Dalton)

[1] Firma Schaper & Brümmer GmbH & Co. KG, Salzgitter-Ringelheim

gegen demineralisiertes Wasser dialysiert und anschließend gefriergetrocknet (Retentatfraktion). Es erfolgte die Bestimmung

- der Zytotoxizität an HeLa-Zellkulturen mit Hilfe eines Fluoreszenzassays mit dem Substrat 4-Methylumbelliferylheptanoat (16),
- der In-vitro-Proliferationsrate von Milzzellen aus NMRI- und C3H/HeJ-Mäusen durch Messung des Einbaus von ^{3}H-markiertem Thymidin (28),
- von IL-1, IL-6 und TNF-α im Zellkulturüberstand von P388C-Maus-Makrophagen sowie von humanen Blutmonozyten mit Hilfe spezifischer Bioassays bzw. kommerzieller ELISAs,
- von IFN-αβ im Zellkulturüberstand von Mausmilzzellen durch Hemmung des zytopathischen Effekts von Vesicular Stomatitis Virus (VSV) auf murine L 929-Zellen, quantifiziert durch parallele Titration mit murinem Referenzinterferon (29)
- des Gehalts an Immunglobulin M in den Zellkulturüberständen mit Hilfe eines für Maus-IgM spezifischen ELISAs,
- der Anzahl von antikörperbildenden Mausmilzzellen und von Peyer'schen Plaque-Zellen ex vivo nach Stimulation mittels der Hämolyse-Plaque-Technik entweder mit der allgemein üblichen direkten Methode (Erfassung der IgM-bildenden Plasmazellen) oder mit der sog. umgekehrten Hämolyse-Plaque-Technik durch Kopplung von Protein A aus *Staphylococcus aureus* an die Schaferythrozyten und Entwicklung mit Anti-Ig-Seren [Erfassung aller Immunglobulin-synthetisierenden Zellen unabhängig von ihrer Spezifität (polyklonale B-Lymphozyten-Reaktion) (25)],
- der NO-Produktion von alveolären Maus-Makrophagen (MH-S-Zellen) in den Zellkulturüberständen durch Erfassung der Konzentration an NO_2^- als stabiles Endprodukt im sog. Griess-Assay (20),

Tabelle 1: Einfluss von Extrakten bzw. Retentaten aus *Thuja-occidentalis*-Sprossspitzen (Thuja occ.), *Baptisia-tinctoria*-Wurzeln (Bapt. tinct.), *Echinacea-purpurea*-Wurzeln (E. purp.) und *Echinacea-pallida*-Wurzeln (E. pall.) auf immunologische Parameter in vitro

Parameter In vitro	Testzellen[1)]	Testfraktion	maximaler Stimulationsindex (SI) [2)] Thuja occ.	Bapt. tinct.	E. purp.	E. pall.
Lymphozyten-proliferation	NMRI-Milzzellen	Extrakt	<1	4,3	7,0	3,7
		Retentat	5,3	11,7	20,0	10,1
	C3H/HeJ-Milzzellen	Retentat	3,6	6,2	20,4	10,6
Zytokininduktion						
IL-1	P388C	Retentat	11,2	4,2	2,1	1,2
IL-6		Retentat	1,3	1,4	1,1	1,7
TNF-α		Retentat	1,7	4,4	6,3	1,4
IFN-αβ	NMRI-Milzzellen	Retentat	19	19	5	30
IL-1	humane Monozyten	Retentat	16,4	16,9	25,6	10,9
IL-6		Retentat	5,4	5,3	6,1	5,0
TNF-α		Retentat	11,9	11,4	15,6	7,0
Stickoxid-produktion	alveoläre Makrophagen	Extrakt	<1	4,5	1,2	1,0
		Retentat	24,3	21,5	15,5	5,0
Antikörper-produktion IgM	NMRI-Milzzellen	Retentat	5,9	8,5	5,2	7,5
plaquebildende Zellen:						
Anti-SRBC-IgM bildende Zellen		Retentat	6,2	4,0	5,6	3,6
alle Ig bildende Zellen		Retentat	5,8	5,1	7,4	4,5

1) Eingesetzte Zellen: Primäre Milzzellsuspensionen aus NMRI-Mäusen und aus LPS-Low-Responder C3H/HeJ-Mäusen, P388C-Maus-Makrophagen-Zelllinie, isolierte Monozyten aus humanem Vollblut, alveoläre Mausmakrophagen.

2) Stimulationsindex (SI) = $\frac{\text{Messwerte der Testansätze}}{\text{Messwerte der Mediumkontrollen}}$

Wiedergegeben sind die maximalen Stimulationsindices, d.h. die SI-Werte für die bei Konzentrationen der Extraktlyophilisate bzw. Retentate von 10 bis 500 µg Trockengewicht/ml Zellkulturmedium maximal erreichbaren Effekte. Weitere statistische Angaben: siehe Lit. (5, 9).

- der Zytokininduktion in vivo in Anlehnung an die Methoden von Engelberts et al. (17),
- des Einflusses der peroralen Applikation des Mischextraktes auf die Immunantwort von Mäusen gegenüber Schaferythrozyten mittels des »plaque-forming-cell (PFC)«-Assay (21), darüber hinaus wurden Milzgewicht, Gesamtzellzahl in der Milz, der Hämagglutinationstiter im Serum und das Blutbild ermittelt,
- des Einflusses der peroralen Applikation des Mischextraktes an Mäuse auf die Zytokinkonzentration im Serum bzw. der Ex-vivo-Zytokinproduktion von Milzzellen und Peritonealmakrophagen mit Hilfe kommerzieller ELISAs,
- der Wirkung des Mischextraktes in einem Influenzavirus-Infektionsmodell der Maus auf Überlebensrate, Überlebenszeit, Virustiter in der Lunge und Ausmaß der pathologischen Veränderungen des Lungengewebes der Tiere auf Grundlage des von Mentel et al. etablierten Tiermodells (27).

Die pharmakologischen Testmodelle sind ausführlich bei Bodinet (9) beschrieben.

Tabelle 2: Einfluss peroral applizierter Retentate von Extrakten aus *Thuja-occidentalis*-Sprossspitzen, *Baptisia-tinctoria*-Wurzeln, *Echinacea-purpurea*-Wurzeln, *Echinacea-pallida*-Wurzeln und einer Mischung dieser Drogen auf die Anzahl der plaquebildenden Zellen (PFC) in den Peyer'schen Plaques (PP)

p.o.-applizierte Retentate	maximaler Stimulationsindex (SI)	
	Ex-vivo-Sekundärstimulation	
	Zellkulturmedium	LPS (90 µg/ml)
Thujae occidentalis herba	1,4	4,4
Baptisiae tinctoriae radix	1,8	6,0
Echinaceae purpureae radix	1,4	5,9
Echinaceae pallidae radix	2,1	8,8
Mischextrakt	1,5	10,5

Die PP-Zellen wurden 15 h nach der Applikation der Retentate (1 mg/Tier) per Schlundsonde isoliert und in vitro mit SRBC mit oder ohne LPS (90 µg/ml) sieben Tage inkubiert. Die Zahl an antikörperbildenden Zellen in den PP-Kulturen wurde mit Hilfe des PFC-Assays quantitativ bestimmt. Weitere statistische Angaben: siehe Lit. (9, 12).

$$\text{Stimulationsindex} = \frac{\text{PFC PP behandelte Tiere}}{\text{PFC PP Kontrolltiere}}$$

Tabelle 3: Einfluss der peroralen Applikation des Mischextraktes auf die IL-2-, INF-γ- und GM-CSF-Produktion von Maus-Milzzellen ex vivo

	Interleukin-2 (pg/ml)		Interferon-γ (pg/ml)		GM-CSF (pg/ml)	
Gruppe	Kontrolle	Extrakt	Kontrolle	Extrakt	Kontrolle	Extrakt
Medium	42°	68°	56°	3430 ± 1078	6,9°	88,5 ± 30,4
+ Con A	1371 ± 86	2500 ± 141	19130 ± 3578	85418 ± 27319	374 ± 56	660 ± 38,2
+ LPS	192 ± 168	454 ± 164	136700°	184470°	656,5 ± 74,2	1523 ± 382,5

Der Extrakt wurde via Trinkwasser in einer durchschnittlichen Dosis von 260 µl Extrakt/kg KG täglich an drei aufeinander folgenden Tagen appliziert. 24 h nach der letzten Applikation wurden die Milzzellen geerntet und mit +/– ConA bzw. LPS für 48 h bei 37 °C und 5 % CO_2 inkubiert. Die Zytokintiter in den Überständen wurden mittels ELISA quantifiziert (11).
° Werte außerhalb der Eichkurve

Tabelle 4: Einfluss der peroralen Applikation des Mischextraktes auf die Antikörperantwort gegenüber Schaferythrozyten (SRBC)

Gruppe	Anzahl PFC/10^6 Milzzellen	Hämagglutinationstiter
Kontrolle	502 ± 234	606 ± 571
Mischextrakt	1014 ± 517*	1440 ± 746*

Der Mischextrakt wurde NMRI-Mäusen in Form einer Wirkstoffdiät in einer mittleren Tagesdosis von 215 µl Extrakt/kg KG an sieben aufeinander folgenden Tagen verabreicht. Die Mäuse wurden am 4. Tag mit SRBC immunisiert. Der PFC-Assay und die Bestimmung des Hämagglutinationstiters wurden am Tag 8 durchgeführt.
n = 10 Mäuse/Gruppe; *$p < 0,05$ vs. Kontrolle (Students t-Test).

Ergebnisse

Wirkung der makromolekularen Komponenten (Retentate) auf immunkompetente Zellen in vitro

Zur Klärung der Frage, ob die makromolekularen Komponenten der Extrakte immunmodulierende Wirkung besitzen, wurden isolierte immunkompetente Zellen zusammen mit im Zellkulturmedium gelösten Retentaten der Einzeldrogen inkubiert. Wie aus den in **Tab. 1** kumulierten Ergebnissen der Untersuchungen an isolierten Zellen ersichtlich ist, führten die Retentate zur

- Steigerung der Proliferationsrate von NMRI-Mäuse-Milzzellen und LPS-Low-Responder C3H/HeJ-Milzzellen,
- Erhöhung der Freisetzung von Zytokinen wie IL-1, IL-6 und TNF-α durch P388C-Mausmakrophagen und humane Monozyten sowie von IFN-αβ durch isolierte Milzzellen von NMRI-Mäusen,
- Steigerung der Produktion von Stickstoffmonoxid (NO) durch alveoläre Mausmakrophagen,
- Verstärkung der Antikörperantwort, gemessen an der Erhöhung des IgM-Titers und an der Anzahl plaquebildender Zellen von NMRI-Mäuse-Milzzellen im direkten und umgekehrten Hämolyse-Plaque-Assay.

Die Effekte traten konzentrationsabhängig in Bereichen von 10 bis 500 µg Retentat-Trockengewicht/ml Kulturmedium auf. In einigen Fällen war der Effekt bei Überschreitung einer bestimmten Konzentration rückläufig.

Die Wirkungen der Retentate aus den verschiedenen Drogen auf die untersuchten Parameter waren unterschiedlich stark ausgeprägt. Bei *Thuja*-Retentaten trat die Aktivierung der Makrophagen, charakterisiert durch die erhöhte IL-1-Ausscheidung, besonders hervor. Bereits minimale Konzentrationen des *Baptisia*-Retentats induzierten eine starke Erhöhung der IgM-Titer. Bei den Retentaten aus *Echinacea purpurea* lag der Schwerpunkt bei der Förderung der Proliferation von Milzzellen und der Steigerung der Zytokinbildung, besonders von TNF-α. Bei *Echinacea pallida* lag der Wirkungsschwerpunkt bei der Förderung der IFN-αβ-Ausschüttung.

Mikro- oder/und Makromoleküle als wirksamkeitsbestimmende Stoffe

Sowohl die Extrakte als auch die Retentate führten in vitro zur Aktivierung immunkompetenter Zellen (**Tab. 1**). Dabei war die stimulierende Wirkung der Retentate stets stärker ausgeprägt. So wurde beispielweise die Proliferationsrate von Milzzellen aus NMRI-Mäusen durch das im Kulturmedium gelöste Lyophilisat des Extraktes aus der Wurzel von *Echinacea purpurea* um das 7fache und durch die entsprechende Konzentration der Retentatfraktion um mehr als das 20fache erhöht.

Die Retentate waren auch bei peroraler Applikation voll wirksam. Das zeigte die durch sie ausgelöste Aktivierung der Zellen der Peyer'schen Plaques (s. u., **Tab. 2, Abb. 2**)

Wirkungen peroral applizierter Retentate auf immunkompetente Zellen des GALT ex vivo

Zur Untersuchung der Wirkung pflanzlicher Immunstimulanzien nach peroraler Applikation wurden Mäusen Retentate mit Hilfe einer Schlundsonde verabreicht. Die Zellen der Peyer'schen Plaques, mit denen die Retentate nach peroraler Applikation direkt oder vermittelt durch die M-Zellen in Kontakt kamen, wurden 15 h nach der Applikation isoliert und ihre Immunoreaktivität mit Hilfe des Hämolyse-Plaque-Assays bestimmt. Der Anteil der antikörperbildenden Zellen in den Peyer'schen Plaques der mit den Drogenextrakt-Retentaten oder dem Retentat des Extraktes der Drogenmischung behandelten Tiere war im Vergleich zu dem der Kontrolltiere höher, besonders wenn die Zellen ex vivo durch Lipopolysaccharid zusätzlich stimuliert wurden (**Tab. 2, Abb. 2**) (12).

Bemerkenswerterweise reagierten die einzelnen Tiere des NMRI-Stammes (Auszuchtstamm) bei Gabe der Einzeldrogenextrakte sehr unterschiedlich: Neben sehr stark auf die Stimulation ansprechenden gab es auch einige nicht reagierende Tiere. Tiere der Inzuchtstämme C3H/HeJ und Balb/c zeigten hinsichtlich der Reaktionsstärke weitgehende Homogenität.

Tabelle 5: Einfluss der peroralen Applikation des Mischextraktes auf die Immunantwort gegen Schaferythrozyten (SRBC) in durch Hydrocortisongabe immunsupprimierten NMRI-Mäusen

Behandlungsgruppe	Milzgewicht (g)	Gesamtzellzahl/ Milz	PFC/10^6 Milzzellen	Hämagglutinationstiter
1. Kontrolle	0,19 ± 0,02	6,1 ± 0,1 x10^7	730 ± 379	1283 ± 1140
2. Hydrocortison	0,15 ± 0,02*	3,8 ± 1,7 x10^7*	231 ± 303*	378 ± 508
3. Hydrocortison + Extrakt	0,17 ± 0,01**	5,9 ± 0,8 x10^7**	1004 ± 606**	1760 ± 944

Der Mischextrakt wurde in Form einer Wirkstoffdiät in einer mittleren Tagesdosis von 230 µl Extrakt/kg KG an sieben aufeinander folgenden Tagen verabreicht. Die Mäuse wurden am 4. Tag mit SRBC immunisiert. Hydrocortison (25 mg/kg) wurde i.p. an zwei Tagen vor der Immunisierung appliziert. Der PFC-Assay wurde am 8. Tag durchgeführt.

n = 6 Mäuse/Gruppe; *p < 0,05 vs. Kontrolle (Gruppe 1);
**p < 0,05 vs. Hydrocortison-Gruppe (Gruppe 2) (Students t-Test).

Wirkungen peroral applizierter Extrakte auf immunkompetente Zellen der Milz ex vivo/in vivo

Während bei Zellen der Peyer'schen Plaques nach peroraler Anwendung ein direkter Kontakt mit den Makromolekülen der Extrakte erfolgt, kommen Milzzellen hingegen (da eine Resorption der Makromoleküle ausgeschlossen werden kann) bei dieser Art der Applikation mit den wirksamen Komponenten der Extrakte nicht in Kontakt. Dennoch produzierten isolierte Milzzellen von NMRI-Mäusen, denen 1–9 Tage mit dem Trinkwasser der Mischextrakt zugeführt worden war, ex vivo größere Mengen an IL-2, GM-CSF und IFN-γ als die der Kontrolltiere. Dieser Unterschied war am 3. Tag nach Behandlungsbeginn besonders groß. Er ließ sich durch Zusatz von Lipopolysaccharid zum Kulturmedium, aber auch von Concanavalin A potenzieren (**Tab. 3**). Ähnliche Effekte konnten hinsichtlich der Bildung von IL-1 und TNF-α durch Peritonealmakrophagen nachgewiesen werden (11).

Auch die gegen Schaferythrozyten (SRBC) gerichtete Immunantwort der Milzzellen der eingesetzten Mäusestämme (NMRI, C3H/HeJ, Balb/c) war bei den Tieren, die den Extrakt aus der Drogenmischung erhalten hatten, größer als bei den Tieren der Kontrollgruppen. Die Applikation des Antigens (SRBC) erfolgte bei diesen Versuchen intraperitoneal am 4. Tag nach Beginn der Behandlung mit dem Extrakt. Die Anzahl der antikörperbildenden Zellen wurde am 4. oder 5. Tag nach der Immunisierung mit Hilfe der PFC-Technik ermittelt. Darüber hinaus wurden die Hämagglutinationstiter der behandelten Tiere quantifiziert. Am ausgeprägtesten war der Effekt bei Applikation des Mischextraktes mit dem Futter. Das spricht dafür, dass auch die Aktivierung der immunkompetenten Zellen des Rachenraumes an der Wirkung beteiligt ist (**Tab. 4**). Auch bei einer Langzeitapplikation über fünf Monate kam es nicht zum Verschwinden des Effekts (10).

Wirkungen peroral applizierter Extrakte auf den Zytokintiter

Bei intravenöser Applikation der Retentate der Einzelextrakte und des Misch-

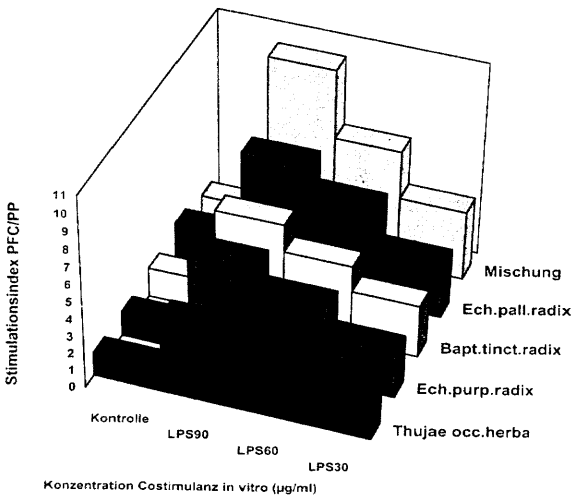


Abbildung 2: Einfluss peroral applizierter Retentate von Extrakten aus Thuja-occidentalis-Sprossspitzen (Thujae occ. herba), Baptisia-tinctoria-Wurzeln (Bapt. tinct. radix), Echinacea-purpurea-Wurzeln (Ech. purp. radix), Echinacea-pallida-Wurzeln (Ech. pall. radix) und einer Mischung dieser Drogen auf die Anzahl plaquebildender Zellen (PFC) in den Peyer'schen Plaques (PP)

$$\text{Stimulationsindex SI} = \frac{\text{PFC PP behandelte Tiere}}{\text{PFC PP Kontrolltiere}}$$

Die PP-Zellen wurden 15 h nach der Applikation der Retentate (1 mg/Tier) per Schlundsonde isoliert und ex vivo mit SRBC mit oder ohne LPS (30–90 µg/ml) sieben Tage inkubiert. Die Anzahl an antikörperbildenden Zellen in den PP-Kulturen wurde mit Hilfe des PFC-Assays quantitativ bestimmt. Weitere statistische Angaben: siehe Lit. (9, 12).

Tabelle 6: Einfluss der peroralen Applikation des Mischextraktes auf die Immunantwort gegen Schaferythrozyten (SRBC) bei »alten« C3H/HeJ Mäusen

Gruppe	PFC/10^6 Milzzellen	Hämag-glutinationstiter	Milzgewicht (g)	Gesamtzellzahl/ Milz
Kontrolle	917 ± 140	1189 ± 242	0,14 ± 0,02	7,4 ± 2 x 10^7
Extrakt	1308 ± 475*	1920 ± 1491	0,21 ± 0,08*	11,6 ± 3,1 x 10^7*

Der lyophilisierte Mischextrakt wurde 12 Monate alten C3H/HeJ-Mäusen via Trinkwasser in einer durchschnittlichen Dosis von 309 µl Extrakt/kg KG täglich an sieben aufeinander folgenden Tagen appliziert. Die Mäuse wurden mit SRBC am 4. Tag nach Beginn der Applikation immunisiert. Die Bestimmung der antikörperbildenden Zellen erfolgte mittels PFC-Assay am 8. Tag.
n = 10 Mäuse/Gruppe; *$p < 0,05$ vs. Kontrolle (Students t-Test).

extraktes, kommt es, wie bereits früher berichtet (5), zu einem erhöhten Blutspiegel an IL-1, IL-6 und TNF-α. Obwohl isolierte Milz- und Peritonealzellen von peroral mit dem Mischextrakt behandelten NMRI-Mäusen ex vivo eine verstärkte Bildung von Zytokinen (s.o.) zeigten, waren die Konzentrationen an IL-1, IL-2, TNF-α, GM-CSF und IFN-γ im Blut nicht nachweisbar erhöht (11).

Wirkungen peroral applizierter Extrakte bei Tieren mit partiell supprimiertem Immunsystem

Um zu untersuchen, ob durch endogene oder exogene Faktoren ausgelöste Zustände partieller Immunsuppression mit Hilfe peroraler Applikation pflanzlicher Immunstimulanzien überwunden werden können, wurden Versuchstiere (C3H/HeJ- bzw. NMRI-Mäuse), bei denen die Funktionstüchtigkeit des Immunsystems entweder durch Gabe von Hydrocortison (25 mg/kg KG, i.p.) beeinträchtigt worden oder durch ihr Alter (12 Monate) eingeschränkt war, durch perorale Applikation des Mischextrakts im Trinkwasser oder Futter behandelt.

Nach i.p. Applikation eines Modellantigens (SRBC) wurden die Anzahl antikörperbildender Milzzellen dieser Tiere mit Hilfe der PFC-Technik bestimmt und Hämagglutinationstiter, Milzgewicht und die Anzahl der Zellen pro Milz ermittelt.

Durch Gabe von Hydrocortison konnten die Anzahl der plaquebildenden Milzzellen der NMRI-Mäuse und der Hämagglutinationstiter stark reduziert werden. Wurde neben Hydrocortison auch der Mischextrakt gegeben, kam es zu einer Aufhebung des immunsupprimierenden Effektes des Hydrocortisons (**Tab. 5**).

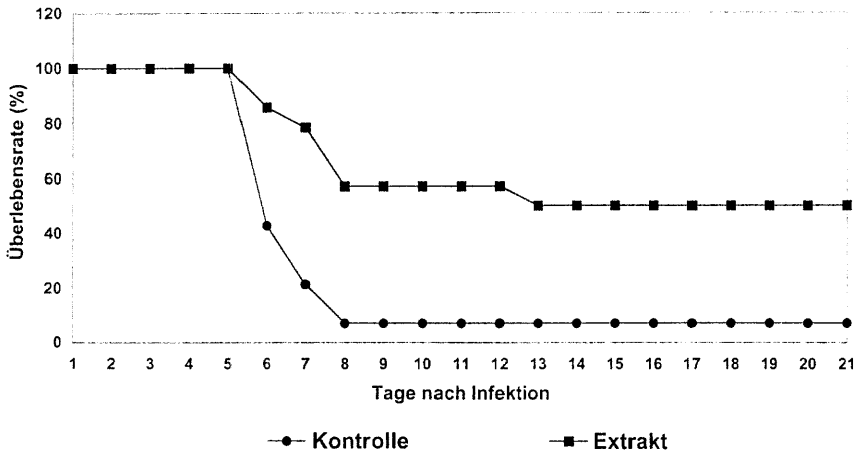


Abbildung 3: Einfluss der peroralen Applikation des Mischextraktes auf die Überlebensrate von mit Influenza-A-Virus infizierten Balb/c-Mäusen

Der Mischextrakt wurde per Trinkwasser in einer mittleren Tagesdosis von ca. 150 µl/kg KG von Tag −6 bis +7 appliziert. Die Infektion mit Influenzavirus erfolgte am Tag d = 0 ($10^{3.5}$ $TCID_{50\%}$) (13).

Bei den relativ alten C3H/HeJ-Mäusen konnte durch perorale Gabe des Extraktes eine Antikörperantwort (Anzahl der plaquebildenden Milzzellen und Hämagglutinationstiter) erreicht werden, die der von jungen Mäusen mit voll funktionstüchtigem Immunsystem entsprach (**Tab. 6**). Auch das Milzgewicht und die Gesamtzellzahl der Milz der partiell immunsupprimierten Tiere wurden durch die Behandlung erhöht (11).

Wirkung peroral applizierter Extrakte bei mit Influenzaviren infizierten Versuchstieren

Um zu untersuchen, ob die Verbesserung der immunologischen Parameter nach peroraler Applikation der immunstimulierenden Extrakte bei Versuchstieren den Verlauf von Infektionen durch Viren positiv beeinflussen kann, wurde das Influenzavirus-Maus-Modell eingesetzt. Der Mischextrakt wurde mit dem Trinkwasser gegeben, beginnend am 6. Tag vor der intranasalen Infektion der Mäuse mit Influenzavirus A und an den Tagen 1 bis 7 nach der Infektion. Die Überlebensrate der mit dem Pflanzenextrakt behandelten Tiere war, verglichen mit der der unbehandelten Kontrollgruppe, stark erhöht (**Abb. 3**). Ihre Überlebenzeit war signifikant verlängert. Die pathologischen Befunde der Lunge waren sowohl makroskopisch als auch histologisch geringer. Der Virustiter im Lungengewebe lag am 5. Tag nach der Infektion in der unbehandelten Gruppe bei 5,5, bei der behandelten Gruppe 4,75. Darüber hinaus waren auch die Hämagglutinationstiter im Lungenextrakt der behandelten Tiere (**Abb. 4**) gegenüber denen der unbehandelten Tiere signifikant erniedrigt (13).

Vergleich der Wirkungen von Mischextrakten mit Extrakten der Einzeldrogen

Die Wirkcharakteristika der Einzeldrogenextrakte waren in dem des Mischextraktes wiederzufinden. Im Unterschied zu den Testfraktionen aus den Einzeldrogen, die nicht in allen Testmodellen eine gleich bleibend starke Aktivität zeigten und für die unterschiedliche Wirkungsschwerpunkte erkennbar sind,

zeigte der Mischextrakt ein breiteres Wirkungsspektrum mit einer gleichermaßen starken Aktivität, wobei einzelne Wirkungen bei Vergleich mit denen der Einzeldrogenextrakte oft stärker ausgeprägt waren. Als Beispiele sind hier zu nennen die IFN-Produktion von Mauslymphozyten, die NO-Produktion durch alveoläre Makrophagen, die Produktion von IgM-Antikörpern in vitro oder, wie bereits erwähnt, die Aktivierung von Peyer'schen Plaques nach peroraler Applikation (s. **Abb. 2** und **Abb. 5–7**).

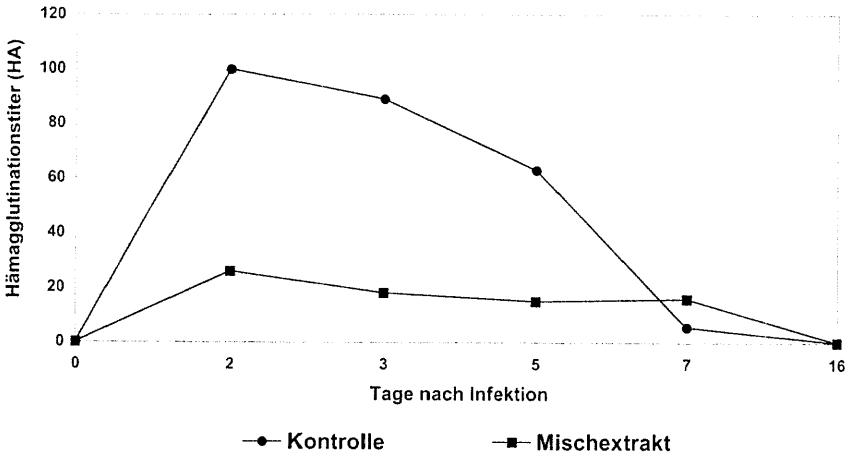


Abbildung 4: Einfluss der peroralen Applikation des Mischextraktes auf den Hämagglutinationstiter in Lungenextrakten von mit Influenza-A-Virus infizierten Balb/c-Mäusen

Der Mischextrakt wurde via Trinkwasser in einer mittleren Tagesdosis von 150 µl Extrakt/kg KG von Tag –6 bis +7 verabreicht. Die Infektion mit Influenzaviren erfolgte am Tag d = 0 ($10^{3.5}$ $TCID_{50\%}$). Der HA-Titer in den Überständen wurde mit Hilfe eines Hämagglutinationstestes quantifiziert (13).

Diskussion

Über die stimulierende Wirkung von Extrakten aus den oben genannten Pflanzen auf isolierte immunkompetente Zellen liegen zahlreiche Untersuchungen vor [Übersicht bei (2, 3)]. Die oben dargestellten Ergebnisse und andere Untersuchungen (33, 34) zeigen, dass diese Stimulation auch dann erfolgt, wenn die mikromolekularen Komponenten der Extrakte entfernt werden. Durch die makromolekulare Fraktion allein werden die Proliferationsrate, die Ausschüttung von Zytokinen, von Stickoxid und Antikörpern durch immunkompetente Zellen stimuliert. Die Tatsache, dass auch die Proliferationsrate von Milzzellen von C3H/HeJ-Mäusen erhöht wird, die nicht oder kaum auf Lipopolysaccharide ansprechen, zeigt, dass die Wirkung nicht auf Verunreinigungen der Retentate mit Lipopolysacchariden beruht. Offenbar spielen also die Makromoleküle der Extrakte, d.h. die Heteropolysaccharide und/oder Glykoproteine, die Hauptrolle bei der Aktivierung. Dafür spricht auch die Beobachtung, dass die stimulierende Wirkung der Retentate sowohl bei In-vitro-Untersuchungen als auch bei peroraler Applikation der der Rohextrakte vergleichbar ist oder sie übertrifft.

Es ist anzunehmen, dass die Makromoleküle mit Rezeptoren der immunkompetenten Zellen in Wechselwirkung treten, die normalerweise für die Erkennung von Zellwandmakromolekülen von eindringenden Mikroorganismen zuständig sind. Beispielsweise wurden an Monozyten und neutrophilen Granulozyten Rezeptoren für Pilz-Polysaccharide nachgewiesen (22). Auch die Bindung an »Toll-Like-Rezeptoren« könnte beim Erkennen der pflanzlichen Makromoleküle und bei der Aktivierung von immunkompetenten Zellen eine Rolle spielen (14).

Vermutlich werden bei peroraler Gabe zunächst die immunkompetenten Zellen der unspezifischen Immunabwehr des Nasen-Rachenraumes und des Verdauungstraktes aktiviert, die mit den Komponenten der Extrakte unmittelbar in Kontakt kommen. Dafür spricht, dass nach peroraler Gabe der Retentate die Immunantwort der Zellen der Peyer'schen Plaques verstärkt wird. Diesen Zellen werden von den M-Zellen des Darmes die fremden Makromoleküle präsentiert.

Signaltransduktion nachweisbar

Der topische Effekt wird auf andere, durch die Makromoleküle nicht erreichbare immunkompetente Zellen, z.B. der Milz oder des Blutes, »durchgestellt«. Das zeigt der Befund, dass nach peroraler Applikation des Mischextraktes isolierte Milzzellen der behandelten Tiere ex vivo in verstärktem Maße Zytokine ausscheiden. Auch ihre Fähigkeit

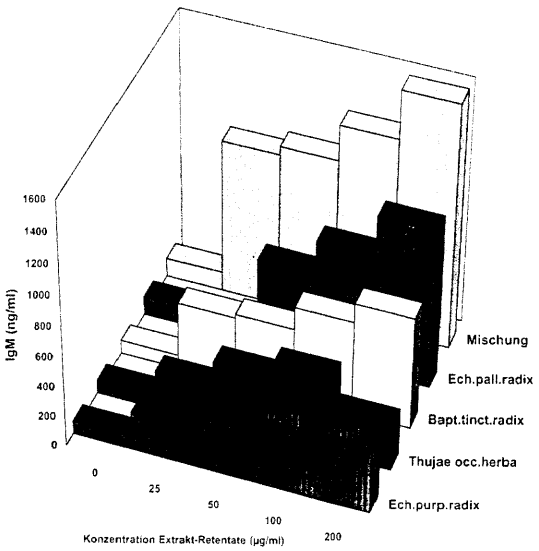
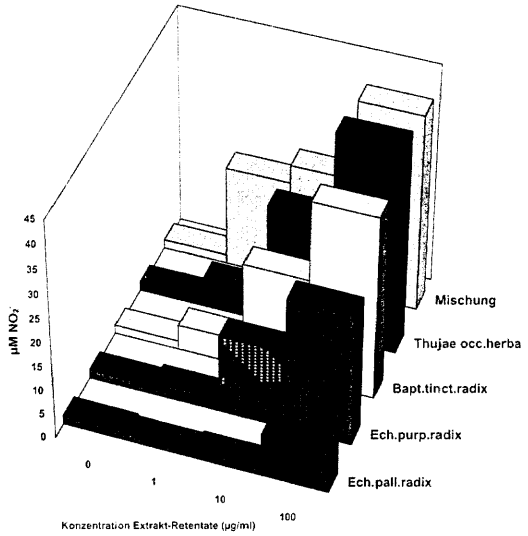


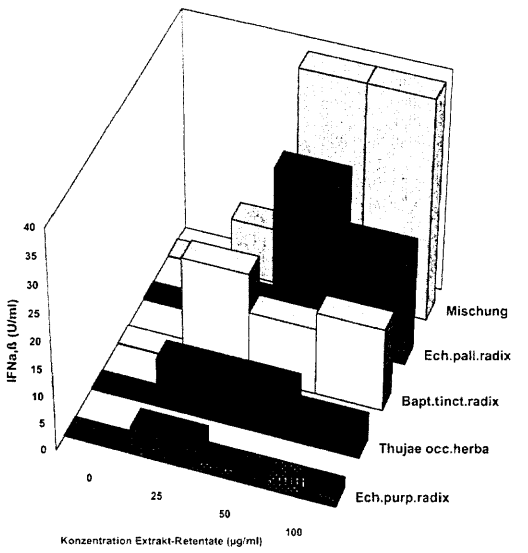
Abbildung 5: Einfluss der Retentate von Extrakten aus Thuja-occidentalis-Sprossspitzen (Thuja occ. herba), Baptisia-tinctoria-Wurzeln (Bapt. tinct. radix), Echinacea-purpurea-Wurzeln (Ech. purp. radix), Echinacea-pallida-Wurzeln (Ech. pall. radix) und einer Mischung dieser Drogen auf die IgM-Produktion von Maus(NMRI)-Milzzellen in vitro

Statistische Angaben: siehe Lit. (9)



▲ ***Abbildung 6: Einfluss von Extrakten-Retentaten aus Thuja-occidentalis-Sprossspitzen (Thuja occ. herba), Baptisia-tinctoria-Wurzeln (Bapt. tinct. radix), Echinacea-purpurea-Wurzeln (Ech. purp. radix), Echinacea-pallida-Wurzeln (Ech. pall. radix) und eines Extraktes aus einer Mischung dieser Drogen auf die NO-Produktion von alveolären Maus-Makrophagen (MH-S) in vitro***

Statistische Angaben: siehe Lit. (9)



▲ ***Abbildung 7: Einfluss der Retentate von Extrakten aus Thuja-occidentalis-Sprossspitzen (Thuja occ. herba), Baptisia-tinctoria-Wurzeln (Bapt. tinct. radix), Echinacea-purpurea-Wurzeln (Ech. purp. radix), Echinacea-pallida-Wurzeln (Ech. pall. radix) und einer Mischung dieser Drogen auf die IFN-Produktion von Maus(NMRI)-Milzzellen in vitro***

Statistische Angaben: siehe Lit. (9)

zur Antikörperbildung gegen Schaferythrozyten ist verstärkt.

Offen ist die Frage, wie diese Signaltransduktion von der Peripherie zum Blut oder zur Milz geschieht. Die Annahme, dass die Übertragung durch eine Erhöhung der Konzentration von Zytokinen im Blut erfolgt, ließ sich durch unsere Untersuchungen nicht bestätigen. Die Serumkonzentration an IL-1, IL-2, TNF-α, GM-CSF und IFN-γ war bei den behandelten Versuchstieren nicht höher als bei den Kontrolltieren. Es ist daher sehr wahrscheinlich, dass sich, wie bereits von Wagner et al. postuliert (31), die durch die Immunstimulanzien angeregten Zellen nach Wiedereintritt in den Blutkreislauf in anderen Bereichen des Körpers, z. B. in anderen Schleimhautbezirken, ansiedeln (Rezirkulation und Homing) und auf Grund ihrer erhöhten Zytokinproduktion ihre Nachbarzellen aktivieren.

Vermutlich kommt also der protektive und kurative Effekt der pflanzlichen Immunstimulanzien vor allem durch eine Aktivierung der immunkompetenten Zellen der Kontaktstellen mit dem Immunstimulans im Rachenraum und Darm, gefolgt von der Stimulierung des gesamten Systems der unspezifischen Abwehr der Schleimhaut zustande. Auch eine Förderung der spezifischen Abwehr, bedingt durch ihre enge Verzahnung mit der unspezifischen Abwehr, ist zu erwarten.

»Priming« der Zellen

Bemerkenswert ist die Beobachtung, dass alle immunstimulierenden Effekte durch eine simulierte Attacke auf die immunkompetenten Zellen, in unserem Falle durch Ex-vivo-Costimulation mit Lipopolysaccharid, einem Endotoxin gramnegativer Bakterien, oder durch das Schwertbohnen-Lektin Concanavalin A stark gesteigert werden konnten. Dies deutet auf ein »Priming« der Zellen hin. Das heißt, die immunkompetenten Zellen werden durch die Behandlung mit dem Immunstimulans in erhöhte Abwehrbereitschaft versetzt, die es ihnen erlaubt, bei einer Attacke durch fremde Moleküle rasch und nachhaltig reagieren zu können, ohne ihre Abwehrmechanismen ständig auf »Hochtouren« laufen zu lassen. Das ist ein sehr ökonomisches Verhalten des Körpers.

Wirksamkeit bei Immunschwäche

Die Überwindung temporärer Schwächen der unspezifischen Abwehr ist das Hauptanliegen des medizinischen Einsatzes pflanzlicher Immunstimulanzien. Deshalb wurde geprüft, ob die durch Applikation von Hydrocortison ausgelöste Immunschwäche und die bekannte altersbedingte Herabsetzung der Funktionstüchtigkeit des Immunsystems bei 12 Monate alten Mäusen, also bei einer durchschnittlichen Lebenserwartung von etwa 18 Monaten relativ alten Tieren, durch die Extrakte überwunden werden kann. Die Resultate der Versuche belegen eindeutig, dass dies der Fall ist.

Die Annahme, dass die durch perorale Applikation von Pflanzenextrakten erreichte Immunstimulation de facto prophylaktische und therapeutische Wirkung hat, wurde durch Untersuchungen am Influenzavirus-Maus-Modell bestätigt. Eine Beteiligung virostatisch wirkender Komponenten an diesem Effekt ist wenig wahrscheinlich, aber nicht vollständig auszuschließen.

Synergistische Effekte bestätigt

Wagner und Jurcic (32) haben bei In-vitro- und In-vivo-Versuchen festgestellt, dass bei Mischung von Extrakten aus mehreren immunstimulierenden

Drogen synergistische Effekte auftreten. Diese Aussage ließ sich auch durch die hier vorliegenden Ergebnisse bestätigen. Die Tatsache, dass bei den genetisch relativ heterogenen Auszuchtstämmen der Mäuse im Gegensatz zu den genetisch einheitlichen Inzuchtstämmen die Effekte nicht bei jedem Versuchstier stark ausgeprägt waren, deutet darauf hin, dass es bei den Versuchstieren, wie auch beim Menschen, Responder und Nonresponder für die Einzeldrogen gibt. Die Anwendung von Mischextrakten macht daher den Erfolg sicherer. Auch Umkehrwirkungen bei Überdosierung ließen sich bei Einsatz des Mischextrakts weit gehend ausschließen, da die immunsuppressiv wirkenden Konzentrationen der Einzeldrogen erst bei in der Praxis nicht erreichbaren Dosen auftreten. Dadurch wird die therapeutische Breite erhöht. Ebenso konnte gezeigt werden, dass die immunstimulierende Wirkung bei langfristiger Anwendung bestehen bleibt (10).

Fazit

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass der immunstimulierende Effekt der Pflanzenextrakte bei peroraler Anwendung sehr wahrscheinlich auf einer lokalen, antigenunabhängigen Aktivierung der Zellen des Schleimhaut-assoziierten lymphatischen Systems beruht. Die Zellen der unspezifischen Abwehr werden in einen Zustand erhöhter Abwehrbereitschaft versetzt und können bei einer Attacke durch Infektionserreger rasch reagieren. Die Abwehrbereitschaft wird, vermutlich durch Rezirkulation und »Homing« immunkompetenter Zellen, auf andere Bereiche des Körpers übertragen. Die Effekte werden bei temporärer Immunschwäche besonders deutlich und haben eine positive Wirkung bei der Prophylaxe und Therapie von Infektionen. Wegen der geringen Konzentrationen der Immunmodulatoren bei medizinischer Anwendung werden, wie experimentell nachgewiesen werden konnte, keine Antikörper gegen die Wirksubstanzen gebildet. Ihr Einsatz ist also theoretisch über einen unbeschränkt langen Zeitraum möglich.

Weil der Erstkontakt mit immunkompetenten Zellen bereits im Rachenraum stattfindet, sollten für die Anwendung der Pflanzenextrakte Arzneiformen gewählt werden, z.B. lutschbare Tabletten, die eine intensive Wechselwirkung mit diesen Zellen garantieren. Mischextrakte haben gegenüber Extrakten aus einer Droge den Vorteil, dass sich die bei den Einzeldrogenextrakten auftretenden Wirkungsspitzen addieren und dass sie auch auf den Extrakt aus einer Droge wenig oder nicht ansprechende Personen in der Population voll erfassen.

Prof. Dr. Eberhard Teuscher
Goethestraße 9
07950 Triebes

Prof. Dr. Ulrike Lindequist
Ernst-Moritz-Arndt-Universität Greifswald
Institut für Pharmazie – Pharmazeutische Biologie
F.-L.-Jahn-Straße 15a
17489 Greifswald

Dr. Cornelia Bodinet*
Dr. Johannes Freudenstein
Schaper & Brümmer
Postfach 61 11 60
38251 Salzgitter

* Korrespondierender Autor

Literatur

1 Bauer R: Arzneipflanzenporträt: *Echinacea* – welche Inhaltsstoffe wirken immunmodulierend? Dtsch Apoth Ztg 1992; 132: 1233–1235.
2 Bauer R: Pflanzliche Immunstimulanzien in der Selbstmedikation. Pharm uns Zeit 1998; 27: 144–157.
3 Bauer R: Chemistry, analysis and immunological investigations of *Echinacea* phytopharmaceuticals. In Wagner H (ed.): Immunmodulatory Agents from Plants. Basel, Boston: Birkhäuser; 1999: 41–88.
4 Bauer R, Wagner H: *Echinacea*. Ein Handbuch für Ärzte, Apotheker und andere Naturwissenschaftler. Stuttgart: Wiss. Verlagsgesellschaft; 1990.
5 Beuscher N, Bodinet C, Willigmann I, Egert D: Immunmodulierende Eigenschaften von Wurzelextrakten verschiedener *Echinacea*-Arten. Z Phytotherapie 1995; 16: 157–166.
6 Beuscher N, Kopanski L: Modulation of the immune response by polymeric substances from *Baptisia tinctoria* and *Echinacea angustifolia*. Adv Biosci 1988; 68: 329–336.
7 Beuscher N, Kopanski L: Purification and biological characterization of antiviral substances from *Thuja occidentalis*. Planta Med 1986; 52: 555–556.
8 Beuscher N, Scheit KH, et al.: Modulation der körpereigenen Immunabwehr durch polymere Substanzen aus *Baptisia tinctoria* und *Echinacea purpurea*. In: Masihi KN, Lange W (eds.): Immunotherapeutic Prospects of Infectious Diseases. Berlin: Springer; 1991: 2161–2115.
9 Bodinet K: Immunpharmakologische Untersuchungen an einem pflanzlichen Immunmodulator [Dissertation]. Greifswald: Universität; 1999.
10 Bodinet C, Freudenstein J: Effects of an orally applied aqueous-ethanolic extract of a mixture of Thujae occidentalis Herba, Baptisiae tinctoriae Radix, Echinaceae purpureae Radix and Echinacea pallidae Radix on antibody response against sheep red blood cells in mice. Planta Med 1999; 65: 695–699.
11 Bodinet C, Lindequist U, et al.: Effect of an orally applied herbal immunomodulator on cytokine induction and antibody response in normal and immunosupressed mice. Phytomedicine 2002; 9: 606–613.
12 Bodinet C, Lindequist U, et al.: Influence of peroral application of a herbal immunomodulator on the antibody production of Peyer's patches-cells. Arzneim Forsch 2003, accepted for publication.
13 Bodinet C, Mentel R, et al.: Effect of oral application of an immunomodulating plant extract on influenca virus type A infection in mice. Planta Med 2002; 68: 896–900.
14 Brightbill HD, Modlin R: Toll-like receptors: molecular mechanisms of the mammalian immune response. Immunology 2000; 101: 1–10.
15 Dietz B, Heilmann J, Bauer R: Absorption of dodeca-2E,4E,8Z,10E/Z-tetraenoic acid isobutylamides after oral application of *Echinacea purpurea* tincture. Planta Med 2001; 67: 863–864.
16 Dotsika EN, Sanderson CJ: A fluorimetric assay for determining cell growth in lymphoproliferation and lymphokine assays. J Immunol Methods 1987; 105: 55–62.
17 Engelberts I, von Asmuth EJ, et al.: The interrelation between TNF, IL-6 and PAF secretion induced by LPS in an in vivo and in vitro murine model. Lymphokine Cytokine Res 1991, 10: 127–131.
18 Franz G: Pflanzliche Immunstimulanzien: Anspruch und Wirklichkeit. Apotheken-Journal 1997; 19: 26–32.
19 Gohla SH, Neth RD: Gezielte Immunstimulation durch eine Polysaccharidfraktion aus *Thuja occidentalis*. Therapeutikon 1988; 2: 717–725.
20 Green SJ, Aniagolu J, Raney JJ: Oxidative metabolism of murine macrophages. In: Coligan JE, Kruisbeck AM, et al. (eds.): Current Protocols in Immunology. New York: John Wiley & Sons; 1997: 14.5.1–14.5.11.
21 Holsapple MP: The plaque-forming cell (PFC) response in immunotoxicology. In: Burleson

GR, Dean JH, Munson AE (eds.): Methods in Immunotoxicology; Vol 1; New York: Wiley-Liss; 1995: 71–108.
22 Czop JK, Kay J: Isolation and characterization of beta glucan receptors on human mononuclear phagocytes. J Exp Med 1991, 173: 1511–1520.
23 Khurana SMP: Effect of homoeopathic drugs on plant viruses. Planta Med 1971; 20: 142–146.
24 Koch FE, Haase H: Eine Modifikation des Spreading Testes im Tierversuch, gleichzeitig ein Beitrag zum Wirkungsmechanismus von Echinacin. Arzneim-Forsch 1952; 2: 464–467 .
25 Malberg K, Siegl E: Hämolyse-Plaque-Technik. In: Friemel H (Hrsg.): Immunologische Arbeitsmethoden, 4. Aufl., Jena: Fischer; 1991: 70–86.
26 Melchart D, Linde K, et al.: Immunomodulation with *Echinacea* – a systematic review of controlled clinical trials. Phytomedicine 1994; 1: 245–254.
27 Mentel R, Wegner U, et al. et al.: Einfluß von Diacetylsplenopentin auf den Verlauf von Coxsackievirus-B4 und Influenzavirus-Infektionen im Tiermodell. Hyg Med 1992; 17: 493–496.
28 Shevach EM: Labeling cells in microtiter plates for determination of [^{3}H] thymidine uptake. In: Coligan JE ; Kruisbeck AM, et al. (eds.): Current Protocols in Immunology. New York: John Wiley & Sons; 1997: A3D1.
29 Vogel SN, Hogan MM: Measurement of antiviral activity induced by interferons alpha, beta and gamma. In: Coligan JE, Kruisbeck AM, et al. (eds.): Current Protocols in Immunology: New York; John Wiley & Sons; 1997. 6.9.1–6.9.7.
30 Vogel SN, Hogan MM.: Measurement of antiviral activity induced by interferons alpha, beta and gamma. In: Coligan JE ; Kruisbeck AM et al.(Eds): Current Protocols in Immunology. New York: John Wiley & Sons; 1997: 6.9.1-6.9.
31 Wagner H: Pflanzliche Immunstimulanzien. Zur Prophylaxe von Erkältungskrankheiten. Z Phytotherapie 1996; 17: 79–95.
32 Wagner H, Jurcic K: Immunologische Untersuchungen von pflanzlichen Kombinationspräparaten. Arzneim-Forsch 1991; 35: 1069–1075.
33 Wagner H, Proksch A, et al.: Immunstimulierend wirkende Polysaccharide (Heteroglykane) aus höheren Pflanzen. Arzneim-Forsch 1982; 35: 1069–1075.
34 Wagner H, Stuppner H, et al.: Gewinnung von immunologisch aktiven Polysacchariden aus *Echinacea*-Drogen und -Gewebekulturen. Z Phytotherapie 1989; 10: 35–38.
35 Wüstenberg P (Hrsg.): Stärkung der Abwehrkräfte mit pflanzlichen Wirkstoffen bei Atemwegerkrankungen. Stuttgart: Aesopus 1997.
36 Wüstenberg P, Köhler G, et al.: Phytopharmakon zur Immunmodulation. Dtsch Apoth Ztg 2000; 140: 2189–2197.

Summary

Investigations of the active substances of herbal immunostimulants and their effect after peroral application

The object of the investigations was to enlighten the kind of active agents and the mechanisms of action of immunostimulating plant extracts perorally applied by in vitro, ex vivo and in vivo experiments using extracts of the roots of Echinacea species and of Baptisia tinctoria as well as from apexes of shoots of Thuja occidentalis, mixtures of these drugs and fractions of the extracts containing only their macromolecular components. The data of the experiments show,

- *that the macromolecular components of the extracts have in vitro the same immunostimulating effect as the whole extracts,*
- *that immunocompetent cells of the gut (cells of the Peyer's patches) and spleen of mice, having no direct contact with the components of the extract, can be activated by perorally applied extracts,*
- *that immunosuppression, caused by application of hydrocortisone or by the high age of the experimental animals, can be compensated by the perorally applied extracts,*
- *that the extracts perorally applied to mice, which were infected with influenza viruses, can induce a decrease of the symptoms of the disease and enhance the survival rate of the animals,*
- *that the extracts obtained from a mixture of the above mentioned plant parts have a better efficiency than extracts of a single herbal plant.*

We draw the conclusion that the macromolecular components, especially the polysaccharides/glycoproteins of the plant extracts coming in contact with the immunocompetent cells of the mucosa of the pharynx and the gut, put these cells on the alert. The enhanced readiness to react immediately after contact with foreign macromolecules, especially with that of microorganisms, is transmitted to all parts of the body by recirculation of the activated cells.

Key words

Herbal immunomodulators, *Echinacea spp.*, *Baptisia tinctoria*, *Thuja occidentalis*, immunostimulating compounds, mechanism of immunostimulation, peroral application