

Sonderdruck / Reprint

Arzneimittel-Forschung Drug Research

Arzneim.-Forsch./Drug Res. **36 (II)**, 9, 1421—1425 (1986)
ECV · Editio Cantor Verlag · Aulendorf (Fed. Rep. of Germany)



Aus dem Institut für Pharmazeutische Biologie¹ und dem Institut für Anaesthesiologie Bereich Polikliniken²,
Universität München

Die Beeinflussung der Phagozytosefähigkeit von Granulozyten durch homöopathische Arzneipräparate

In-vitro-Tests und kontrollierte Einfachblindstudien

Von H. Wagner¹, K. Jurcic¹, A. Doenicke², E. Rosenhuber² und N. Behrens²

Die Beeinflussung der Phagozytosefähigkeit von Granulozyten durch homöopathische Arzneipräparate

In-vitro-Tests und kontrollierte Einfachblindstudien

Von H. Wagner¹, K. Jurcic¹, A. Doenicke², E. Rosenhuber² und N. Behrens²

Zusammenfassung: 4 homöopathische Kombinationspräparate mit Extraktverdünnungen zwischen D1 und D30 (Bezeichnung für homöopathische Potenzstufen) und einigen Zusätzen (Mineralien und tierische Gifte) wurden in zwei In-vitro- und einem In-vivo-Phagozytosemodell auf ihre phagozytosestimulierende Wirkung hin untersucht. Alle Präparate führten in allen drei Immunmodellen zu einer signifikanten Steigerung der Phagozytoseaktivität.

2 Präparate (C und D) wurden an 5 aufeinanderfolgenden Tagen an 12 bzw. 14 Verum- und je 13 männlichen Placeboprobanden i.v. verabreicht und die Phagozytoseindizes peripherer Granulozyten über einen Zeitraum von 11 Tagen mit Hilfe des mikroskopischen Ausstrich-Testes bestimmt. In beiden kontrollierten Einfachblindstudien kam es bereits nach der 1. Injektion zu einer deutlichen Steigerung der Phagozytoseaktivität, die ihren Höhepunkt zwischen dem 4. und 5. Injektionstag erreichte. Nach der 4. bzw. 5. (vorletzten bzw. letzten) Injektion erfolgte ein rascher Aktivitätsabfall, der am 11. Tag übereinstimmend normale Werte erreichte. Andere untersuchte Laborparameter wurden nicht beeinflusst.

Summary: Influence of Homoeopathic Drug Preparations on Phagocytic Activity of Human Granulocytes / In vitro tests and controlled single-blind studies

Four homoeopathic drug preparations with extract dilutions between D1 and D30 (expression for the homoeopathic grade of potencies) and some additives (minerals and animal toxins) were investigated, using two in vitro and one in vivo phagocytosis models. All preparations enhanced significantly the activity of phagocytosis in all used systems.

In controlled prospective single-blind studies with the preparations C and D performed on 12 and 14 verum and 13 male placebo volunteers respectively with i.v. injections within a 5-day treatment the phagocytosis indices were measured during 11 days using the microscopic smear method. In both investigations the maximum of phagocytosis activity was reached between the 4th and 5th day of injection. After the 4th or 5th (next to the last or last) injection, a rapid decrease of activity occurred which reached normal values on the 11th day. Other laboratory parameters investigated were not influenced.

Key words: Homoeopathic plant preparations, immunostimulatory activity, in vitro tests, phagocytosis

1. Einleitung

In der Roten Liste [22] sind über 150 Präparate unter den Bezeichnungen Immunstimulantien, Umstimmungsmittel, Lymphmittel, Präparate zur Reizkörpertherapie und adjuvanten Krebstherapie oder Grippemittel registriert. Entsprechend den Indikationsangaben wird von den Präparaten ein unspezifischer Einfluß auf zelluläre und humorale Abwehrsysteme erwartet. Soweit es sich um Präparate pflanzlicher Herkunft handelt, enthalten die oral oder parenteral angewendeten Präparate Extraktkombinationen in Verdünnungen von D1 bis D30, wobei jedoch Verdünnungen von D1 bis D6 überwiegen. Sie sind daher als Homöopathika einzustufen. Bei den Bezeichnungen D1 bis D30 handelt es sich um Bezeichnungen für einzelne homöopathische Potenzstufen (Verdünnungen). Diese werden nach den im amtlichen homöopathischen Arzneibuch (HAB) enthaltenen Vorschriften hergestellt. Dezimalpotenzen werden mit dem Buchstaben D gekennzeichnet. Die dahinterstehende Zahl bezeichnet die Anzahl der vorgenommenen Potenzierungsstufen (Verdünnungsschritte). Die Zusammensetzung der meisten Präparate weist Zusätze von Mineralien (z. B. Phosphor, Silicea, Eisensalze) oder tierischen Giften (z. B. Acidum formicum, Lachesis, Apis) auf. Die in den Präparaten zur An-

wendung kommenden Extrakte stammen von nicht mehr als 20 Pflanzen. Von diesen sind z. B. Echinacea, Eupatorium, Calendula, Thuja oder Baptisia besonders häufig vertreten [1].

Die wenigen bisher für diese Präparategruppe erbrachten Wirk- und Wirksamkeitsnachweise lassen erkennen, daß bevorzugt das phagozytäre System der Immunabwehr beeinflusst zu werden scheint. Nach vorausgegangenen In-vitro-Studien mit einem Kombinationspräparat [2-5] konnten Kluthe u. Mitarb. [6] in 2 getrennten Doppelblindstudien an gesunden Probanden mit täglich 0,9 mg p.o. Gabe von Aristolochiasäure zeigen, daß es bereits nach 3 Tagen zu einer gesteigerten Phagozytoseaktivität kam. Ein weiterer Probandenversuch, durchgeführt von Möse [7] mit einem intramuskulär applizierten Echinacea-Präparat, führte zu einem ähnlichen Ergebnis. Weitere Studien mit dem erstgenannten Kombinationspräparat bei bakterieller bzw. viraler Infektion [8, 9] ließen gleichfalls neben einer subjektiven Besserung des Krankheitsverlaufes ein Ansteigen der Phagozytoseaktivität erkennen.

Ziel der vorliegenden Untersuchungen war es, in In-vitro- und In-vivo-Studien den Einfluß von einigen exemplarisch

ausgewählten Homöopathika völlig unterschiedlicher Zusammensetzung auf die Phagozytoseaktivität von humanen neutrophilen Granulozyten bzw. Makrophagen kennenzulernen.

Die In-vitro-Untersuchungen sollten vor allem dazu dienen, die am besten geeignete Testmethode und Dosierung für die Probandenversuche herauszufinden. Für die In-vitro-Untersuchungen wurden der Granulozyten-Ausstrich-Test in einer Modifikation von Brandt [10] und der Chemolumineszenz-Test nach Allen [11] eingesetzt. Für den In-vivo-Nachweis der Phagozytosestimulierung stand der carbon clearance-Test an der Maus nach Biozzi u. Mitarb. [12] zur Verfügung. Für die Messung der Phagozytoseaktivität im Rahmen der kontrollierten Einfachblindstudie verwendeten wir wegen seiner guten Reproduzierbarkeit den Granulozyten-Ausstrich-Test. Zusätzlich wurden Immunglobulin (IG)-Serumkonzentrationen, Leukozytenkonzentrationen und die Werte der Blutkörperchensenkungsreaktion (BKS) bestimmt.

2. Material und Methoden

2.1. Injektionspräparate

Präparat A*): 1,1 ml enthalten Aconitum D3 4,4 µl, Eupatorium perfol. D2 1,1 µl, Phosphorus D4 0,11 µl, Lachesis D11 2,2 µl und Bryonia D3 2,2 µl.

Präparat B*): 1,1 ml enthalten Vincetoxicum D6, Vincetoxicum D10, Vincetoxicum D30 6,6 µl, Pflanzenasche von Vincetoxicum D30 1,1 µl, Sulfur D4, Sulfur D10 3,3 µl.

Präparat C: (1 : 1 Mischung der Präparate A + B) 2,2 ml.

Präparat D: 2 ml enthalten Echinacea angustifolia D1 0,4 ml, Lachesis D10 0,3 ml, Eupatorium perfol. D3 0,2 ml, Gelsemium D4 0,2 ml, Aconitum D4 0,3 ml und Ascorbinsäure 40 mg.

2.2. Granulozyten-Test

Dieser wurde in einer modifizierten Methode nach Brandt [10] durchgeführt. Gewinnung der Granulozyten nach Wagner u. Mitarb. [13]. Die Granulozytensuspension wurde mit PBS-Puffer (Phosphatgepuffertes Salz) auf 5×10^6 Zellen/ml eingestellt. Hefesuspension: In 0,9% NaCl suspendierte, auf 100 °C erhitzte Bäckerhefe wurde auf $3-5 \times 10^7$ Partikel/ml eingestellt.

2.2.1. Versuchsansatz

0,2 ml Poolserum, 0,2 ml Granulozyten- und 0,2 ml Hefesuspension, 0,2 ml Injektionslösung; Anfärbung der Granulozyten mit May-Grünwald- und Giemsa-Lösung. Auswertung von 100 Granulozyten/Objektträger.

2.2.2. Berechnung

Steigerung der Phagozytoseaktivität = (Phagozytoseindex Substanz - Ph. I. Kontrolle/Ph. I. Kontrolle) \times 100%.

2.3. Chemolumineszenz-Test

Der Test wurde in einer modifizierten Form [13] nach Allen [11] durchgeführt. Lumigene Substanz: Lucigenin (Sigma, Taufkirchen); Zymosan (Sigma) und Messung im 6-Kanal-Biolumat LB 9505 (Berthold, München).

2.3.1. Versuchsansatz

645 µl Veronal-gepufferte NaCl-Lösung, 15 µl Zellsuspension (15000 PMNL = polymorphnukleäre neutrophile Leukozyten), 100 µl Lucigenin 1 (1 mmol/l) und 200 µl Injektions- bzw. NaCl-Lösung. Die Messung erfolgte über einen Zeitraum von 60 min. Die Meßeinheiten sind in cpm angegeben.

2.4. Carbon clearance-Test

Die Durchführung erfolgte nach Biozzi u. Mitarb. [12].

2.4.1. Tiermaterial

NMRI-Mäuse weiblich, 30-35 g KG. Kollektivgröße K = 7 Tiere/Injektionslösung im Vergleich zu 7 nur mit 0,9% NaCl-Lösung vorbehandelten Tieren. Tuschesuspension (Schwarz Nr. 591017, Teilchengröße 20-35 µm; Rotring-Werke, Riepe KG, Hamburg). Durchführung des Versuchs nach [14]. Es wurden 0,25, 0,5, 0,7 bzw. 1,0 ml Injektionslösung/kg KG 24 h vor Testbeginn i.p. injiziert. Am darauffolgenden Tag erhielt jede Maus 0,3 ml Tuschesuspension/30 g KG i.v. verabreicht. Die Blutentnahme aus dem retro-orbitalen Venenplexus erfolgte 3, 6, 9, 12 und 15 min nach der i.v. Injektion.

*) Präp. A = Gripp-Heel®, Präp. B = Engystol®; Hersteller: Biologische Heilmittel Heel GmbH, Baden-Baden.

2.5. Prospektive Einfachblindstudien

Präparat C (2,2 ml): 27 männliche Probanden im Alter von 19-30 Jahren, Körpergewicht 64-83 kg; 14 Probanden in der Verumgruppe, 13 in der Placebogruppe.

Präparat D (2 ml): 25 männliche Probanden im Alter von 27-28 Jahren, Körpergewicht von 62-85 kg; 12 Probanden in der Verumgruppe, 13 in der Placebogruppe.

Die Behandlung erfolgte durch i.v. Injektion von je 2,2 bzw. 2 ml (rechtsseitig) jeweils morgens zwischen 7.30 und 8.15 Uhr in nüchternem Zustand im Anschluß an die vorausgegangene Blutentnahme. Die Placebogruppe erhielt die gleiche Menge physiol. Kochsalzlösung. Die Blutentnahmen erfolgten 3 Tage vor der 1. Injektion, sowie am 1., 2., 3., 4., 5., 8. und 11. Tag. Die Injektionen erfolgten jeweils am 1., 2., 3., 4. und 5. Tag.

Pro Proband und Testzeitpunkt wurden zwei Objektträger für die Granulozytenauswertung angelegt. Für die weiteren Berechnungen wurde jeweils der Mittelwert aus den beiden Einzelwerten errechnet.

- Die Auswertung der Objektträger (Granulozyten) war als Doppelblindstudie angelegt, d. h. der Auswerter kannte die Zuordnung nicht.
- Die Zuordnung der Probanden erfolgte nach einem Randomisierungsplan, der von einer 3. Person erstellt wurde. Die Probanden wurden alphabetisch aufgelistet, durchnummeriert und dann dem Randomisierungsplan entsprechend in Gruppen zugeteilt.
- Die Studie wurde entsprechend der Deklaration von Helsinki und § 40 AMG 1976 durchgeführt.

Die Probanden bestätigten schriftlich, daß sie freiwillig an der Studie teilgenommen haben und über Ablauf, mögliche Risiken sowie die Möglichkeit, jederzeit ohne Angabe von Gründen aus der Studie ausscheiden zu können, vom verantwortlichen Prüfer aufgeklärt worden sind.

2.6. Statistische Auswertung

Die statistische Auswertung erfolgte am Institut für Medizinische Informationsverarbeitung, Statistik und Biomathematik (ISB) der Universität München (Vorstand Prof. Dr. K. Überla, Betreuung Frau Schubert-Frietschle). Zur Anwendung kam die Rangvarianzanalyse nach Friedman mit anschließenden multiplen Vergleichen nach Wilcoxon und Wilcox. Dieser Test zeigt signifikante Unterschiede innerhalb einer Therapiegruppe zwischen verschiedenen Stichprobenzeitpunkten auf.

Zum anschließenden Vergleich zwischen Therapie- und Placebogruppe wurde Wilcoxon's U-Test nach Mann-Whitney [15] herangezogen. Dieser Test prüft jeweils die zu gleichen Zeitpunkten erhaltenen unabhängigen Werte der Therapie- und Placebogruppe auf signifikante Unterschiede.

2.7. Bestimmung der Immunglobuline (A, G und M)

Die Bestimmung der IG erfolgte unter Verwendung des Auto-ICS Laser Nephelometers (Beckmann).

2.8. Bestimmung hämatologischer Parameter

Bestimmt wurden Hämoglobin, die Erythrozyten- und Leukozytenkonzentration sowie der Hämatokritwert mit Hilfe des Coulter Counter-Modells S 5 (Fa. Coulter).

2.9. Klinisch-chemische Parameter

Die Bestimmung der Transaminasen GOT, GPT, γ -GT, alkalische Phosphatase und des Gesamteiweißes erfolgte mit bekannten Routinemethoden. Blutzucker wurde mittels kinetischer Sauerstoffmessung bestimmt. Die Blutsenkung wurde in üblicher Weise mit dem Sedifix-System (Braun, Melsungen) bestimmt.

3. Ergebnisse

3.1. Detailliertere Ergebnisse

Die χ^2 -Werte und die U-Werte wurden den entsprechenden Tabellen entnommen.

3.1.1. Friedman-Test

Präparatemischung C

für N = 14 und K = 7 errechnet sich: $\chi^2 = 44,97$; Signifikanz auf 0,1%-Niveau bei χ^2 22,46.

Präparat D

Für N = 12 und K = 7 errechnet sich: $\chi^2 = 54,14$; Signifikanz auf 0,1%-Niveau bei χ^2 22,41.

Placebo

Für N = 13 und K = 7 errechnet sich: $\chi^2 = 15,93$; Signifikanz auf 5%-Niveau bei χ^2 12,32.

Es ergibt sich in den beiden Verumgruppen ein hochsignifikanter Unterschied ($p = 0,001$), in der Placebogruppe ein signifikanter Unterschied ($p = 0,05$) zwischen den einzelnen Stichprobenzeitpunkten zum Normalwert.

3.1.2. Multiple Vergleiche nach Wilcoxon und Wilcox

Präparatemischung C

Signifikanz auf 5.-%-Niveau bei Rangdifferenz 33,7; Signifikanz auf 1.-%-Niveau bei Rangdifferenz 39,5.

Damit ergeben sich sehr signifikante Unterschiede zwischen den Tagen 1-5 (51), 1-4 (49), 2-5 (48), 2-4 (46), 5-11 (45), 4-11 (43), und signifikante Unterschiede zwischen den Tagen 1-3 (37), 5-8 (36), 4-8 (34), 2-3 (34).

Präparat D

Signifikanz auf 5.-%-Niveau bei Rangdifferenz $> 31,2$; Signifikanz auf 1.-%-Niveau bei Rangdifferenz $> 36,5$.

Damit ergeben sich sehr signifikante Unterschiede zwischen den Tagen 1-4 (55), 1-5 (51), 4-11 (48,5), 1-3 (46,5), 5-11 (44,5), 3-11 (40), 4-8 (37), und signifikante Unterschiede zwischen den Tagen 2-4 (36), 5-8 (33), 2-5 (32).

Placebo

Signifikanz auf 5.-%-Niveau bei Rangdifferenz $> 32,5$; Signifikanz auf 1.-%-Niveau bei Rangdifferenz > 38 .

Damit ergeben sich signifikante Unterschiede zwischen den Tagen 1-5 (33), 1-6 (38).

3.1.3. Wilcoxon's U-Test nach Mann-Whitney

Präparatemischung C

Signifikanz auf 0,1.-%-Niveau bei U-Wert < 23 . 2. Tag: 70; 3. Tag: 0; 4. Tag: 1,5; 5. Tag: 0; 8. Tag: 41; 11. Tag: 59.

Damit ergeben sich am 3., 4. und 5. Tag hoch signifikante Unterschiede in der Phagozytoseaktivität zwischen der Verum- und Placebogruppe.

Präparat D

Signifikanz auf 0,1.-%-Niveau bei U-Wert < 29 . 2. Tag: 19,5; 3. Tag: 0; 4. Tag: 1; 5. Tag: 0; 8. Tag: 15; 11. Tag: 54,5.

Damit ergeben sich am 2., 3., 4., 5. und 8. Tag hoch signifikante Unterschiede in der Phagozytoseaktivität zwischen der Verum- und Placebogruppe.

3.2. Gesamtergebnisse

Alle Präparate führten im In-vitro-Granulozyten-Ausstrich-Test zu einer deutlichen Steigerung der Phagozytose (Tab. 1 u. 2). Die Präparate A, B und C zeigten unverdünnt die höchste Phagozytoserate. Nach Verdünnung 1:10 bzw. 1:100 kam es dosisabhängig zu einem deutlichen Abfall der Phagozytoseindexwerte. Wenn man Präparate A und B im

Tab. 1: Phagozytosestimulierung, gemessen an Granulozyten von Probanden. 0,8 ml Versuchsansatz enthielt 5×10^6 Granulozyten und $3-5 \times 10^7$ Hefepartikel. Ausgezählt wurden 100 Granulozyten/Objektträger. Phagozytoseindex = Summe der inkorporierten Hefepartikel/Summe der ausgezählten Granulozyten. Mittelwerte von Dreifachbestimmungen \pm Standardabweichungen.

Präparat	Ampullenlösung (ml/Versuchsansatz)	Phagozytosesteigerung gegenüber Kontrolle (%)
Präparat A	0,2	30,8 \pm 1,0
	0,02	18,1 \pm 0,6
	0,002	9,2 \pm 4,2
Präparat B	0,2	33,5 \pm 2,8
	0,02	27,4 \pm 0,8
	0,002	15,5 \pm 4,1
Präparat C (1:1-Mischung der Präparate A + B)	0,2	16,5 \pm 2,1
	0,02	41,0 \pm 3,9
	0,002	28,5 \pm 3,1
Präparat D	$0,2 \times 10^{-1}$	-63,4 \pm 0,9 ^{a)}
	$0,2 \times 10^{-2}$	-28,5 \pm 0,6 ^{a)}
	$0,2 \times 10^{-3}$	-10,4 \pm 2,8 ^{a)}
	$0,2 \times 10^{-4}$	4,3 \pm 4,1
	$0,2 \times 10^{-5}$	12,1 \pm 3,2
	$0,2 \times 10^{-6}$	28,2 \pm 2,5
	$0,2 \times 10^{-7}$	10,0 \pm 1,8
	$0,2 \times 10^{-8}$	1,6 \pm 3,2

a) Hemmung der Phagozytose.

Tab. 2: Chemolumineszenzausbeuten bei der Granulozytenphagozytose nach Stimulierung durch Präparatelösung; 1 ml Versuchsansatz enthielt 15 000 Granulozyten, 40 μ l opsoniertes Zymosan und 100 μ l Lucigenin-Lösung. Die Messungen im 6-Kanal-Biolumat erfolgten über eine Zeitraum von 60 min. Mittelwerte von Dreifachbestimmungen \pm Standardabweichungen (s. Abb. 1).

Präparat	Ampullenlösung (ml/Versuchsansatz)	Chemolumineszenzausbeute (%)
Präparat A	0,2	14,5 \pm 1,5
	$0,2 \times 10^{-1}$	12,2 \pm 0,8
	$0,2 \times 10^{-2}$	10,0 \pm 0,6
	$0,2 \times 10^{-3}$	7,8 \pm 0,5
	$0,2 \times 10^{-4}$	3,8 \pm 2,3
Präparat B	0,2	18,2 \pm 1,1
	$0,2 \times 10^{-1}$	9,0 \pm 3,5
	$0,2 \times 10^{-2}$	7,7 \pm 3,4
	$0,2 \times 10^{-3}$	5,9 \pm 3,5
	$0,2 \times 10^{-4}$	3,0 \pm 1,0
Präparat C (1:1-Mischung der Präparate A + B)	0,2	27,2 \pm 2,0
	$0,2 \times 10^{-1}$	19,4 \pm 3,7
	$0,2 \times 10^{-2}$	16,0 \pm 1,9
	$0,2 \times 10^{-3}$	13,5 \pm 1,5
	$0,2 \times 10^{-4}$	7,0 \pm 1,7
Präparat D	$0,2 \times 10^{-1}$	-75 \pm 1,5 ^{a)}
	$0,2 \times 10^{-2}$	-34 \pm 0,5 ^{a)}
	$0,2 \times 10^{-3}$	-23 \pm 2,8 ^{a)}
	$0,2 \times 10^{-4}$	2 \pm 4,1
	$0,2 \times 10^{-5}$	15 \pm 3,2
	$0,2 \times 10^{-6}$	30 \pm 2,5
	$0,2 \times 10^{-7}$	11 \pm 4,8
	$0,2 \times 10^{-8}$	-7 \pm 2,1 ^{a)}

a) Hemmung der Chemolumineszenz.

Tab. 3: Phagozytosestimulierung durch Präparat A und Präparationen mit veränderter Komponentenzusammensetzung, gemessen an menschlichen Granulozyten. Meßbedingungen s. Tab. 1.

Präparat	Ampullenlösung (ml/Versuchsansatz)	Phagozytosesteigerung gegenüber Kontrolle (%)
Präparat A	0,2	30,8 \pm 1,0
Präparat A ohne Aconitum D3	0,2	26,5 \pm 2,1
Präparat A ohne Bryonia D3	0,2	23,0 \pm 2,1
Präparat A ohne Lachesis D11	0,2	20,5 \pm 3,6
Präparat A ohne Eupatorium perfol. D2	0,2	19,8 \pm 1,9

Verhältnis 1:1 mischte, war zunächst eine Erniedrigung der Phagozytoserate, verglichen mit den Werten der beiden Einzelpräparate, zu beobachten. Nach 1:10-Verdünnung dieser Mischung war wieder eine erhöhte Phagozytosestimulierung zu messen, die diesmal über die der Einzelpräparate hinausging. Dieser überadditive Effekt deckt sich mit Therapieerfahrungen der Praxis. Bei Präparat D kam es in unverdünntem Zustand zunächst zu einer Suppression der Phagozytose, die dann aber bei einer Verdünnung von 1:100 000 ebenfalls in einen stimulierenden Effekt umschlug. Bei Herausnahme einzelner Extraktkomponenten aus Präparat A war in jedem Falle ein Abfall der Phagozytosewerte zu beobachten (Tab. 3), woraus abzuleiten ist, daß die einzelnen Komponenten des Präparates additive Wirkungen entfalten. Im Chemolumineszenz-Test, der nach unseren früheren Untersuchungen mit dem Ausstrich-Test gut korreliert [13], lieferte die Präparatemischung C ebenfalls eine höhere Lumineszenzausbeute als die Einzelpräparate A/B (Tab. 2, Abb. 1). Abweichend davon war bei Präparat D unverdünnt wiederum eine Suppression zu beobachten, die analog dem Ausstrich-Test erst nach entsprechender Verdünnung in eine Stimulierung umschlug. Im carbon clearance-Test an der Maus führten die Präparate A, B und C in Dosierungen von 0,5 bis 1,0 ml/kg zu einer dosisabhängigen Erhöhung der Kohleelimination mit Regressionskoeffizienten von 1,20 bis 2,02, was einer mittleren bis guten Phagozytosesteigerung ent-

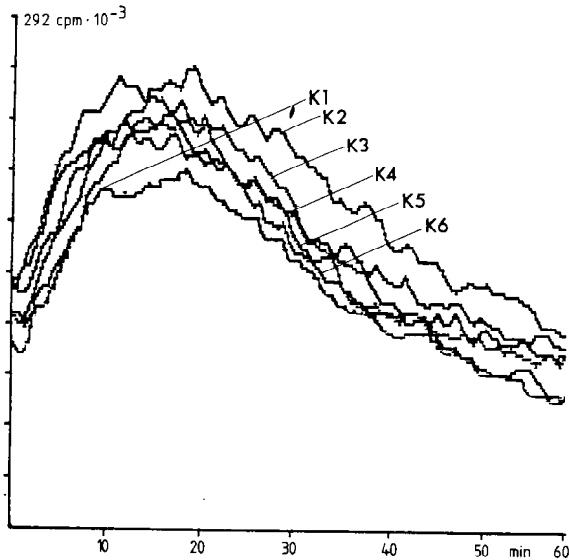


Abb. 1: Chemolumineszenzausbeute bei der Granulozyten-Phagozytose nach Stimulierung durch Präparat C. Konzentrationen und Versuchsanordnung s. Tab. 2 und Kap. Methodik. Kanal (K) 1 = Kontrolle; K 2 (0,2 ml) 29,3%; K 3 ($0,2 \times 10^{-1}$) = 25,3; K 4 ($0,2 \times 10^{-2}$) = 16,6; K 5 ($0,2 \times 10^{-3}$) = 15,1; K 6 ($0,2 \times 10^{-4}$) = 9,7.

Tab. 4: Bestimmung der carbon clearance bei Mäusen nach Präparateinjektionen. Injektionen i.p. von 0,25, 0,5, 0,7 bzw. 1,0 ml Ampullenlösung 24 h vor Testbeginn. Nach 24 h i.v. Injektion von 0,3 ml Tuschesuspension/30 g Maus. Spektrophotometrische Bestimmung der Clearance bei 650 nm nach 3, 6, 9, 12 und 15 min. Mittelwerte aus je 7 Mäusekollektiven.

Versuchsreihe	Präparat	Konzentration (ml/kg)	Regressionskoeffizient RC_{tr}	$\frac{RC_{tr}^{(a)}}{RC_c}$	Index ^{a), b)}
I	Präparat A	0,7	-0,041	1,36	1
	Präparat B	0,7	-0,046	1,53	2
	Präparat C	0,7	-0,059	1,96	2
II	Präparat A	0,5	-0,0385	1,20	1
		1,0	-0,051	1,60	2
	Präparat B	0,5	-0,0423	1,32	1
		1,0	-0,0647	2,02	2
	Präparat D	1,0	-0,028	0,875	0
		0,5	-0,0382	1,2	1
III	Präparat D	0,25	-0,087	3,22	2

a) Kontrollwerte: 0,3 ml 0,9%ige NaCl-Lösung/30 g Maus. Regressionskoeffizient für die Versuchsserie I: -0,0307; II: -0,0320; III: -0,027.

b) $\frac{RC_{tr}}{RC_c}$: < 1 (Index 0 = unwirksam); < 1,5 (Index 1 = wirksam); > 1,5 (Index 2 = gut wirksam).

spricht (Tab. 4). Bei Präparat D wurde der höchste Regressionskoeffizient (3,22) mit einem Indexwert von 2 bei der niedrigsten eingesetzten Dosierung von 0,25 ml/kg erreicht. Höhere Konzentrationen waren nahezu wirkungslos ($RC_{tr}/RC_c = 1,0$) oder immunsupprimierend. Bei einer Umrechnung der erforderlichen Dosierung auf den Menschen ist zu berücksichtigen, daß die Maus nur etwa $\frac{1}{4}$ bis $\frac{1}{5}$ so gut auf Phagozytosestimulatoren anspricht als der Mensch.

In einigen Vorversuchen, durchgeführt mit 7 Probanden, war bald erkennbar, daß sich die Chemolumineszenzmethode für eine Probandenstudie nicht eignete. Da auch der carbon clearance-Methode analoge Lipofundin-Test beim Menschen [16] wegen seines großen Aufwandes nicht in Frage kam, wählten wir den Granulozyten-Ausstrich-Test, der sich auch in zahlreichen früher durchgeführten In-vivo-Studien schon mehrfach bewährt hatte [17, 18] (Abb. 2).

Die an 25 bzw. 27 Probanden mit der Präparatemischung C und dem Präparat D (Abb. 3) durchgeführten Einfachblindstudien ergaben schon nach der ersten Injektion eine deutliche Steigerung der Phagozytoserate, die nach der 3. bzw. 4. Injektion um den 4. oder 5. Tag zu einem Maximum mit Phagozytoseraten um 20% führten (Abb. 2). Nach Absetzen

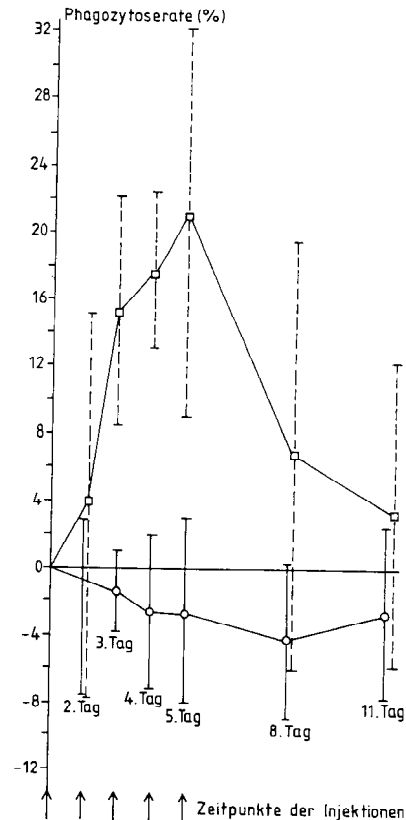


Abb. 2: 11-tägige Einfachblindstudie mit Präparat C (□—□). I.v. Injektionen von je 1,1 ml Ampullenlösung bzw. 0,9%iger NaCl-Lösung am 1., 2., 3., 4. und 5. Tag. 14 Probanden in der Verum-, 13 in der Placebogruppe (○—○). Messung des Phagozytoseindex 3 Tage vor der 1. Injektion und am 2., 3., 4., 5., 8. und 11. Tag.

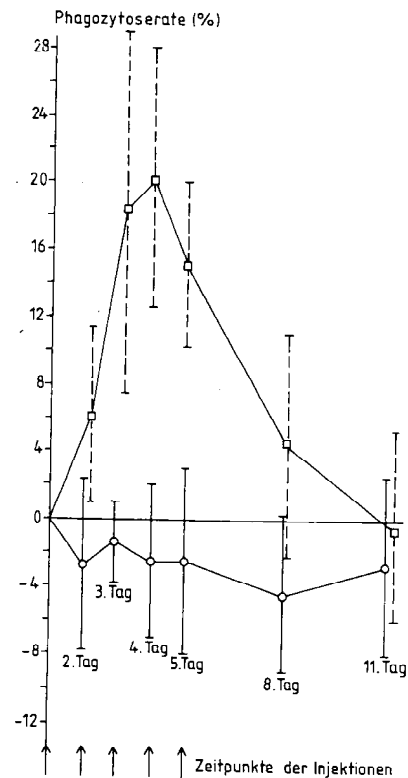


Abb. 3: 11-tägige Einfachblindstudie mit Präparat D (□—□). I.v. Injektionen von 2 ml Ampullenlösung bzw. 0,9%iger NaCl-Lösung am 1., 2., 3., 4. und 5. Tag. 12 Probanden in der Verum-, 13 in der Placebogruppe (○—○). Messung des Phagozytoseindex 3 Tage vor der 1. Injektion und am 2., 3., 4., 5., 8. und 11. Tag.

der Präparatemischung C sank die Phagozytoseaktivität innerhalb von 6 Tagen wieder auf den Normalbereich zurück. Ein fast identisches Stimulierungsprofil zeigte auch das Präparat D (Abb. 3). Hier kam es bereits vor Absetzen der Injektionen nach dem 4. Injektionstag zu einem Aktivitätsabfall der Phagozytose. Nach 2 Versuchstagen überschritt der Behandlungseffekt bei beiden Studien die 5%-Signifikanzschranke.

Die zur Verlaufskontrolle erfaßten anderen Immunparameter (IG) sowie die Leukozyten- und BKS-Werte bewegten sich in der physiologischen Schwankungsbreite.

Nebenwirkungen sind nicht aufgetreten. Die Verträglichkeit war in allen Fällen gut.

4. Diskussion

Die Tatsache, daß die mit den homöopathischen Kombinationspräparaten durchgeführten In-vitro- und In-vivo-Untersuchungen trotz völlig unterschiedlicher Extraktekombinationen nahezu identische Stimulierungsraten der Phagozytoseaktivität ergaben, zeigt, daß vermutlich die meisten in diesem Sinne bisher verwendeten Präparate in die Klasse der Paramunitätsinducer, also der unspezifisch wirkenden Immunstimulantien, einzuordnen sind [19]. In allen Fällen wurde die Phagozytosesteigerung rasch erreicht. Die Beobachtung, daß es bei der Einfachblindstudie mit einem Präparat bereits nach der verletzten Präparateinjektion zu einem unverändert starken Aktivitätsabfall kam, weist darauf hin, daß es offenbar schon nach kurzer Stimulierungszeit zu einer „Ermüdungs- oder Erschöpfungsphase“ kommt. Möglicherweise ist der rasche Aktivitätsabfall auch auf einen immunsuppressiven Effekt als Folge einer „Überstimulierung“ zurückzuführen. Die in den In-vitro-Phagozytostestmodellen erzielten Ergebnisse zeigen deutlich, daß Dosisabhängigkeiten bestehen und zu hohe Dosierungen unter Umständen zu immunsuppressiven Effekten führen können. Ob diese Erscheinung bei dem unverdünnt eingesetzten Präparat D damit zusammenhängt, daß in diesem die einzelnen Extraktkomponenten relativ hoch dosiert sind (ml) im Vergleich zu den Präparaten A, B und C (μ l), müßte genauer untersucht werden. Jedenfalls stimmt das hier erzielte Ergebnis mit früher von uns durchgeführten In-vitro-Untersuchungen an Echinacea-Preßsäften [20] und Reinsubstanzen [13] überein. Beim Einsatz hoher Konzentrationen von Echinacea-Primärextrakten (unverdünnt oder 1 : 10 verdünnt) beobachteten wir regelmäßig suppressive Effekte, die erst verschwanden und in eine Stimulierung umschlugen, wenn die Lösungen weiter verdünnt wurden. Für einige aus Pflanzen isolierte Reinsubstanzen wurden von uns die höchsten immunstimulierenden Wirkungen ebenfalls in sehr niedrigen Konzentrationsbereichen (10^{-4} bis 10^{-8} mg oder mol/ml Versuchsansatz) gemessen. Daß die In-vitro-Ergebnisse ihre Entsprechung in den In-vivo-Versuchen haben, zeigen die ebenfalls dosisabhängigen positiven Resultate der carbon clearance-Untersuchungen an der Maus. Bei der Injektion von immunstimulierend wirkenden Präparaten beim Menschen dagegen scheinen Dosierungsunterschiede innerhalb gewisser Bereiche weniger ins Gewicht zu fallen. Die Probandenstudien zeigen ferner, daß Immunstimulantien pflanzlicher Herkunft im Gegensatz z. B. zum Levamisol auch bei normaler Immunabwehrlage einen stimulierenden Effekt induzieren können [21].

Die Untersuchungen lassen keine Aussage darüber zu, ob diese Arzneipräparate direkt die phagozytierenden Leukozyten stimulieren oder indirekt über eine Stimulierung von T-Zellen-Subpopulationen oder über eine Freisetzung von bestimmten Mediatoren zustandekommen. Es ist gleichfalls nicht möglich, aus diesen Ergebnissen auf die Wirksamkeit bei bestimmten Immunsuffizienzen oder Infektionserkrankungen zu schließen.

Nach unserem Verständnis ist die gemessene Immunstimulierung eine Wirkung hoher Verdünnungen, wie sie für Lipopolysaccharide oder Phorbolster bereits bekannt sind.

5. Literatur

- [1] Wagner, H., Proksch, A., in: *Economic and Medicinal Plants Research*, Vol. 1, p. 113. Academic Press, London (1985) – [2] Beuscher, N., Beuscher, H., Otto, B., Schäfer, B., *Arzneim.-Forsch./Drug Res.* 27 (II), 1655 (1977) – [3] Beuscher, N., Beuscher, H., Schäfer, B., *Arzneim.-Forsch./Drug Res.* 32 (II), 2242 (1978) – [4] Beuscher, N., *Arzneim.-Forsch./Drug Res.* 30 (I), 821 (1980) – [5] Beuscher, N., *Arzneim.-Forsch./Drug Res.* 32 (I), 134 (1982) – [6] Kluthe, R., Vogt, A., Batsford, S., *Arzneim.-Forsch./Drug Res.* 32 (I), 443 (1982) – [7] Möse, J., *Med. Welt* 51/52, 1463 (1983) – [8] Quadripur, S. A., *Ther. Gegenwart* 115, 1072 (1976) – [9] Bockhorst, H., Gollnich, N., Guran, S., Heinrich, A. L., Mistic, B., Pott-hast, B., Vogel, H., *Z. Allg.-med.* 58, 1795 (1982) – [10] Brandt, L., *Scand. J. Haematol. Suppl.* 2 (1967) – [11] Allen, R. C., in: *Bioluminescence and Chemoluminescence*, M. A. De Luca, W. D. Mc Elroy (eds.), p. 63. Academic Press, New York-London (1981) – [12] Biozzi, G., Benacerraf, B., Halpern, B. N., *Brit. J. Exp. Pathol.* 34, 441 (1953) – [13] Wagner, J., *Planta Med.* 2, 139 (1985) – [14] Wagner, H., Proksch, A., Riess-Maurer, I., Vollmar, A., Odenthal, S., Stuppner, H., Jurcic, K., Le Turdu, M., Fang, J. N., *Arzneim.-Forsch./Drug Res.* 35 (II), 1069 (1985) – [15] Sach, L., *Angewandte Statistik*, 4. Aufl., Springer-Verlag, Berlin-New York (1984) – [16] Bruchelt, G., Schmidt, K. H., *J. Clin. Chem. Clin. Biochem.* 22, 1 (1984) – [17] Tympner, K. D., Klose, P. K., Janka, G., Liegel, D., *Münch. Med. Wschr.* 120, 251 (1978) – [18] Stübner, G., *Arzneim.-Forsch./Drug Res.* 33 (II), 1592 (1983) – [19] Mayr, A., Raettig, H., Stickl, H., Alexander, M., *Fortschr. Med.* 97, 1159 (1979) – [20] Stuppner, H., *Chemische und immunologische Untersuchungen von Polysacchariden aus der Gewebekultur von Echinacea purpurea* (L.) Moench. Dissertation, Universität München (1985) – [21] Fricke, U., nach einem Vortrag referiert in *Pharm. Ztg.* 131, 273 (1986) – [22] Rote Liste, Verzeichnis von Fertigarzneimitteln des Bundesverbandes der Pharmazeutischen Industrie (Frankfurt/Main), Editio Cantor, Aulendorf (1986)

Danksagung

Frl. Irene Kalb und Frl. Sigrid Vollmer danken wir für hervorragende technische Mitarbeit.

Für die Verff.: Prof. Dr. H. Wagner, Institut für Pharmazeutische Biologie, Universität München, Karlstr. 29, 8000 München 2

Redaktion: Prof. Dr. Hans Georg Classen, Viktor Schramm. Redaktions-Sekretariat: Waltraud Frey. Verlag: Editio Cantor Verlag für Medizin und Naturwissenschaften GmbH, Postfach 12 55, W-7960 Aulendorf, Tel.: (0 75 25) 20 60, Fax: (0 75 25) 2 06 80. Druck: Vereinigte Buchdruckereien A. Sandmaier u. Sohn, W-7952 Bad Buchau. Alle Rechte vorbehalten.

Bezugsbedingungen: Die Zeitschrift erscheint monatlich. Pro Jahr 2 Bände (I u. II). 6 Hefte ergeben einen Band (keine Berechnung zusätzlicher Sonderhefte). Die Zeitschrift kann vom Verlag oder durch eine Buchhandlung bezogen werden. Jahresabonnement (mindestens 12 Hefte): 472,- DM plus Versandkosten. Auslands-Jahresabonnement: 514,- DM plus Versandkosten. Einzelheft: 45,- DM plus Versandkosten. Mehrwertsteuer jeweils inklusive. Kostenlose Probehefte liefert der Verlag auf Anforderung.

Printed in the Federal Republic of Germany - ISSN 0004-4172