

**Aus dem Institut für Lasermedizin
der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf**

Direktor Univ. - Prof. Dr. P. Hering

**Zur Wirkung von Johanniskrautextrakt
auf die
Erythrozytenverformbarkeit**

Dissertation

zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin

Der Medizinischen Fakultät der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

vorgelegt von

Renate Wilmanowicz

1998

Inhaltsverzeichnis

1.	Einleitung	3
1.1.	Die Johanniskrautpflanze und ihre Inhaltsstoffe	3
1.2.	Johanniskrautextrakte in der traditionellen Medizin	5
1.3.	Johanniskrautextrakte und Hypericin heute	6
1.4.	Zielsetzung	8
2.	Material und Methoden	10
2.1.	Lösungen, Medikamente, Gase	10
2.2.	Herstellung der Blutproben	10
2.3.	Belichtung der Proben	11
2.4.	Messung der Erythrozytenverformbarkeit	12
2.4.1.	Das Rotationsviskosimeter	13
2.4.2.	Die Kontrolle des Antriebssystems	14
2.4.3.	Die Bestimmung des Elongationsindex	14
3.	Ergebnisse	17
3.1.	Die Wirkung der UVA-Belichtung	17
3.2.	Die Wirkung von Hypericin ohne Belichtung	17
3.3.	Die Wirkung von Hypericin unter Belichtung	20
3.4.	Die Wirkung von Hypericin in oxygeniertem und desoxygeniertem Blut	23
3.5.	Die Wirkung von GSH und Hypericin bei unbelichteten Proben	23
3.6.	Die Wirkung von GSH und Hypericin bei belichteten Proben	27
4.	Diskussion	28
5.	Literatur	32
6.	Zusammenfassung	36
7.	Lebenslauf	37

1. Einleitung

1.1. Die Johanniskrautpflanze und ihre Inhaltsstoffe

Das in Europa, aber auch Nordafrika und Asien heimische Johanniskraut ist schon seit dem Mittelalter als Heilpflanze bekannt und wurde von Paracelsus (29) ausführlich beschrieben. Das auf trockenen Böden, Wald- und Wiesenrändern wachsende, goldgelb blühende Johanniskraut zählt zu den Hartheugewächsen (Hypericaceae, Familie: Guttiferae, Art: Dilleniidae). Es blüht von Ende Juni (Johannistag: 24. Juni) bis September.

Die Synonyma: *Hypericum perforatum* (lat.), Johanniskraut, Hartheu, Tüpfel-Hartheu, Christiwundkraut, Johanniswurz, St. John`s wort (engl.) verraten einiges über Familie, Anwendung und Eigenschaften der Pflanze. Die Bezeichnung „Tüpfel-Hartheu“ beschreibt eine mit bloßem Auge erkennbare feine Punktierung der faltigen, etwa 3.5 cm langen Blätter und der circa 1 bis 1.5 cm großen Blütenblätter. Sie entsteht durch punktförmige Drüsen, die eine Vielzahl an Sekreten enthalten. Die hellen Blattdrüsen (im Mesophyll) enthalten hauptsächlich ätherische Öle. Durch die starke Lichtbrechung dieser Öldrüsen erscheinen die Blätter im Gegenlicht durchlöchert (*Hypericum perforatum*: durchbohrtes Kraut). Die dunklen punkt- oder strichförmigen Drüsen der Blätter und vor allem die der Blüten und Knospen, enthalten Hypericin. Durch Zerreiben zerstört man diese Behälter (lysigene Sekreträume). Der darin enthaltene rote Saft gab der Pflanze auch Namen wie St. Johannisblut, Christi Kreuzblut, Herrgottsblut und Alfblut. Da es viele Johanniskrautarten mit recht unterschiedlichen Wirkstoffzusammensetzungen gibt, ist die Tüpfelung der Blüten und „Perforierung“ der Blätter als Erkennungsmerkmal wichtig.

*Hypericum*extrakte enthalten eine Vielzahl von Stoffen, von denen einige erforscht und charakterisiert worden sind. Aus den ätherischen Ölen des Blattmesophylls wurden Terpene (Pinen, Cineol, Phytosterine) und adstringierende Bitter- und Gerbstoffe (z.B. Phlobaphene) isoliert. Die dunklen Drüsen enthalten in ihrem roten Saft neben Harzen vor allem die pharmakologisch interessanten Substanzen Hyperforin, 3,8'-Biapigenin, Hypericin und Pseudohypericin. Daneben sind Kohlenhydrate (Pectine), Fette (Stearin, Cholin), freie Säuren (z.B. Myristinsäure) und Flavonoide (Rutin, Quercitrin, Quercetin) nachweisbar.

Hypericin (Formel siehe Abbildung 2) und Pseudohypericin werden beide den photodynamischen Pflanzenquinonen bzw. aromatischen polyzyklischen Dionen (Naphthodianthronen, Anthraquinone) zugerechnet. Als Photorezeptorchromophore haben diese Pflanzenpigmente photosensibilisierende Eigenschaften.



Abbildung 1: Johanniskraut (*hypericum perforatum* L.). Blattzeichnung mit Ölzellen und Hypericin-Speicherzellen (links unten). Mikroskopische Aufnahme eines Blütenblattes (unten rechts).

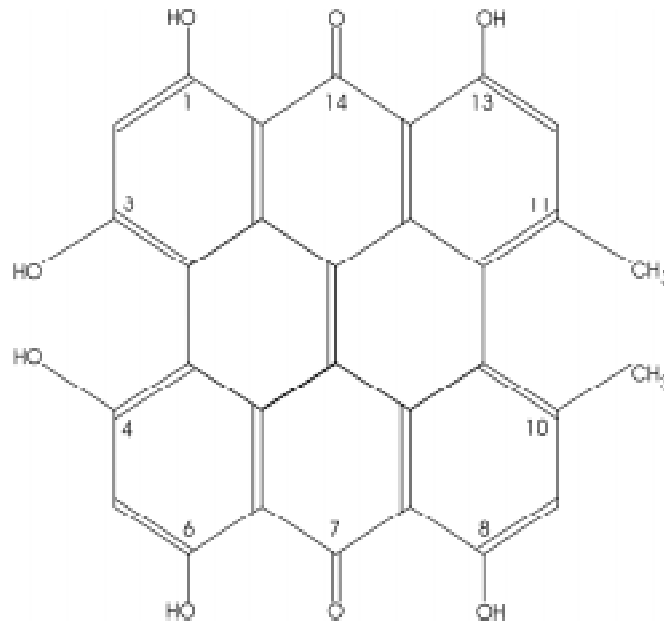


Abbildung 2: Hypericin (7, 14 – dion) – 1, 3, 4, 6, 8 ,13'- hexahydroxy - 10, 11'- dimethyl – phenanthrol [1, 10, 9, 8 – opgra] perylen

1. 2. Johanniskrautextrakte in der traditionellen Medizin

In der Volksmedizin Europas ist Johanniskraut seit dem Mittelalter als Heilpflanze bekannt. In der vorwissenschaftlichen Medizin galt noch das abergläubische Prinzip der Ähnlichkeit. Durch Assoziation des Heilmittels mit dem „zu Heilenden“, aber auch durch Erfahrung entstanden viele mystische Namen wie z.B. „Herrgottsblut“ und „St. Johannisblut“. Der Vergleich des roten Saftes mit Blut liegt möglicherweise der Wundbehandlung mit Johanniskrautöl zugrunde. Er brachte der Heilpflanze weitere Namen wie „Unseres Herrgotts Wundenkraut“ und „Wilde Gartheil“ ein.

Durch entsprechende Erfahrungen erweiterte sich das Anwendungsspektrum auch auf Gebiete, die nicht diesem Ähnlichkeitsprinzip unterliegen. Aufgrund der spasmolytischen Eigenschaften von Johanniskraut war es auch bei „Frauenleiden“ als „Unserer Frauen Bettstroh“ oder „Frauenkraut“ beliebt.

Johanniskraut ist ein typisches Beispiel für die breite Indikationsstellung von Heilpflanzen im Mittelalter. Seine Anwendung und Einbindung in die Signaturenlehre wurde ausführlich von Theophrastus von Hohenheim (Paracelsus) beschrieben (29).

Als Ölauszug diente es neben der Pflege bei trockener, schrundiger Haut auch der Behandlung frischer, blutender, entzündeter Wunden und Brandwunden. Die Einnahme des roten Öls soll wurmtreibend und leicht obstipierend wirken, aber auch Krämpfe im Bauchraum lösen. Bei Blutergüssen und Quetschungen, Muskelverletzungen, Geschwüren und Geschwülsten, aber auch bei Trigeminusneu-

ralgie wurden die entsprechenden Stellen eingerieben und gleichzeitig eine Tee-
kur durchgeführt (60).

Als Teeaufguß wurde die ganze oberirdische Pflanze (meist jedoch nur die Blüten)
verwendet. Tee wurde als Getränk bei Lungenverschleimung, Magenschleimhaut-
katarrhen, Bettnässen, Kopfschmerzen, Gelbsucht, Krämpfen im Bauchbereich,
Nervenproblemen, Schlafstörungen und Blutarmut empfohlen. Auch zur Milderung
eines „übersteigerten Sexualempfindens“ in der Pubertät und der mit ihm verbun-
denen sexuellen Affekthandlungen (z.B. Onanie) wurde Tee verabreicht (9).

In Kräutersammlungen des mediterranen Raumes wird Johanniskraut den etwa
hundert Kräutern zugerechnet, die die Haut bräunen. In dieser Hinsicht erwies es
sich als die wahrscheinlich wirksamste Pflanze. Im Gegensatz zu β -Carotin, das
sich eher in die Subcutis einlagert und diese einfärbt, bräunt (rötet) Hypericum die
Haut vermutlich infolge seiner photodynamischen (erythemogenen) Wirkung.

In der im 19. Jahrhundert durch Samuel Hahnemann gegründeten Homöopathie
wird Johanniskraut auch als „Arnica der Nerven“ bezeichnet und demgemäß als
Therapeutikum bei Nervenverletzungen, Hirn- und Rückenmarkerschütterungen,
Nervenschwäche, Schwindel und Schlafstörungen eingesetzt und sogar zur The-
rapie des Tetanus empfohlen (60).

1. 3. Johanniskrautextrakte und Hypericin heute

Viele Behandlungsansätze aus der traditionellen Medizin haben auch heute noch
Bestand. Insbesondere Ärzte, die der Homöopathie, der Naturheilkunde oder Phy-
totherapie verbunden sind, setzen Johanniskraut in den verschiedensten Zuberei-
tungen als Therapeuticum ein.

Mit dem zunehmenden Interesse der Wissenschaft an den Inhaltsstoffen von Jo-
hanniskraut und deren pharmakologischen Effekten, verschließt sich heute auch
die „Schulmedizin“ nicht mehr der Medikation von Johanniskrautpräparaten. Wäh-
rend die Naturheilkunde häufig Johanniskraut mit anderen Drogen kombiniert
(meist Externa wie Öle oder Salben) oder die Nutzung eines Gesamtextraktes (als
Tee oder Tropfen) befürwortet, besteht die „Schulmedizin“ auf qualitativ und quan-
titativ definierten Zubereitungen für die enterale und parenterale Applikation.

Für die heute in Deutschland zugelassenen Zubereitungen (Kapseln, Tabletten,
Tinkturen, Tropfen für die enterale Medikation, Injektionslösungen) muß der Ge-
samthypericingehalt angegeben und durch Kontrolluntersuchungen (meist HPLC)
belegt sein.

Als Hauptindikationen gelten heute: Depressive Verstimmung, psychovegetative
Störungen, Angst und/oder nervöse Unruhe, Antriebsmangel. Weitere Indikatio-

nen sind: Enuresis, Stottern, Migräne. Die empfohlene tägliche Dosis beträgt etwa 1 mg Gesamthypericin (orale Applikation), verteilt auf 2 - 3 Dosen, bzw. 0.1 mg parenteral (tief intraglutäal oder langsam i.v.).

Die Wirksamkeit von Johanniskrautextrakten bei leichter bis mittelschwerer Depression ist durch Tierversuche (43) und kontrollierte klinische Studien, darunter randomisierte Doppelblindstudien, gut belegt (28, 58). Dabei konnte gezeigt werden, daß bei dieser Indikationsstellung die Wirksamkeit der Johanniskrautextrakte der von Imipramin (58) bzw. Maprotilin (27) entspricht. Die Wirksamkeit ergibt sich aus psychotropen Wirkungen wie psychischer Spannungsabbau bei gleichzeitiger Stimmungsaufhellung, Anxiolyse und Aktivitätssteigerung. Im Vergleich zu den tri- und tetrazyklischen Antidepressiva hat Johanniskraut nur eine geringe Nebenwirkungsrate und ist daher besonders als Langzeittherapeutikum geeignet. Als gravierende Nebenwirkung ist nur die Photosensibilisierung mit sonnenbrandähnlicher Lichtdermatose (bei Tieren: Lichtkrankheit (2)) - vor allem bei hoher Dosierung und lichtempfindlichem Hauttyp - zu nennen, die zum Therapieabbruch führen kann. Bei Langzeittherapien werden im Falle stärkerer, unvermeidbarer Sonnenlichtexposition Schutzmittel (Kleidung, Sonnenschutzmittel) empfohlen.

Als Grundlage der antidepressiven Wirkung von Johanniskraut wird eine Hemmung der Monoaminoxidase (MAO) durch Hypericin diskutiert. Diese Hemmwirkung ist allerdings so schwach, daß der antidepressive Effekt auf dieser Basis alleine nicht erklärt werden kann. Das Eintreten der antidepressiven Wirkung fällt aber immerhin mit einer signifikant vermehrten Ausscheidung der Metabolite von Noradrenalin und Dopamin zusammen (41). In vitro Versuche zeigten, daß Hypericin die mitochondriale MAO (aus Rattenhirn) irreversibel hemmt (50). Die Konzentrationen, die zu einer halbmaximalen Hemmung des Enzyms nötig waren, lagen allerdings sehr hoch (MAO Typ A: $6.8 \cdot 10^{-5}$ M, Typ B: $4.2 \cdot 10^{-4}$ M), so daß auch von diesen Experimenten nicht zwingend auf einen entsprechenden Wirkmechanismus in vivo geschlossen werden kann.

Im Mittelpunkt der wissenschaftlichen Forschung stehen heute die viruciden (13, 17, 18, 23, 30, 32, 34, 35, 36, 37, 38, 42, 51, 54, 55, 59) und antineoplastischen (14, 15, 20, 21, 39, 53, 56, 57) Eigenschaften von Hypericin und Pseudohypericin. In vitro- und in vivo Versuche haben belegt, daß die Infektiosität von Retroviren (einschließlich des humanen HIV-Virus) durch Hypericin und - in etwas geringem Ausmaß auch durch Pseudohypericin - gehemmt wird. Da Versuche mit Zellkulturen nachwiesen, daß mit Hilfe von Hypericin nicht infizierte T-Zellen vor der Infektion mit HIV-Viren geschützt werden, wird derzeit klinisch getestet, ob auch in vivo die Ausbreitung der Infektion gestoppt werden kann. Die Mechanismen, die der viruciden Wirkung zu Grunde liegen sind bis heute nicht eindeutig geklärt. Ei-

ne Hemmung der reversen Transscriptase (vermutlich durch Photoaktivierung des Capsids P24 und der Protein C Kinase) werden derzeit diskutiert.

Die durch die traditionelle Medizin überlieferte antineoplastische Eigenschaft des Johanniskrautextraktes wurde durch einige in vitro- und in vivo Studien mit Hypericin wissenschaftlich überprüft. Günstig (neben der geringen Nebenwirkungsrate) für die photodynamische Therapie sind Befunde, die zeigen, daß sich das lipophile Hypericin in Zellmembranen (wie auch im Viruscapsid) und Zellkernen anreichert. Zudem kann durch Bestrahlung mit Weißlicht die Hypericinkonzentration in Tumorgewebe erhöht werden. Pharmakokinetische Studien zur Elimination von Hypericin zeigten, daß 7 Tage nach Hypericingabe die Hypericinkonzentration in Tumorgeweben noch sehr hoch ist, während die anderer Gewebe deutlich abgefallen war.

Als antineoplastischer Wirkmechanismus wird, neben der unmittelbar phototoxischen Wirkung, eine Hemmung der mitochondrialen Succinoxidase - ein Enzym, das vielfach als Vorhersagemodell für Chemotherapeutika und Photochemotherapeutika genutzt wird - diskutiert (52, 54, 56). Im Falle des malignen Glioms, das durch hohe Protein C Kinase-Aktivität charakterisiert ist, könnte deren Hemmung durch Hypericin therapeutisch relevant sein (51, 55). Kürzlich zeigten Couldwell und Mitarbeiter (15), daß das in vitro-Wachstum von malignen Gliomzellen (Zelllinien A172 und U87MG) durch Hypericin dosisabhängig gehemmt wird, wobei eine Exposition mit sichtbarem Licht die Hemmwirkung geringfügig (13%) verstärkte. Die Tatsache, daß im selben Versuchsmodell das Standardtherapeutikum Tamoxifen gleich oder gar geringfügig schwächer wirkte, bewog die Verfasser zur Forderung, die Wirksamkeit von Hypericin bei malignen Gliomen durch klinische Studien zu überprüfen.

1.4 Zielsetzung

Die Photohämolysen roter Blutzellen im Zuge der photodynamischen Therapie ist als unerwünschte Nebenwirkung bestens bekannt. Hypericin in einer Konzentration von 10 µM/l und Belichtung im sichtbaren Wellenlängenbereich ist in dieser Hinsicht genauso wirksam wie andere Photosensitizer (Hämatoporphyrin, Chlorophyll, Bengalrot). Bei Bestrahlung im UV-nahen Bereich (366 nm) entspricht die photohämolytische Potenz des Hypericins der von Bengalrot. Im Vergleich zu Methylenblau oder Erythrosin B ist sie sogar stärker (22). Die Auslösung einer Photohämolysen setzt allerdings voraus, daß die Blutproben mit einer recht großen Bestrahlungsleistung ($\geq 14 \text{ W/cm}^2$, Bestrahlungsdauer 10-45 Minuten) bestrahlt werden, wobei die Temperatur nach Belichtung der Proben von 24°C auf 37°C er-

hört werden muß (1). Als unmittelbarer Auslöser der Photohämolysen wird vor allem ein Kationenverlust mit nachfolgender kolloid-osmotischer Hämolysen postuliert. Als Ursache für den Kationenverlust werden Lipidoxydation und/oder Crosslinking von Membranproteinen diskutiert (16, 19, 24, 44, 45).

Mechanische Belastungen, die vermutlich Kationenverschiebungen und/oder Crosslinking bewirken, schlagen sich auch in Veränderungen der elastischen Eigenschaften von Erythrozyten nieder, und zwar auch dann, wenn die Hämolysen der Zellen nicht oder noch nicht meßbar ist (8, 62). Es ist daher nicht verwunderlich, daß Lipidoxydation infolge von oxydativem Streß durch Peroxyde (7, 33) oder Ozonisierung (7) die Flexibilität humaner Erythrozyten reduziert.

Ben-Hur und Mitarbeiter (9) beschrieben, daß unter der PDT die Mikroperfusion gestört ist. Sie vermuteten, daß dafür - neben einer Kapillarschädigung - die Rigidifizierung von Erythrozyten verantwortlich sei. Kürzlich konnte gezeigt werden (40, 63), daß Erythrozyten rigidifiziert werden, obwohl sie im Vergleich zu Tumorzellen photosensibilisierende Substanzen nur in sehr geringen Mengen aufnehmen. Diese Effekte traten bereits unter Bedingungen (Belichtungsintensität, Sensibilisiererkonzentrationen, Temperatur 21°C) auf, die keine Hämolysen auslösten. Rote Blutkörperchen sind damit ein hochsensitives Versuchsmodell zur Quantifizierung photodynamischer Effekte.

Teile dieser Arbeit wurden beim internationalen Symposium „Biomedical Optics“, San Jose, Kalifornien, USA vorgetragen (61) .

2. Material und Methoden

2.1. Lösungen, Medikamente, Gase

Die isotone Saline hatte folgende Zusammensetzung (mM/l): NaCl: 145; KCl: 5.0; Glucose: 5.0; MOPS (Morpholinopropan-Sulfonsäure): 3.0. Durch Hinzufügen von 210 g Dextran (Dextran 60.000, Firma Schiwa) auf 1000 ml Saline wurde eine Lösung mit einer Viskosität von 24 cpoise (im folgenden Dextran-saline genannt) hergestellt. Die Saline und Dextran-saline wurden auf einen pH von 7.4 eingestellt und steril filtriert. Die Lösungen wurden in sterilen Flaschen im Kühlschrank aufbewahrt und wöchentlich neu angesetzt. Vor den Versuchen wurden die Lösungen auf Raumtemperatur erwärmt. Die Viskosität jeder neu angesetzten Saline wurde mit einem Mikro-Kugelfallviskosimeter (Firma Haake), die Osmolarität (295 mOsm) durch ein Halbmikro-Osmometer (Firma Knauer) kontrolliert.

Als Hypericin wurde Hyperforat[®] pro injectione (Firma Dr. Gustav Klein, Zell-Harmersbach) verwendet. Laut Angaben des Herstellers enthält eine Ampulle 1 ml Extr. fl. aquos. Herb. Hyperici perforatum, standardisiert auf ca. 0.05 mg Hypericin und verwandte Verbindungen, berechnet auf Hypericin.

Von reduziertem kristallisiertem Glutathion (GSH, Firma Sigma), Humanalbumin reinst (Firma Behring) und Glukoseoxydase (Lyophilisat vom *Aspergillus niger* 250 U/mg, Firma Serva) wurden durch Lösung in Saline täglich frische Stammlösungen hergestellt und bis zur Verwendung in Eis gelagert. Als Katalase wurde eine Suspension, gewonnen aus Rinderlebern, mit ca. 6000 U/mg (Firma Serva) verwendet.

Zur Oxygenierung wurden die Blutsuspensionen mit reinem medizinischen Sauerstoff (Firma Linde) durchperlt, zur Verhinderung der Oxygenierung desoxygenierter Proben wurden diese sowohl während der Inkubation/Belichtung als auch während der Messung im Laserdiffraktoskop mit Argon (Firma Linde) überschichtet.

2.2 Herstellung der Blutproben

Blutproben von gesunden, freiwilligen Probanden wurden mit Hilfe heparinierter Vakuümröhrchen (Vacutainer, Firma Becton & Dickinson) aus der vena cubitalis entnommen und sofort nach Entnahme auf einem Rollenmischer durchmischt. Durch Zugabe von 0.2 ml Blut + Testsubstanz + Saline (ad 1 ml) zu 4 ml Dextran-saline (24 cpoise) wurden Suspensionen mit einem Hämatokrit (HKT) von ca. 2 % und einer Viskosität von 16.6 cpoise hergestellt, gegebenenfalls oxygeniert und in

Quarzröhrchen gefüllt. Proben, die durch Zufuhr von Glukoseoxydase und Katalase desoxygeniert werden sollten, wurden mit Argon überschichtet.

2.3. Belichtung der Proben

Für die Belichtung wurde ein UVA-Strahler (Firma Philips, Typ HB 170/A) verwendet, der üblicherweise zur Bräunung der Haut, aber auch zur Auslösung photobiologischer Wirkungen (Vitamin D₃-Photosynthese) und zur Therapie der Psoriasis (PUVA) eingesetzt wird.

Der Strahler ist mit vier Röhren (TL 29 D 16/09) bestückt. Die spektrale Strahlungsflußverteilung der verwendeten Röhren ist in der Abbildung 3 wiedergegeben. Die Hauptemission liegt laut Hersteller bei 65 Watt/m² (gemessen in einem Abstand von 10 cm) im UVA- (315 - 380 nm) und im blauen sichtbaren Bereich (380 - 440 nm). Quecksilberlinien sind im blauen (403 und 435 nm), im gelben (576 nm) und gelb-roten (576 nm) Wellenlängenbereich zu erkennen. Die Hauptemissionswellenlänge λ_{\max} beträgt 355 nm. Die UVB-Strahlung (0.012 W/m²) ist so gering, daß sie bei der linearen Darstellung der Bestrahlungsstärke nicht sichtbar wird. Eine UVC-Strahlung (≤ 280 nm) ist nicht meßbar.

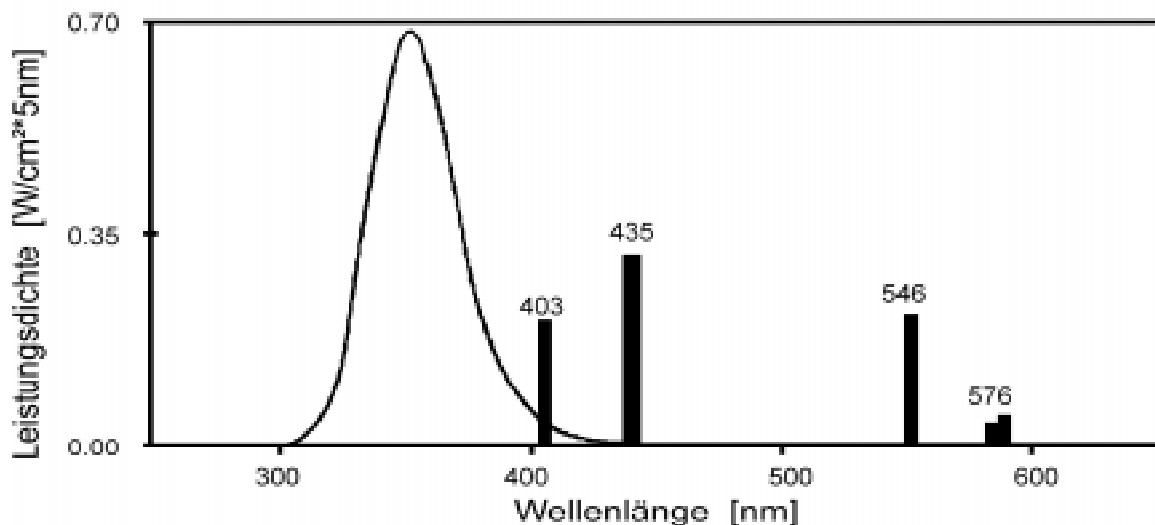


Abbildung 3: Spektrale Strahlungsflußverteilung der UVA-Leuchtstofflampe Philips TL29D16/09.

Zur gleichmäßigen Ausleuchtung wurde der Strahler in einem Abstand von 40 cm über den Proben installiert. Die gemessene Leistungsdichte auf Probenhöhe betrug 3 mWatt /cm².

Während der Belichtung wurden die Proben auf einem Rollenmischer kontinuierlich gerollt (70/min) und durch Kippen (40/min, Hub 1.5 cm) zusätzlich durchmischelt. Das Leervolumen der Röhrchen betrug jeweils ca. 36 ml (Oberfläche ca.

90 cm²). Das belichtete Probenvolumen betrug mit 6 ml nur 1/6 des Reagenzglasvolumens. Das hohe Leervolumen/Probenvolumen Verhältnis, die große Reagenzglasoberfläche und die hohe Viskosität der Probe gewährleisteten, daß sich die Dextran saline-Blutsuspension während des Rollens über die ganze innere Oberfläche des Quarzreagenzglases verteilte und einen ca. 1 - 2 mm dicken Film bildete (Abbildung 4).

Unbelichtete Vergleichsproben wurden durch Aluminiumhüllen abgedunkelt. Ventilatoren stellten sicher, daß die Temperatur der Proben während der Belichtung die Raumtemperatur nicht überstieg (Raumtemperatur 21° C, kontrolliert durch die Raumklimaanlage).

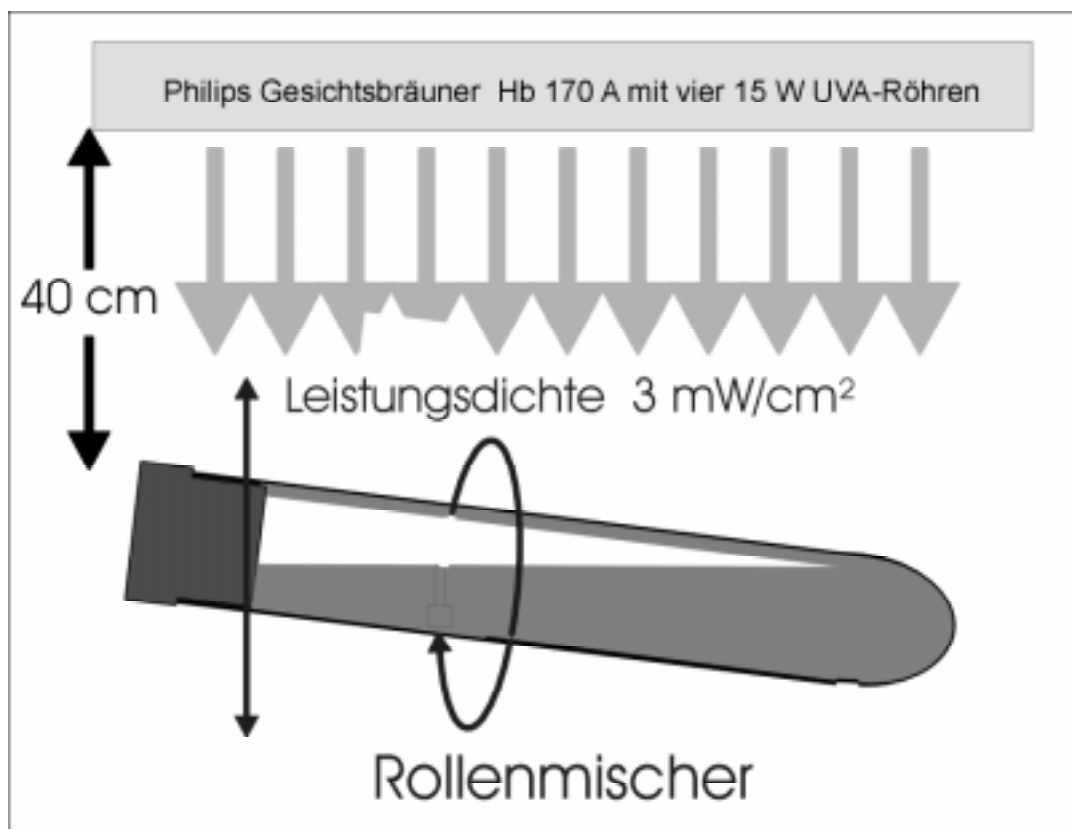


Abbildung 4: Schematische Darstellung des Versuchsaufbaus zur Belichtung der Proben.

2.4. Messung der Erythrozytenverformbarkeit

Die hier genutzte Methode zur Bestimmung der Erythrozytenverformbarkeit mit Hilfe des Laserlichts beruht auf dem von Bessis und Mohandas (10, 11, 25) entwickelten Verfahren der Ektazytometrie. Diese Methode wurde von Bayer (5, 8, 63) und Hardemann (26) durch Einführung der digitalen Bildanalyse weiterentwickelt. Durch die Nutzung des gesamten Informationsgehaltes der Laserbeugungsbilder ist heute - bei einem Fehler < 1% - die Präzision dieses Meßverfahrens außerordentlich hoch (5).

2.4.1. Das Rotationsviskosimeter

Der schematische Aufbau des Laserdiffraktoskops ist in der Abbildung 5 dargestellt. Der Strahl eines Helium-Neon Lasers wird über ein Doppelprisma um 180° umgelenkt und somit in die Rotationsachse der Meßkammer eingespiegelt. Die Meßkammer besteht aus einem inneren, rotierenden und einem äußeren, feststehenden Zylinder. Beide Zylinder sind aus optisch reinem Plexiglas gefertigt. Zwischen den beiden Zylindern befindet sich ein schmaler Meßspalt (0.5 mm). Zum Ausgleich der unterschiedlichen Brechungsindizes von Plexiglas und Luft wird der innere Zylinder mit Triton X-100 gefüllt, dessen Brechungsindex dem des Plexiglasses ungefähr entspricht. Das Prisma taucht dabei in das Triton X-100 ein. Zur Vermeidung von Linseneffekten ist die Frontfläche des äußeren Zylinders im Bereich des Lichtaustrittes plan geschliffen.

Der innere Zylinder wird durch einen Motor mit definierten Geschwindigkeiten angetrieben, so daß Erythrozyten innerhalb des Spaltes Schubspannungen ausgesetzt werden. Das soweit beschriebene System stellt ein Rotationsviskosimeter vom Typ „Searle“ dar.

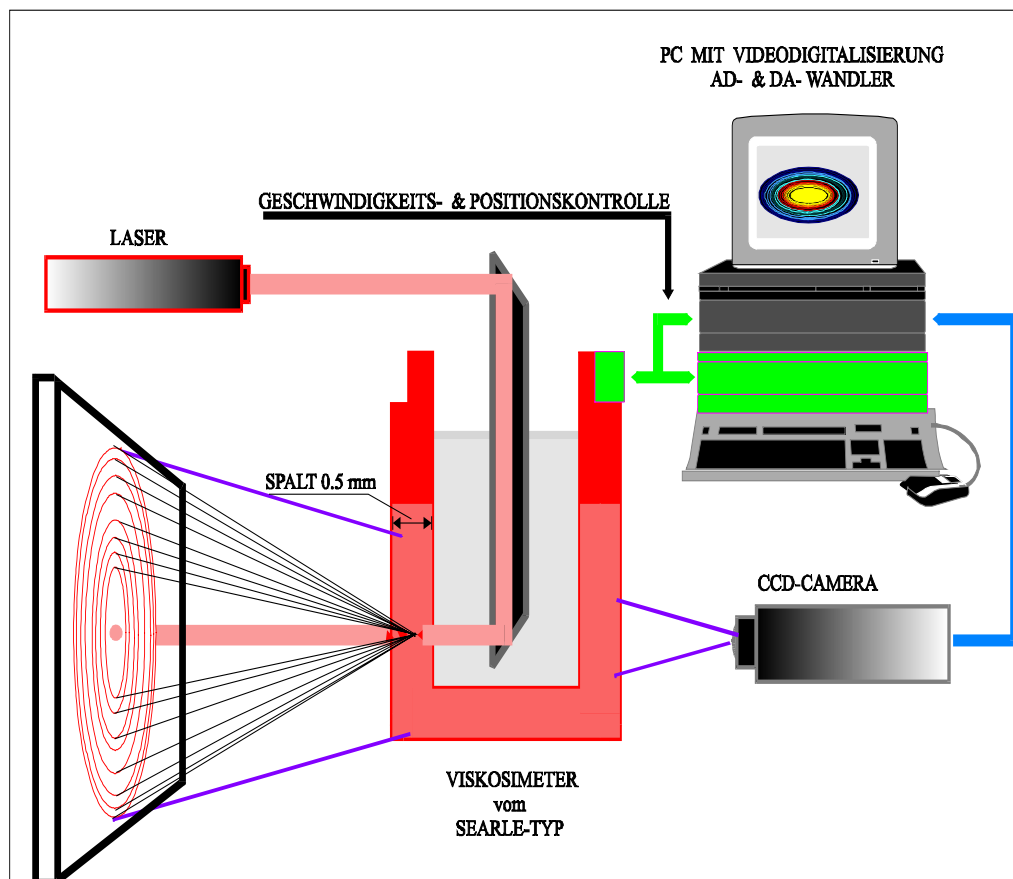


Abbildung 5: Aufbau der Apparatur zur Messung der Erythrozytenverformbarkeit (Laserdiffraktoskop).

Die Scherrate in Searle Viskosimetern errechnet sich nach der Formel:

$$\text{Scherrate [1/s]} = 2 \cdot \pi \cdot r \cdot U / 60 \cdot b$$

Bei den gegebenen geometrischen Daten (Radius des inneren Zylinders $r = 2.5$ cm, Breite des Meßspaltes $b = 0.05$ cm, $U =$ Umdrehungen/Minute) beträgt bei 500 U/min die Scherrate 2617/s. Da die Schubspannung gleich dem Produkt von Scherrate und Viskosität ist, errechnet sich bei einer Scherrate von 2617/s und einer Viskosität von 16.6 cpoise ein Wert von 435 dyn/cm². Vereinfacht lassen sich aus den angegebenen Umdrehungsgeschwindigkeiten die

$$\text{Scherrate [1/s]} = U \cdot 5.234$$

und die

$$\text{Schubspannung [dyn/cm}^2\text{]} = U \cdot 0.87$$

abschätzen.

2.4.2. Die Kontrolle des Antriebssystems

Der Motor treibt über einen Keilriemen den inneren Zylinder des Viskosimeters und einen Tachostromgenerator an. Bei der hier verwendeten Untersetzung von 1:6 beträgt die maximale Umdrehungszahl des Zylinders 510 U/min. Die Motorsteuerung erfolgt mit Hilfe eines separaten Verstärkers. Durch Anlegen einer Gleichspannung (0 - 8 Volt) kann die Umdrehungsgeschwindigkeit linear proportional zur Steuerspannung variiert werden. Die Steuerspannung wird mit Hilfe einer in den Computer integrierten AD/DA - Wandlerkarte (MC-PC20, BMC, München) durch DA-Wandlung erzeugt.

Die Umdrehungsgeschwindigkeit wird vom Computer zweifach, anhand der AD-gewandelten Tachospannung und des AD-gewandelten Signals einer Reflexlichtschranke - positioniert auf dem inneren Zylinder des Viskosimeters - kontrolliert. Darüber hinaus wird das Signal der Reflexlichtschranke als Triggersignal zur Digitalisierung der Diffraktionsbilder genutzt. Damit ist sichergestellt, daß die gewünschte Umdrehungsgeschwindigkeit sehr exakt eingehalten wird und - innerhalb einer Meßreihe - die Beugungsbilder immer an der gleichen Position der Meßzylinder aufgenommen werden können. Meßfehler, die auf geringen Unwuchten im Viskosimetersystem beruhen, lassen sich so weitgehend vermeiden (5).

2.4.3. Die Bestimmung des Elongationsindex

Nach Füllen des Viskosimeterspaltes mit der Suspension aus Blut und Dextran saline entsteht durch Beugung des Laserstrahls an den Erythrozyten ein Diffraktionsbild, das auf einem mit Bariumsulfat beschichteten Schirm (Firma Kodak) aufgefangen wird. Das Beugungsbild wird von einer hochauflösenden CCD-

Kamera (Firma JVC, Modell TKS 310, 767*581 Pixel) aufgezeichnet. Das analoge Bildsignal (BAS) wird nach AD-Wandlung (Firma Fast, 8 Bit Frame Grabber: Screen Machine II) in 256 Graustufen an einen Computer (IBM-kompatibler PC, Prozessor 486, 33 MHz) übermittelt, auf dem Monitor in Falschfarben dargestellt und weiter ausgewertet.

Laserbeugung an Erythrozyten, die keiner Schubspannung ausgesetzt sind, erzeugt ein kreisrundes Beugungsbild, wobei die Intensität vom Rand des Beugungsbildes zur Mitte hin zunimmt (Bessel-Funktion). Verbindet man Punkte gleicher Intensität (Isointensitätslinien), so ergeben sich konzentrisch angeordnete Kreise.

Tangential angreifende Schubspannungen, die die Erythrozyten elongieren, verformen das kreisrunde Diffractionbild zu einer Ellipse. In diesem Fall bilden die Isointensitätslinien konzentrisch angeordnete Ellipsen, bei denen das Verhältnis der beiden Halbachsen konstant ist (siehe Abbildung 6).

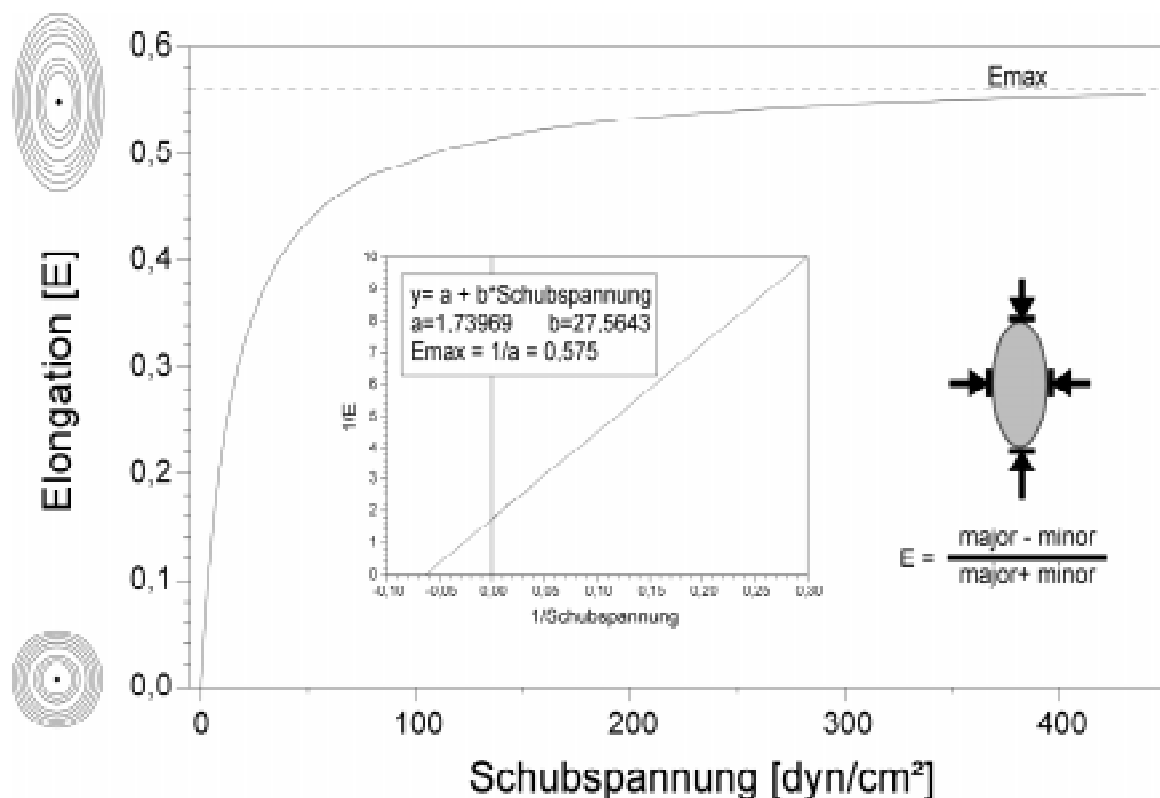


Abbildung 6: Beispiel zur Auswertung der Beugungsbilder. Isointensitätslinien einer ruhenden Erythrozytensuspension (unten: $E = 0.00$) und einer Probe, die einer Schubspannung von 440 dyn/cm^2 ausgesetzt wurde (oben: $E = 0.575$). Unter der Annahme, daß die Elongationskurve eine rechtwinklige Hyperbel ist, läßt sich die maximale Verformbarkeit (E_{max}) mit Hilfe der doppeltreziproken Darstellung ermitteln (nach 4).

Im Hinblick auf die Bestimmung des Ausmaßes der Elongation wurden, entsprechend den in der Abbildung 6 gezeigten Beispielen, Serien von Isointensitätslinien berechnet. Dabei wurden niedrige Intensitäten am äußeren Rand des Beugungsbildes nicht berücksichtigt, da sie auf Grund des Rauschens des CCD-Chips fehlerbehaftet sein können. Auch das Zentrum des Beugungsbildes wurde von der Berechnung ausgeschlossen, da hier der ungebeugte, vorwärtsgestreute Laserstrahl immer eine mehr oder weniger kreisrunde Form hat (5). Aus den so selektierten Isointensitätslinien (in der Regel 25 - 35) wurden anhand der jeweiligen Ellipsenhalbachsen (major und minor) eine Serie von Elongationsindizes "E" nach der Formel:

$$\text{Elongation "E"} = (\text{major} - \text{minor}) / (\text{major} + \text{minor})$$

berechnet (6) und - durch arithmetische Mittelung - ein für das gesamte Diffraktionsbild repräsentativer Elongationsindex ermittelt.

Da bei Kreisen die Halbachsen gleich sind, ist der Elongationsindex bei nicht gescherten Erythrozyten = 0, bei elliptischer Verformung erreicht er ein theoretisches Maximum von 1.

3. Ergebnisse

3.1. Die Wirkung der UVA-Belichtung

Es war nicht auszuschließen, daß ultraviolettes Licht, insbesondere im Bereich des UVC und UVB, die viskoelastischen Eigenschaften von Erythrozyten verändert. Daher überprüften wir zunächst, ob die Belichtung von Erythrozytensuspensionen mit dem verwendeten UV-Strahler (siehe Kapitel 2.3) zu einer Änderung der Flexibilität der Erythrozyten führt.

Zur Überprüfung dieser Frage wurden die Blutproben unter den gleichen Bedingungen vorbereitet, aber nur zur Hälfte belichtet, während die anderen, ansonsten gleichbehandelt, lichtgeschützt als Kontrollen mitgerollt wurden. Bei einer Leistungsdichte von 3 mWatt/cm^2 wurde die Energiedichte durch unterschiedliche Beleuchtungszeiten variiert.

Im Vergleich zu den unbelichteten Kontrollen (Abbildung 7) zeigten die Experimente, daß eine Belichtung von 30 Minuten die Flexibilität der Erythrozyten nicht veränderte, während 60 Minuten (10.8 Joule/cm^2) zu einer geringen, nicht signifikanten Reduktion der Elongationswerte führte. Um auszuschließen, daß schon durch die Belichtung Veränderungen verursacht werden, wurden in allen weiteren Versuchen die Röhrchen einer UVA-Bestrahlung von genau 30 Minuten ausgesetzt, was einer Energiedichte von 5.4 Joule/m^2 entspricht.

3.2. Die Wirkung von Hypericin ohne Belichtung

Um festzustellen, ob Hypericin ohne Belichtung der Erythrozyten eine Elongationsveränderung bewirkt, wurde jede Blutprobe 60 Minuten mit einem standardisierten Johanniskrautextrakt inkubiert. Während dieser Zeit wurden die Proben auf dem Rollenmischer gerollt und durch Aluminiumhüllen lichtdicht gehalten.

Durch Verdünnung des Johanniskrautextraktes wurden die Effekte von Hypericin-konzentrationen von 0.5 bis $16.5 \text{ } \mu\text{Mol/l}$ untersucht und mit entsprechenden ebenfalls unbelichteten Placebokontrollen verglichen. Die Abbildung 8 zeigt die aus 7 Experimenten ermittelten Elongationskurven. In der linearen Darstellung der Schubspannung (oberer Bildteil) wird deutlich, daß Hypericin anscheinend keinen Einfluß auf die Verformbarkeit der Erythrozyten ausübt. Anhand der logarithmischen Darstellung (unterer Bildteil) kann man erkennen, daß nur die höchsten benutzten Hypericin-konzentrationen im niedrigeren Schubspannungsbereich minimale Veränderungen bewirken, die statistisch aber nicht signifikant sind.

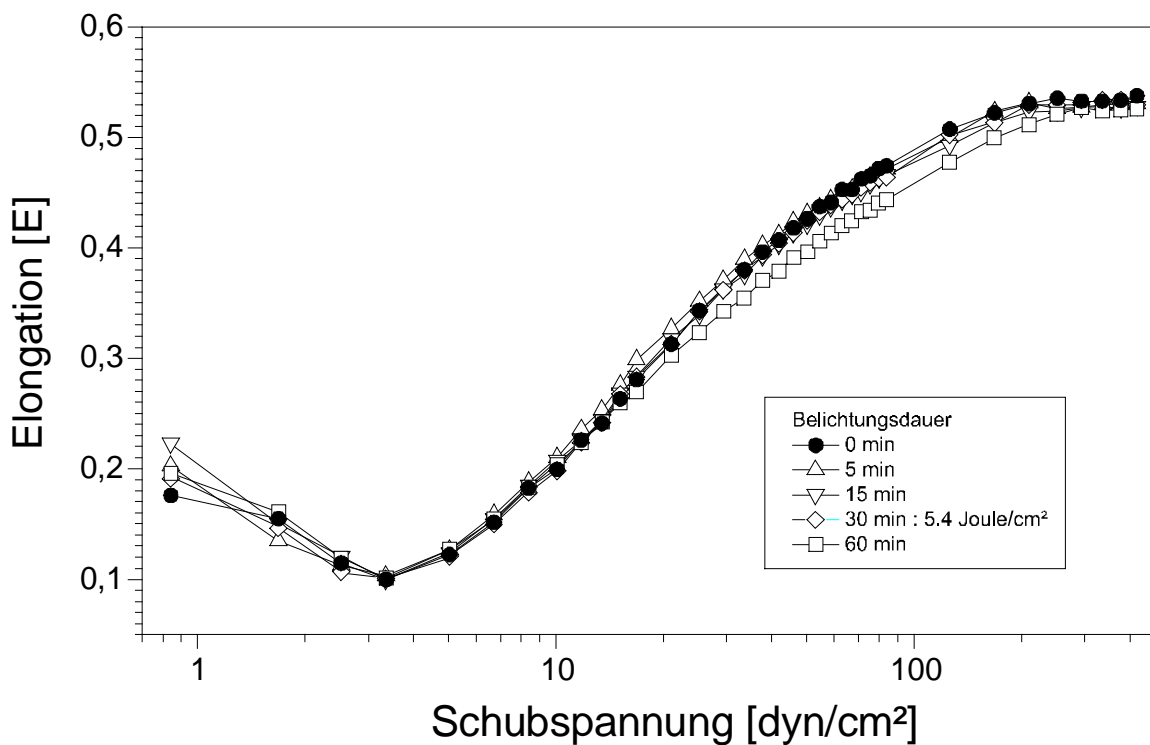
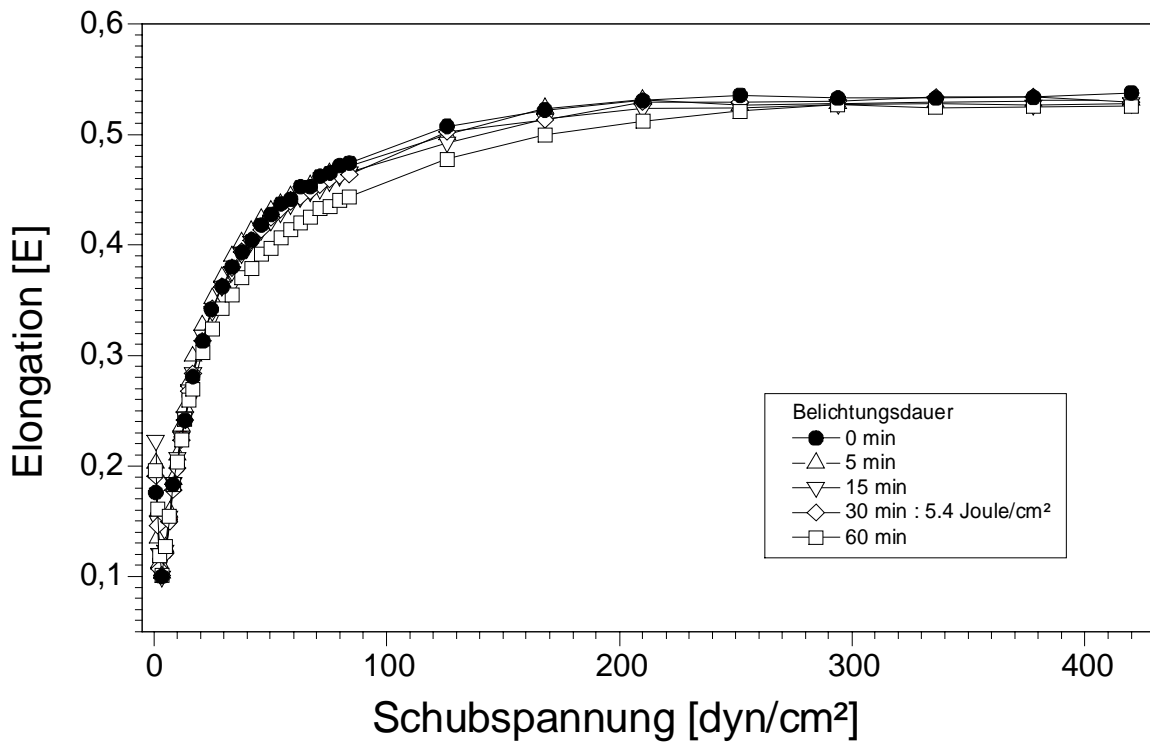


Abbildung. 7: Beziehung zwischen Elongation und Schubspannung unter UVA-Belichtung (Philips Hb 170A, 3 mW/cm²). Im oberen Bildteil ist die Schubspannung linear, im unteren logarithmisch aufgetragen. Bei einer Belichtung von 60 Minuten tritt eine sehr geringe Reduktion der Elongation zwischen 11 und 200 dyn/cm² auf. Wie aus der halblogarithmischen Darstellung hervorgeht, ist bei Schubspannungen < 10 dyn/cm² kein auffälliger Effekt vorhanden.

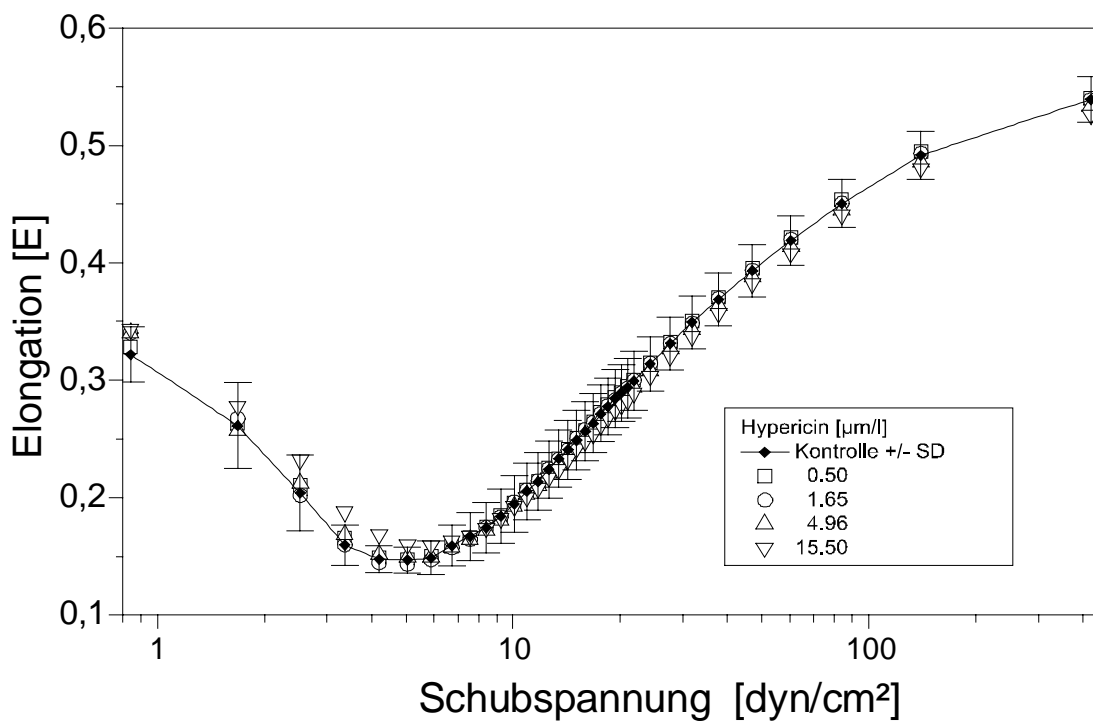
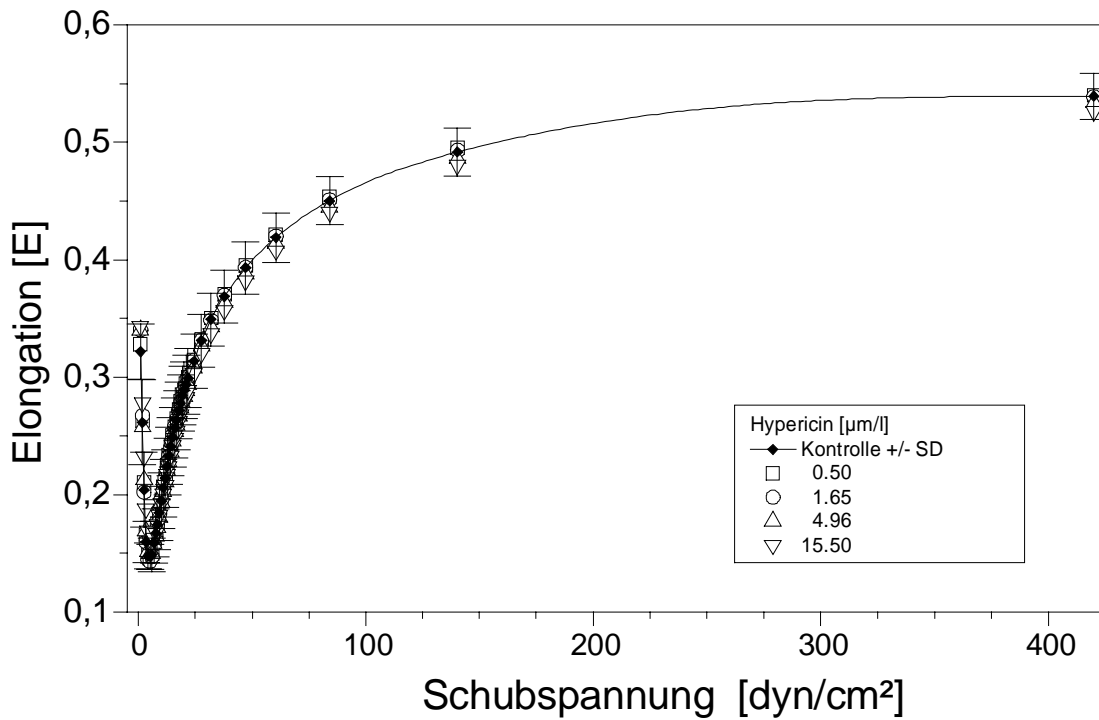


Abbildung 8: Elongation in Abhängigkeit von der Schubspannung. Wirkung von Johanniskraut, entsprechend Hypericinkonzentrationen von 0.5 bis 16.5 µMol/l. Mittelwert und Standardabweichung aus $n = 7$. Zur übersichtlicheren Darstellung wurde auf die Wiedergabe aller Standardabweichungen verzichtet. Wie in Abbildung 7 ist zur deutlicheren Wiedergabe der Daten bei Scherraten von 1 - 10 im unteren Bildteil die Schubspannung logarithmisch skaliert.

3.3. Die Wirkung von Hypericin unter Belichtung

Nachdem eine Eigenwirkung des Johanniskrauts auf die Erythrozyten in den oben beschriebenen Experimenten weitgehend ausgeschlossen wurde, haben wir im Folgenden paarweise belichtete und unbelichtete Proben der jeweils gleichen Hypericinkonzentrationen miteinander und gegen die hypericinfreien Kontrollen (Volumenausgleich durch Hinzufügen von isotoner NaCl-Lösung) verglichen. Alle Proben wurden in der gleichen Art vorbehandelt, also auf dem Rollenmischer bewegt und simultan belichtet.

Die Ergebnisse aus 7 Experimenten mit verschiedenen Blutspendern sind in der Abbildung 9 dargestellt. Hypericin, in ansteigenden Konzentrationen, reduziert den Elongationskoeffizienten [E] über einen weiten Bereich des applizierten Scherstresses. Bei sehr hoher Schubspannung erscheint die Reduktion der Elongation jedoch geringer im Vergleich zum Bereich zwischen ca. 20 und 120 dyn/cm².

Setzt man die E-Werte der belichteten Kontrollen gleich 100 % und trägt die Zu- oder Abnahme des Elongationskoeffizienten gegen die Schubspannung auf, so erhält man für die Wirkung der belichteten Hypericinproben die in Abbildung 10 (oberer Bildteil) wiedergegebenen Kurven. Die Kurven, die die Effekte von Hypericinkonzentrationen von 1,65, 4,96 und 16,50 µM/l beschreiben, zeigen einen biphasischen Verlauf. Bis zu 3 dyn/cm² erkennt man eine relative Zunahme des Elongationskoeffizienten (ca. 125 % bei 16,50 µM/l), gefolgt von einer Abnahme, die bei 8,4 dyn/cm² am deutlichsten ausgeprägt ist (ca. 60 % bei 16,50 µM/l).

Mit höherer Schubspannung wird die Elongationseinbuße zunehmend geringer. Bei der maximalen Schubspannung (435 dyn/cm²) ist der Hypericineffekt in belichteten Proben nur noch sehr klein. Durch doppelt reziproke Darstellung der Elongationskurven (entsprechend dem Lineweaver-Burk-Plot) läßt sich der maximal erreichbare Elongationskoeffizient - und damit die maximale Verformbarkeit der Erythrozyten - ermitteln (4). Aus einer entsprechenden Analyse der Daten ergab sich, daß die maximale Verformbarkeit durch Hypericin - auch unter Belichtung - nicht verändert wird.

Der untere Teil der Abbildung 10 zeigt die Dosis-Wirkungskurven für hypericinbehandelte Blutsuspensionen. Da der deutlichste Effekt bei Scherraten von 8,4 dyn/cm² lag, werden nur die Daten für diese Scherbelastung dargestellt. Bei belichteten Proben nimmt die Wirkung (Reduktion des Elongationskoeffizienten "E") dosisabhängig zu. Dieser Effekt ist schon bei einer Konzentration von 0,5 µMol/l statistisch signifikant. Das Maximum der Wirkung, erreicht bei 16,5 µMol/l, beträgt ca. 40 %. Bei abgedunkelten Proben läßt sich im untersuchten Konzentrationsbereich keine signifikante Wirkung nachweisen.

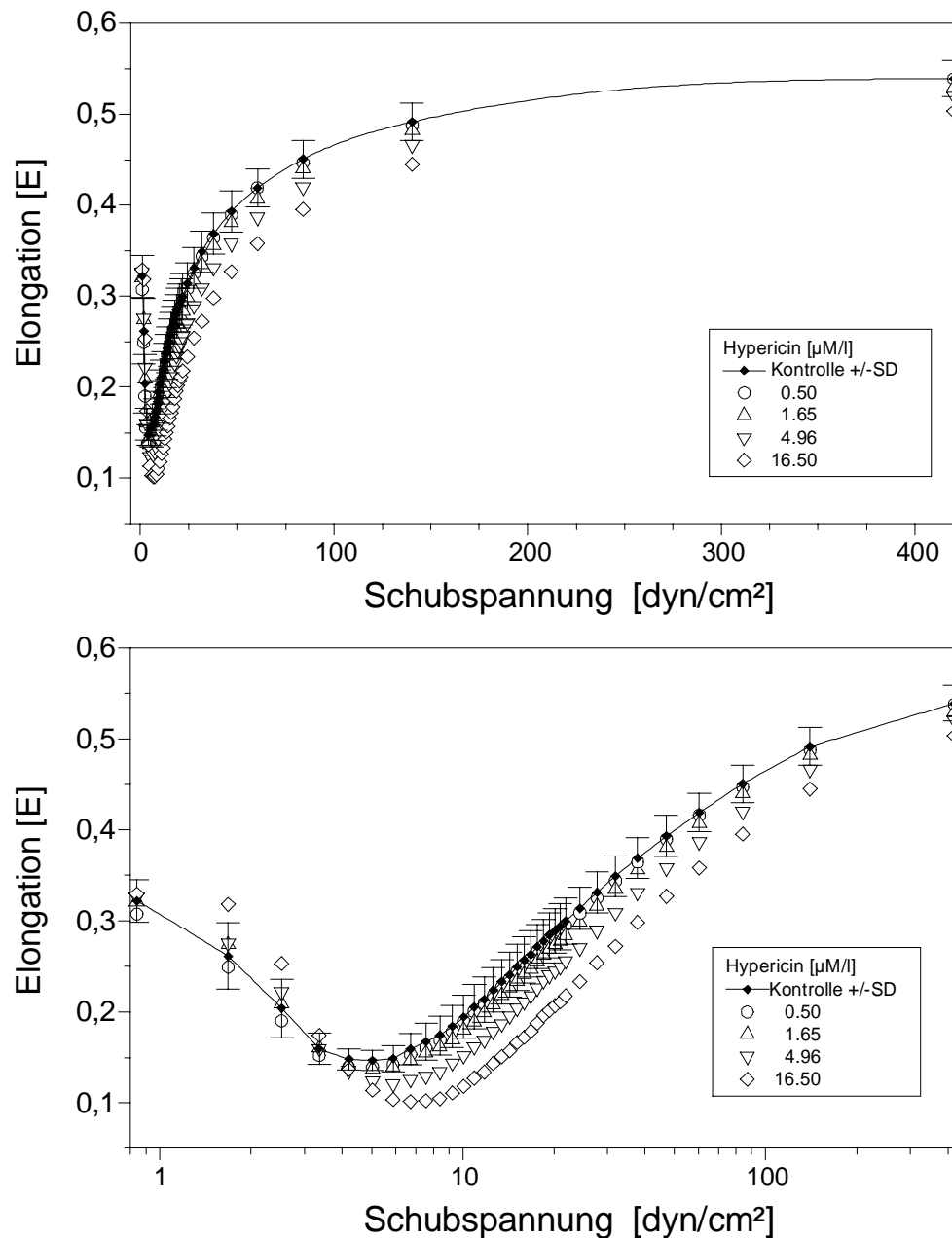


Abbildung 9: Elongation in Abhängigkeit von der Schubspannung. Wirkung von Johanniskraut, entsprechend Hypericinkonzentrationen von 0.5 bis 16.5 $\mu\text{Mol/l}$. Effekt des Hypericins nach 30-minütiger UVA-Belichtung. Schon ab 4.96 $\mu\text{M/I}$ ist eine deutliche Elongationsverminderung sichtbar. Aus der unteren logarithmischen Darstellung erkennt man, daß diese Veränderungen im Bereich von 5 bis 400 dyn/cm^2 liegen, wobei die deutlichste Veränderung bei ca. 8 dyn/cm^2 liegt. Mittelwert und Standardabweichung aus $n = 7$. Zur übersichtlicheren Darstellung wurde auf die Wiedergabe aller Standardabweichungen verzichtet. Die Effekte im Schubspannungsbereich $< 20 \text{ dyn/cm}^2$ werden in der halblogarithmischen Darstellung deutlicher (Abbildung 9 unten). Hierbei fällt auf, daß die stärkste Wirkung zwischen 7 und 10 dyn/cm^2 auftritt.

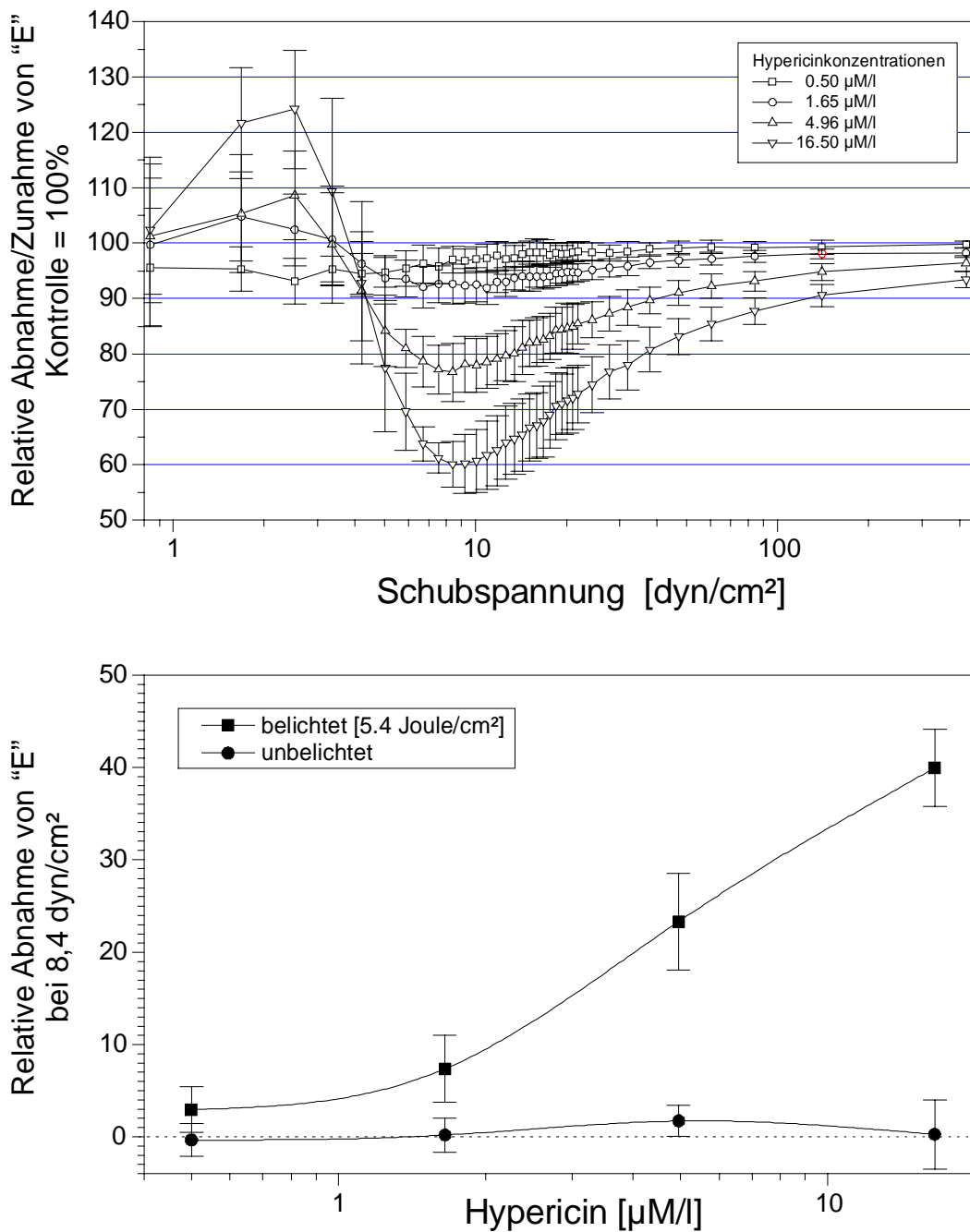


Abbildung 10: Oberer Bildteil: Prozentuale Abweichung der Elongationswerte in Abhängigkeit von der Schubspannung. Wirkung von Hypericin bei einer Belichtung von 5.4 Joule/cm². Die unbelichteten Kontrollen wurden gleich 100 % gesetzt. Mit steigender Konzentration wird die Wirkung in Form einer oszillierenden Funktion deutlich. Datensatz wie in Abbildung 9 gezeigt (Mittelwerte +/- SD).

Unterer Bildteil: Dosis-Wirkungs-Kurve zur Abnahme des Elongationskoeffizienten bei einer Scherrate von 8.4 dyn/cm² (Mittelwerte +/- SD). Dosisabhängige Wirkung des Hypericins unter Belichtung. Keine statistisch signifikante Wirkung bei den unbelichteten Proben.

3.4. Die Wirkung von Hypericin in oxygeniertem und desoxygeniertem Blut

Die Frage, ob die photosensitierende Wirkung von Hypericin die Anwesenheit von Sauerstoff voraussetzt, wird in der Literatur kontrovers diskutiert (23, 53). Um dieser Frage weiter nachzugehen, wurde unter Benutzung unseres Versuchsmodells die Wirkung von Hypericin an oxygeniertem und desoxygeniertem Blut untersucht. Die Desoxygenierung geschah durch Zugabe von Glukoseoxydase (4400 I.U./ml Blutsuspension). Um eine Akkumulation von Wasserstoffperoxyd (H_2O_2) zu vermeiden, wurde Katalase (24000 I.U./ml Suspension) hinzugefügt (Reaktionsschema siehe Abbildung 11 oben). Die auf diese Weise desoxygenierten Proben wurden durch Überschichtung mit Argon vor einer Re-oxygenierung geschützt. Vor jeder Messung wurde das Viskosimeter des Laser-Diffraktoskops ebenfalls mit Argon gefüllt. Die oxygenierten Proben wurden 3 Minuten lang mit reinem Sauerstoff durchperlt. Ihnen wurde Katalase und (statt Glukoseoxydase) isotone Kochsalzlösung zugesetzt.

Die Abbildung 11 zeigt die Wirkung von Hypericin in oxygenierten (Kreise) und desoxygenierten (Quadrate) Blutproben.

Beim Vergleich der beiden unbestrahlten Probengruppen (gefüllte Symbole) fällt auf, daß die Desoxygenierung alleine bzw. die Anwesenheit von Glukoseoxydase die Elongationskurve nach links verschiebt und bei niedrigen Schubspannungen die Elongationswerte deutlich niedriger liegen.

Im Vergleich der beiden belichteten Probengruppen (offene Symbole) findet sich die gleiche Linksverschiebung und Absenkung der Kurven. Betrachtet man die Kurven der desoxygenierten Proben (Kreise), so fällt auf, daß zwischen belichteten und unbelichteten Blutsuspensionen kein signifikanter Unterschied in den Elongationswerten vorhanden ist. Nur im Falle der oxygenierten Proben (Quadrate) tritt die lichtbedingte Hypericinwirkung (Senkung der Elongationswerte über einen weiten Bereich der Schubspannung) ein.

3.5. Die Wirkung von GSH und Hypericin bei unbelichteten Proben

Um herauszufinden, ob es möglich ist, die photosensitierenden Eigenschaften des Johanniskrauts - zumindest teilweise - aufzuheben, untersuchten wir den Einfluß von reduziertem Glutathion (GSH). Dieses körpereigene Tripeptid spielt eine zentrale Rolle innerhalb der zellulären antioxidativen Mechanismen.

In Anwesenheit von 4.96 μM /l Hypericin wurde zunächst die Wirkung von aufsteigenden GSH-Konzentrationen auf abgedunkelte Proben untersucht. Es zeigte sich, daß unter diesen Bedingungen GSH mit steigender Konzentration die Elongationswerte bei Schubspannungen $> 5 \text{ dyn/cm}^2$ zu größeren Werten verschiebt

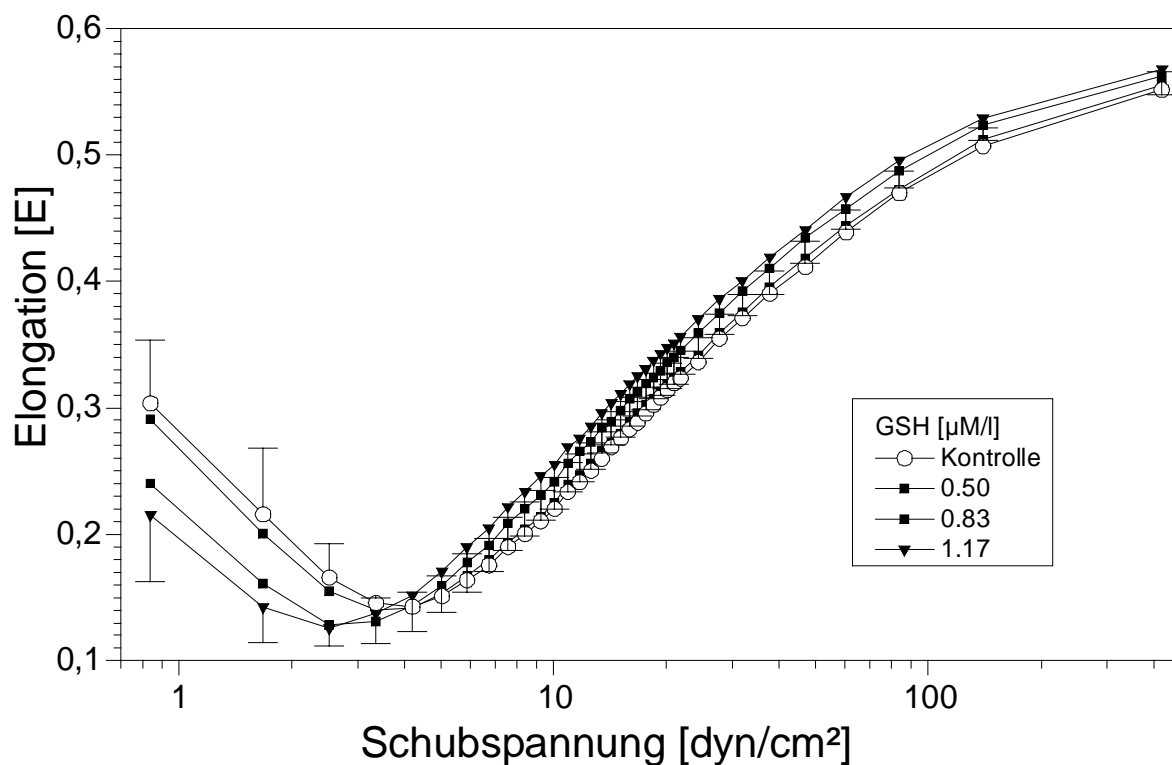
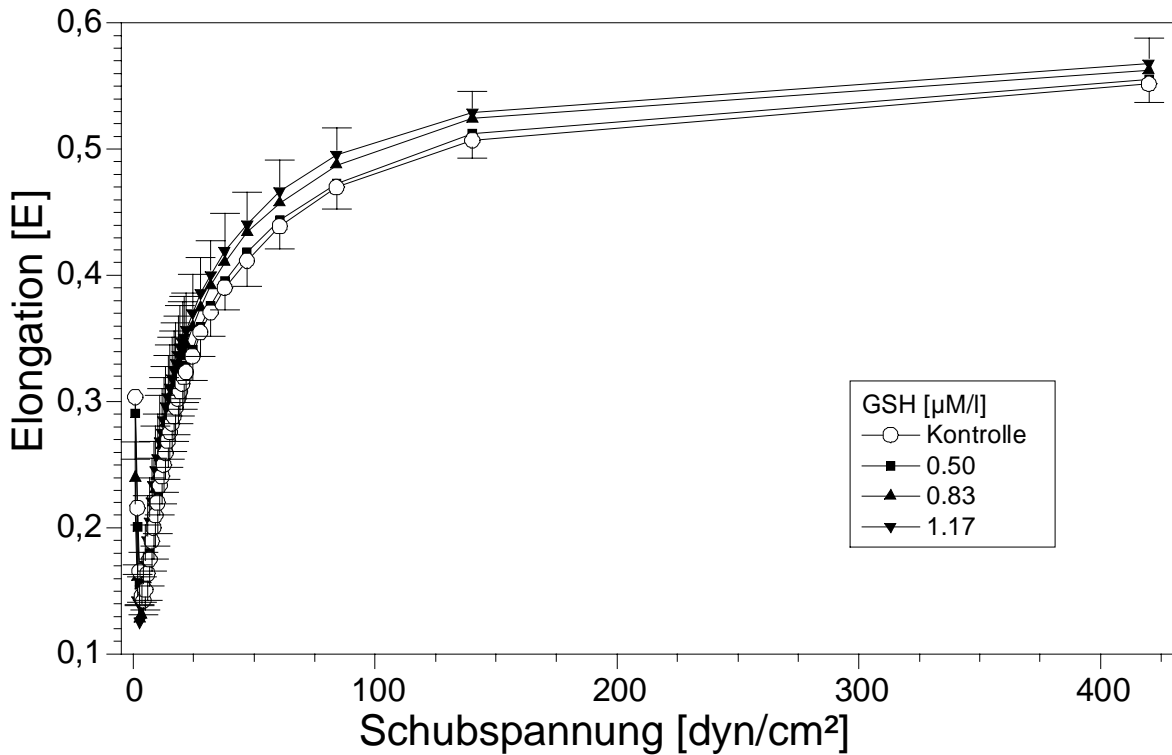


Abbildung 12: Beziehung zwischen Elongation und Schubspannung. Wirkung von GSH (reduziertes Glutathion) in Anwesenheit von Hypericin (4.96 $\mu\text{M/l}$) ohne Belichtung. Lineare bzw. logarithmische Skalierung der Schubspannung. Wegen der besseren Übersichtlichkeit sind die Standardabweichungen nur bei der GSH-freien Kontrolle und der höchsten GSH-Konzentration dargestellt ($n = 5$).

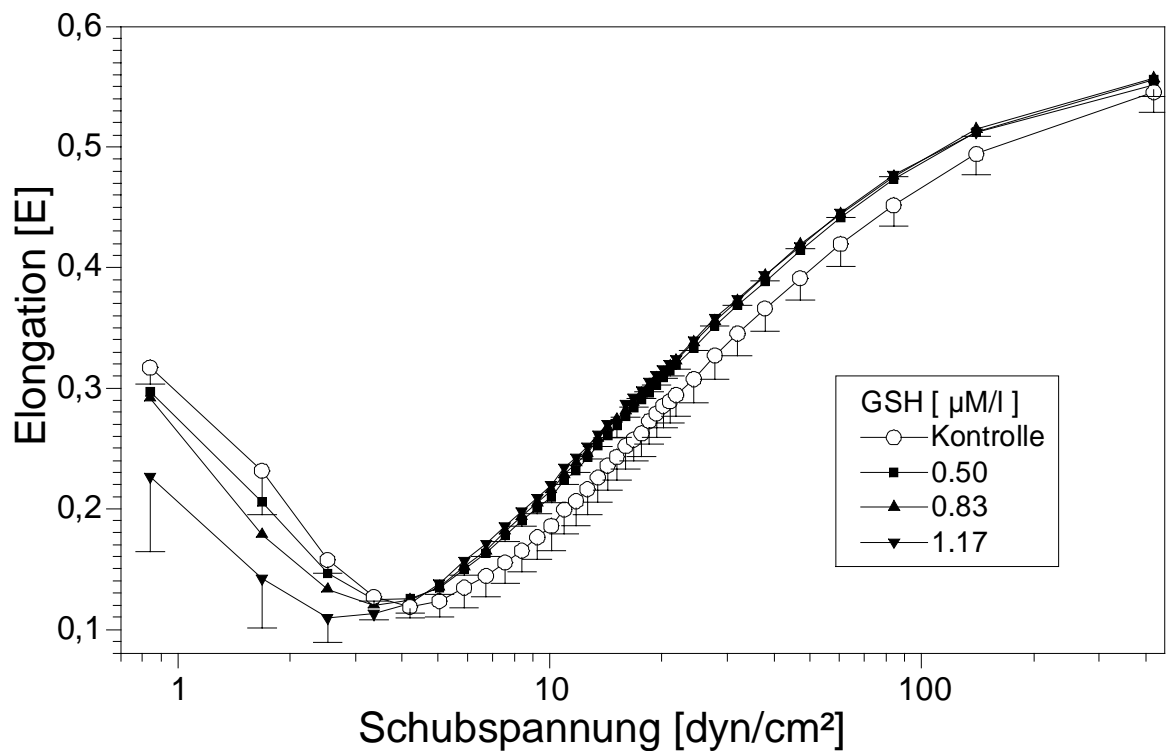
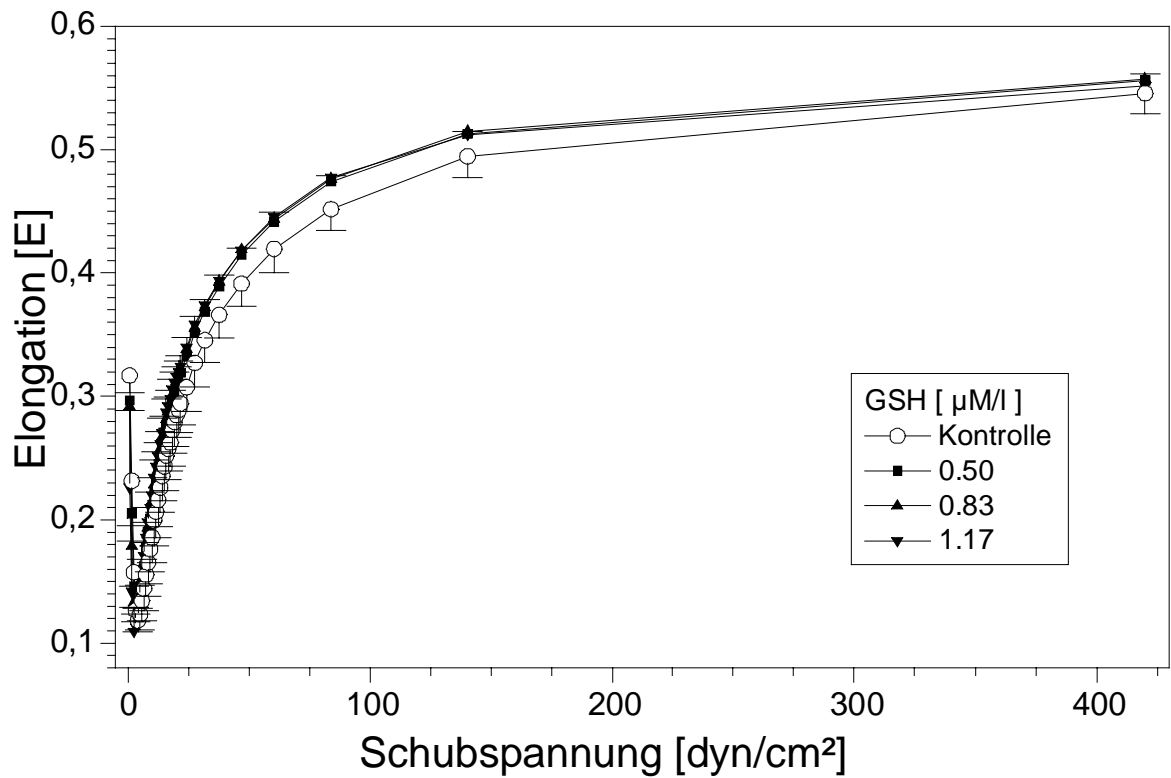


Abbildung 13: Beziehung zwischen Elongation und Schubspannung. Wirkung von GSH (reduziertes Glutathion) in Anwesenheit von Hypericin (4.96 μM/l) nach Belichtung. Lineare bzw. logarithmische Skalierung der Schubspannung. Wegen der besseren Übersichtlichkeit sind die Standardabweichungen nur bei der GSH-freien Kontrolle und der höchsten GSH-Konzentration dargestellt (n = 5).

(siehe Abbildung 12). Im Bereich von Schubspannungen $< 4 \text{ dyn/cm}^2$ lagen die gemessenen "E"-Werte deutlich unter denen der Kontrollen (kein GSH).

3.6. Die Wirkung von GSH und Hypericin bei belichteten Proben

Betrachtet man die entsprechenden Daten, gewonnen mit Proben, die - unter sonst gleichen Bedingungen - dem UVA-Licht ausgesetzt waren (Abbildung 13), dann wird deutlich, daß GSH die durch Hypericin bedingten Veränderungen der Elongationswerte weitgehend antagonisieren kann. Der Elongationskoeffizient steigt bei hohen und sinkt in niedrigen Schubspannungen. Bei einer Konzentration von $1.17 \text{ }\mu\text{M}$ GSH/l konnte die Wirkung von $4.96 \text{ }\mu\text{M}$ Hypericin/l über den gesamten Bereich der applizierten Schubspannung – einschließlich der Werte $< 5 \text{ dyn/cm}^2$ - aufgehoben werden.

4. Diskussion

Die vorgelegten in vitro Untersuchungen zeigen, daß Hyperforat keine signifikanten Veränderungen der Erythrozytenflexibilität (gemessen als Elongationsindex "E") bewirkt. Erst durch Belichtung mit einer Leuchtstofflampe, die vorwiegend UVA-Licht abstrahlt, verringern sich die Elongationswerte im Vergleich zu den unbelichteten Kontrollen. Im Bereich hoher Schubspannungen sind diese photoinduzierten Effekte allerdings gering. Die Extrapolation der hyperbolischen Elongationskurve gegen ∞ (doppeltreziproke Darstellung, nach (4)) zeigt, daß die maximale Verformbarkeit nicht verändert wird. Dies spricht dafür, daß sich die viskoelastischen Eigenschaften der Erythrozyten über einen weiten Schubspannungsbereich durch die Photosensibilisierung nicht geändert haben. Der auffälligste Effekt ist die lichtbedingte Reduktion der Elongationswerte, gemessen bei sehr kleinen Schubspannungen mit einem Maximum des Effektes bei 8.4 dyn/cm^2 (siehe Abbildung 10).

Wie aus den Untersuchungen von Bayer und al. (4) hervorgeht, ist die Lage der Erythrozyten nach Einfüllen in ein Viskosimeter in Hinblick auf ihre Lage im Raum rein zufällig. Bei randomisierter Verteilung im Raum ergibt sich damit ein mehr oder weniger rundes Beugungsbild mit einem Elongationskoeffizienten um "0". Liegt eine geringe Schubspannung an, so haben die Erythrozyten die Neigung, sich horizontal im Spalt des Searle-Viskosimeters auszurichten, wobei sie dem Laserstrahl ihre schmale Seite präsentieren. Dadurch ergeben sich beispielsweise bei einer Schubspannung von 1 dyn/cm^2 Elongationsindizes von ca. 0.3, obwohl die Erythrozyten durch diese Schubspannung noch nicht gedehnt wurden (siehe z.B. Abbildung 8). Mit zunehmender Schubspannung kippen mehr und mehr Erythrozyten um 90° , wobei sie sich nun als Scheiben darstellen. Mit dieser Orientierung im Raum beginnt die eigentliche elliptische Verformung durch die tangential angreifende Schubspannung. Hierbei wird ein Minimum des Elongationskoeffizienten bei ca 5 dyn/cm^2 durchlaufen. Bei einer Schubspannung von 20 bis 25 dyn/cm^2 ist unter physiologischen Bedingungen und bei gesunden Probanden der Orientierungsprozeß abgeschlossen. Eine eindeutige Beurteilung der viskoelastischen Eigenschaften der Erythrozyten ist dementsprechend nur bei Betrachtungen von Schubspannungen $> 25 \text{ dyn/cm}^2$ sinnvoll.

Der starke Effekt des hypericinhalten Extraktes bei niedrigen Schubspannungen läßt sich daher als Veränderung von Zelleigenschaften erklären, die höhere Schubspannungen zur Orientierung im laminären Strömungsprofil erfordern. Welche Parameter dieser lichtinduzierten Wirkung des Hypericins zugrundeliegen, kann aus diesen Untersuchungen nicht unmittelbar abgeleitet werden. Es liegt je-

doch die Vermutung nahe, daß eine Umwandlung normozytärer Erythrozyten in Echinozyten vorliegt.

Kürzlich konnte gezeigt werden, daß durch hyperosmolare Lösungen entsprechende Veränderungen der Elongationskurve hervorgerufen werden, während hypoosmolare Inkubationsmedien (unter Bildung von Sphärozyten), den Orientierungsvorgang erleichtern, bzw. völlig aufheben (7). Oxydativer Streß (Ozon, H_2O_2) führt – ähnlich wie die lichtinduzierte Wirkung von Hypericin - zu Veränderungen in der Orientierungsphase, welche durch Senkung der Osmolarität der Suspension aufgehoben werden kann (7). Zur Bestätigung dieser Hypothese sollte der Versuch unternommen werden, die photoinduzierte Wirkung des Hypericins bei unterschiedlichen Osmolaritäten der Suspension zu messen, bzw. durch Dichtezentrifugation die Veränderungen des zellulären Wasserhaushaltes abzuschätzen. Es wird vermutet, daß eine Verminderung der Erythrozytenflexibilität zu einer Störung der Mikroperfusion führen kann. Inwieweit die hier beschriebene Veränderung der mechanischen Eigenschaften einen negativen Einfluß haben kann, läßt sich nicht ohne weitere Untersuchungen abschätzen. Sollte tatsächlich eine Bildung von Echinozyten vorliegen, so kommt auf der einen Seite ein negativer Prozeß durch Reduktion der Verformbarkeit (bedingt durch die innere Viskositätszunahme und Formänderung der Erythrozyten), auf der anderen Seite ein positiver Effekt durch die Verkleinerung von Zellvolumen und -größe in Betracht.

In diesem Zusammenhang erhebt sich die Frage, ob in vivo ein entsprechender Effekt überhaupt vorstellbar ist, denn die menschliche Haut ist – insbesondere für kurzwelliges Licht – nur begrenzt durchlässig. Die Abbildung 14 zeigt, daß eingestrahktes UVA-Licht (Hauptemissionsbereich der verwendeten Lichtquelle, siehe Abbildung 3) zu ca 20 % die Epidermis durchdringt und bis weit in das stratum papillare des Coriums vordringt. Somit werden also auch die Kapillaren und das darin strömende Blut erreicht. Im sichtbaren Bereich wird durch die Epidermis vergleichsweise wenig Licht absorbiert, so daß bis zu 77 % der Strahlung in das Corium mit seinen Kapillaren vordringt. Das emittierte Licht der verwendeten UVA-Leuchtstofflampe TL29D16/09 zeigt im sichtbaren Bereich nur eine geringe Leistungsdichte, jedoch mit Peaks bei 403, 435, 546 und 576 nm.

Man kann demnach davon ausgehen, daß ein Teil des eingestrahkten Lichtes in vivo ebenfalls die Erythrozyten im langsam strömenden Kapillarblut erreicht und damit die Voraussetzung schafft - in Wechselwirkung mit Hypericin sensibilisierten Erythrozyten -, die in vitro beschriebenen Effekte zu entfalten.

Es muß jedoch hervorgehoben werden, daß die von uns verwendeten Konzentrationen des lipophilen Hypericins um ein Vielfaches höher lagen, als bei einer einmaligen therapeutischen Anwendung am Menschen. Nach unserem Ermessen ist

eine Wirkung *in vivo* nur dann zu erwarten, wenn eine Akkumulation von Hypericin im Cytosol bzw. in Membranen der Erythrozyten erfolgt. In der Literatur finden sich speziell darüber keine entsprechenden Angaben. Zellmembranen von Viren (52), Carcinomzellen (39, 53, 56) und Mitochondrien (52) reichern allerdings Hypericin an. Auch der langsame Wirkungseintritt sowohl der antidepressiven als auch der hautsensitivierenden Wirkung und die auch noch danach für ca. 7 Tage fortbestehende Wirkung nach Absetzen (46), spricht für eine Akkumulation in unterschiedlichen Körperzellen, vor allem in deren Lipidanteilen (34, 59).

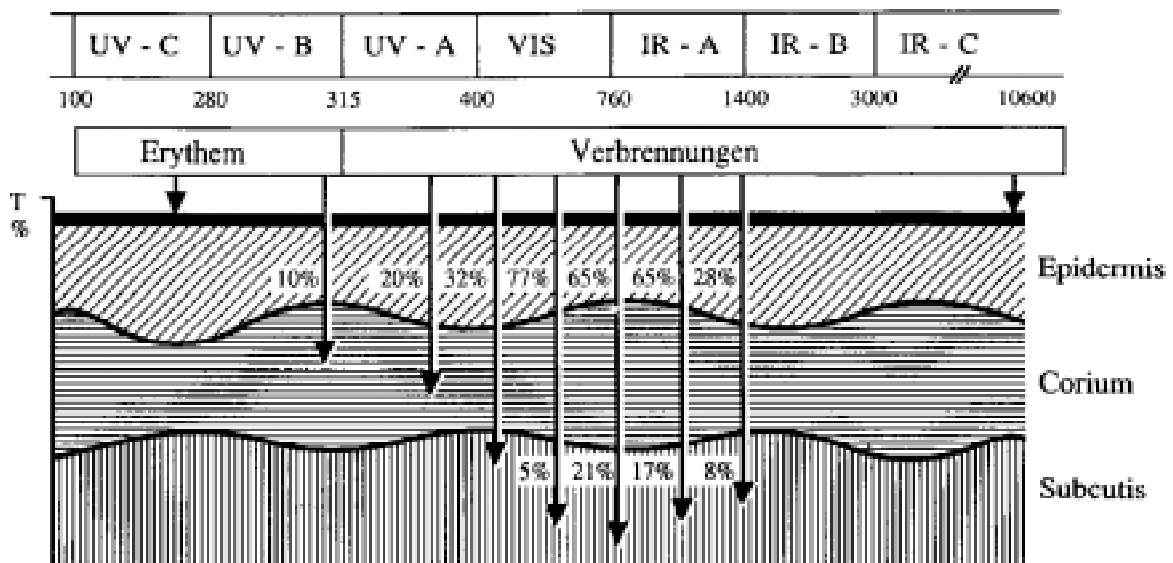


Abbildung 14: Transmission von Licht durch die Haut in Abhängigkeit von der Wellenlänge (nach 49).

In den bis heute vorliegenden Untersuchungen zur photodynamischen Wirkung des Hypericins wurde zur Belichtung in der Regel sichtbares Licht, entweder monochromes Licht in der Nähe der Absorptionsmaxima von 550 und 590 nm (2, 13, 14, 20, 52), oder die Absorptionsmaxima einschließend (540 bis 610 nm, (22, 23, 42)), oder breitbandig von 360 bis 700 nm (1, 3, 31, 37, 48, 52, 53) verwendet. Obwohl Hypericin ein weiteres Absorptionsmaximum bei ca. 340 nm zeigt (47) und eine extensive Bildung von Singulett Sauerstoff in diesem Wellenlängenbereich beschrieben wurde (52), ist UVA-Licht zur Erzeugung einer Photosensibilisierung bis heute nicht eingesetzt worden. Da die UVA-Leuchtstofflampe auch im sichtbaren Bereich emittiert (Peaks bei 435, 546, 576), wobei der Emissionsspek von 546 sehr dicht bei einem der Absorptionsmaxima des Hypericins liegt, bleibt unklar, ob die beobachteten Effekte durch UVA-Bestrahlung, durch den sichtbaren Anteil oder durch beide bedingt sind.

Die Frage, ob die photoinduzierte Wirkung des Hypericins an die Anwesenheit von Sauerstoff gebunden ist, wird kontrovers diskutiert (23, 53). Unsere Ergebnisse zeigen eindeutig, daß in desoxygeniertem Blut eine lichtbedingte Wirkung von Hypericin nicht auftritt (Abbildung 11). Es muß allerdings betont werden, daß die hier gezeigten Ergebnisse zunächst widersprüchlich waren. Nach Zugabe von Glucoseoxydase in niedrigen Konzentrationen (< 4400 i.U./ml Suspension) konnte eine photosensitierende Wirkung des Hypericins gemessen werden (auf die Darstellung dieser Ergebnisse wurde in Kap. 3 verzichtet). Erst hohe Glucoseoxydasekonzentrationen – vermutlich verbunden mit einer weiteren Senkung des pO_2 – konnten die Abhängigkeit der Hypericinwirkung von Sauerstoff bestätigen. Der Sauerstoffpartialdruck wurde in dem vorliegenden Versuchsansatz nicht bestimmt, so daß Aussagen über die Abhängigkeit vom pO_2 nicht getroffen werden können.

Ob reduziertes Glutathion den hier beschriebenen photodynamischen Effekt auf die Erythrozyten reduziert oder verhindert, läßt sich anhand der vorliegenden Versuche nicht eindeutig beantworten. Dies liegt daran, daß GSH per se eine dem photodynamischen Effekt entgegengesetzte Wirkung zeigt, nämlich eine Reduktion des Elongationskoeffizienten bei niedrigen Schubspannungen und eine Steigerung bei hohen Schubspannungen (siehe Abbildung 12). Es ist jedoch auffallend, daß in Anwesenheit von GSH, z.B. in einer Konzentration von 1.17 $\mu\text{mol/l}$ eine photodynamische Wirkung von Hypericin (4.96 $\mu\text{mol/l}$) nicht mehr auftritt (siehe Abbildung 13).

5. Literatur

1. Al-Akhras M.A., Grossweiner L.I.: Sensitization of photohemolysis by hypericin and Photofrin®. *J. Photochem. Photobiol. B: Biology* 34: 169-175 (1996)
2. Andreoni A., Colasanti A., Colasanti P., Mastrocinque M., Riccio P., Roberti G.: Laser photosensitization of cells by hypericin. *Photochem. Photobiol.* 59: 529-533 (1994)
3. Araya O.S., Ford E.J.H.: An investigation of the type of photosensitization caused by the ingestion of St. John's Wort (*hypericum perforatum*) by calves. *J. Comp. Path.* 91: 135-141 (1981)
4. Bayer R., Çaglayan S., Günther B.: Discrimination between orientation and elongation of RBC in laminar flow by means of laser diffraction. *SPIE* 2136: 105-113 (1994)
5. Bayer R., Çaglayan S., Hofmann R., Ostuni D.: Laser diffraction of RBC: The method and its pitfalls. *SPIE* 2100: 248-255 (1994)
6. Bayer R., Schauf B., Günther, B.: Erythrocyte shape analysis by means of laser diffraction. *SPIE* 1641: 246-255 (1992)
7. Bayer R., Waßer G.: Effects of oxidative stress on erythrocyte deformability. *SPIE* 2678: 333-341 (1996)
8. Bayer R., Wolf G.: Analysis of erythrocyte flexibility by means of laser diffraction: Rigidification due to defined shearing. *SPIE* 1981: 26-37 (1993)
9. Ben-Hur E., Livne A., Orenstein A.: Mechanism of phthalocyanidine-induced photohemolyses and its relevance to PDT-induced circulation stasis. Abstract, 3rd Biannual Meeting IPA, p. 23 (1990)
10. Bessis M., Mohandas N., Feo C.: Automated ektacytometry: A new method of measuring red cell deformability and red cell indices. *Blood Cells* 6: 315-327 (1980)
11. Bessis M., Mohandas N.: A diffractometric method for the measurement of cellular deformability. *Blood Cells* 1: 307-313 (1975)
12. Capitanio M., Cappelletti E.M., Filippini R.: Traditional antileukodermic herbal remedies in the Mediterranean area. *J. Ethnopharmacol.* 27: 193-211 (1989)
13. Carpenter S., Fehr M.J., Kraus G.A., Petrich J.W.: Chemiluminescent activation of the antiviral activity of hypericin: A molecular flashlight. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 91: 12273-12277 (1994)
14. Chung P.S., Saxton R.E., Paiva M.B., Rhee C.K., Soudant J., Mathey A., Foote C., Castro D.J.: 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 (1994)
15. Couldwell W.T., Gopalakrishna R., Hinton D.R., He S., Weiss M.H., Law R.E., Apuzzo M.L.J.: Hypericin: A potential antiglioma therapy. *Neurosurg.* 35: 705-710 (1994)
16. Davson H., Ponder E.: Photodynamically induced cation permeability in its relation to hemolysis. *J. Cell. Comp. Physiol.* 15: 67-74 (1940)
17. Degar S., Lavie G., Meruelo D.: Photodynamic inactivation of radiation leukemia virus produced from hypericin-treated cells. *Virology* 197: 796-800 (1993)
18. Degar S., Prince A.M., Pascual D., Lavie G., Levin B., Mazur Y., Lavie D., Ehrlich L.S., Carter C., Meruelo D.: Inactivation of the human immunodeficiency virus by hypericin: Evidence for photochemical alterations of p24 and a block in uncoating. *AIDS-Research-Human-Retroviruses* 8: 1929-1936 (1992)

19. Deuticke B., Henseleit U., Haest C.M., Heller K.B., Dubbelman T.M.A.R.: Enhancement of translayer mobility of a membrane liquid probe accompanies formation of membrane leaks during photodynamic treatment of erythrocytes. *Biochem. Biophys. Acta* 982: 53-61 (1989)
20. Diwu Z., Lown J.W.: Photosensitization with anticancer agents 17. EPR studies of photodynamic action of hypericin: Formation of semiquinone radical and activated oxygen species on illumination. *Free Radical Biol. & Med.* 14: 209-215 (1993)
21. Diwu Z.: Novel therapeutic and diagnostic applications of hypocrellins and hypericins. *Photochem. Photobiol.* 61: 529-539 (1995)
22. Duran N., Song P.S.: Hypericin and its photodynamic action. *Photochem. Photobiol.* 43: 677-680 (1986)
23. Fehr M.J., Carpenter S.L., Wannemuehler Y., Petrich J.W.: Roles of oxygen and photoinduced acidification in the light-dependent antiviral activity of hypocrellin A. *Biochemistry* 34: 15845-15848 (1995)
24. Fujita H., Inukay , Matsuo I.: In vitro photosensitized lysis of red blood cells by an antifungal drug griseofulvin. *J. Photochem. Photobiol. B: Biol.* 17: 77-80 (1993)
25. Groner W., Mohandas N., Bessis M.: New optical technique for measuring erythrocyte deformability with the ektacytometer. *Clin. Chem.* 26: 1435-1442 (1980)
26. Hardemann M.R., Goedhart P., Breederveld D.: Laser diffraction ellipsometry of erythrocytes under controlled shear stress using a rotational viscosimeter. *Clin. Chim. Acta* 165: 227-234 (1987)
27. Harrer G., Hübner W.D., Podzuweit H.: Wirksamkeit und Verträglichkeit des Hypericum-Präparates LI 160 im Vergleich mit Maprotilin. *Nervenheilkunde* 12: 279-301 (1993)
28. Hoffmann J., Kühl E.D.: Therapie von depressiven Zuständen mit Hypericin. *Z. Allg. Med.* 55: 776-782 (1979)
29. Hohenheim, T. von: *Sämtliche Werke, 1. Abteilung medizinische, naturwissenschaftliche und philosophische Schriften* (Karl Sudhof, ed.), 2. Band, pp. 111-122.
30. Holden C.: Treating AIDS with Worts. *Science* 254(5031): 522 (1991)
31. Khalili M., Grossweiner L.I.: Sensitization of photohemolysis by benzoporphyrin derivative monoacid ring A and porphyrins. *J. Photochem. Photobiol. B: Biol.* 37: 236-244 (1997)
32. Kraus G.A., Pratt D., Tossberg J., Carpenter S.: Antiretroviral activity of synthetic hypericin and related analogs. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 172: 149-153 (1990)
33. Kuypers F.A., Scott M.D., Schott M.A., Lubin B., Chiu D.T-Y.: Use of ektacytometry to determine red cell susceptibility to oxidative stress. *J. Lab. Clin.* 116: 535-545 (1990)
34. Lavie G., Mazur Y., Lavie D., Prince A.M., Pascual D., Liebes L., Levin B., Meruelo D.: Hypericin as an inactivator of infectious viruses in blood components. *Transfusion* 35: 392-400 (1995)
35. Lavie G., Valentine F., Levin B., Mazur Y., Gallo G., Lavie D., Weiner D., Meruelo D.: Studies of the mechanisms of action of the antiretroviral agents hypericin and pseudohypericin. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 86: 5963-5967 (1989)
36. Lenard J., Rabson A., Vanderoef R.: 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 (1993)
37. Lopez-Bazzocchi I., Hudson J.B., Towers G.H.N.: Antiviral activity of the photoactive plant pigment hypericin. *Photochem. Photobiol.* 54: 95-98 (1991)
 38. Meruelo D., Lavie G., Lavie D.: 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 (1988)
 39. Miskovsky P., Sureau F., Chinsky L., Turpin P.Y.: Subcellular distribution of hypericin in human cancer cells. *Photochem. Photobiol.* 62: 546-549 (1995)
 40. Moser J.G., Hoof D., Doehrmann S., Bayer R., Wolf G., Schauf B.: Erythrocytes, an extremely sensitive indicator cell for photodynamic effects. In: *Photodynamic Therapy and Biomedical Lasers* (P. Spinelli, M. Dal Fante, R. Marchesi, eds.), pp. 574-578 (1993)
 41. Müldner H., Zöller M.: Antidepressive Wirkung eines auf den Wirkstoffkomplex Hypericin standardisierten Hypericum-Extraktes. *Drug Res.* 34: 918-920 (1984)
 42. Nishiuchi T., Utsumi T., Kanno T., Takehara Y., Kobuchi H., Yoshioka T., Horton A.A., Yasuda T., Utsumi K.: Inhibition of neutrophil superoxide generation by hypericin, an antiretroviral agent. *Arch. Biochem. Biophys.* 323: 335-342 (1995)
 43. Okpanyi S.N., Weischer M.L.: Tierexperimentelle Untersuchungen zur psychotropen Wirksamkeit eines Hypericum-Extraktes. *Drug Res.* 37: 10-13 (1987)
 44. Pooler J.P.: The kinetics of colloid osmotic hemolysis. I. Nystatin induced lysis. *Biochim. Biophys. Acta* 812: 193-198 (1985)
 45. Pooler J.P.: The kinetics of colloid osmotic hemolysis. II. Photohemolysis. *Biochim. Biophys. Acta* 812: 199-205 (1985)
 46. Roth L.: *Hypericum, Hyperizin: Botanik, Inhaltsstoffe, Wirkung.* Ecomed Verlag, p. 137, (1990).
 47. Senthil V., Longworth J.W., Ghiron C.A., Grossweiner L.I.: Photosensitization of aqueous model systems by hypericin. *Biochim. Biophys. Acta* 1115: 192-200 (1992)
 48. Senthil V., Ramball Jones L., Senthil K., Grossweiner L.I.: Hypericin photosensitization in aqueous model systems. *Photochem. Photobiol.* 59: 40-47 (1994)
 49. Sliney D., Wolbarsht M.: *Safety with lasers and other optical sources.* Plenum Press, New York, p. 165, (1985)
 50. Suzuki O., Katsumata Y., Oya M., Blatt S., Wagner H.: Inhibition of monoamine oxidase by hypericin. *Planta-Med.* 50: 272-274 (1984)
 51. Takahashi I., Nakanishi S., Kobayashi E., Nakano H., Suzuki K., Tamaoki T.: Hypericin and pseudohypericin specifically inhibit protein kinase C: Possible relation to their antiretroviral activity. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 165: 1207-1212 (1989)
 52. Thomas C., MacGill R.S., Miller G.C., Pardini R.S.: Photoactivation of hypericin generates singlet oxygen in mitochondria and inhibits succinoxidase. *Photochem. Photobiol.* 55: 47-53 (1992)
 53. Thomas C., Pardini R.S.: Oxygen dependence of hypericin-induced phototoxicity to EMT6 mouse mammary carcinoma cells. *Photochem. Photobiol.* 55: 831-837 (1992)
 54. Utsumi T., Okuma M., Kanno T., Takehara Y., Yoshioka Y., Fujita Y., Horton A.A., Utsumi K.: Effect of the antiretroviral agent hypericin on rat liver mitochondria. *Biochem. Pharmacol.* 50: 655-662 (1995)

55. Utsumi T., Okuma M., Utsumi T., Kanno T., Yasuda T., Kobuchi H., Horton A.A., Utsumi K.: Light-dependent inhibition of protein kinase C and superoxide generation of neutrophils by hypericin, an antiretroviral agent. *Arch. Biochem. Biophys.* 316: 493-497 (1995)
56. Vandebogaerde A.L., Geboes K.R., Cuveele J.F., Agostinis P.M., Merlevede W.J., de Witte P.A.: Antitumor activity of photosensitized hypericin on A431 cell xenografts. *Anticancer Res.* 16: 1619-1626 (1996)
57. VanderWerf Q.M., Saxton R.E., Chang A., Horton D., Paiva M.B., Anderson J., Foote C., Soudant J., Mathey A., Castro D.J.: Hypericin: A new laser phototargeting agent for human cancer cells. *Laryngoscope* 106: 479-483 (1996)
58. Vorbach E.U., Hübner W.D., Arnoldt K.H.: Wirksamkeit und Verträglichkeit des Hypericum-Extraktes LI 160 im Vergleich mit Imipramin. Randomisierte Doppelblindstudie mit 135 ambulanten Patienten. *Nervenheilkunde* 12: 290-296 (1993)
59. Vyas G.N.: Inactivation and removal of blood-borne viruses. *Transfusion* 35: 367-370 (1995)
60. Willfort R.: Gesundheit durch Heilkräuter. Erkennung, Wirkung und Anwendung der wichtigsten einheimischen Heilpflanzen. Trauner Verlag, Linz (1991)
61. Wilmanowicz R., Bayer R.: Effects of St. John's wort on orientation and deformability of human RBC. *Proc. Biomed. Optics*, p. 80 (1998)
62. Wolf G., Bayer R., Ostuni D.: Stress induced rigidification of erythrocytes as determined by laser diffraction and image analysis. *Opti. Eng.* 31: 1475-1481 (1992)
63. Yu H., Wolford S.T., Kegode R., Zhao W., Osweiler G.D.: Hypericin-induced phototoxicity in cultured fibroblasts and swine erythrocytes. *Photochem. Photobiol.* 64: 168-173 (1996)

6. Zusammenfassung

Mit Hilfe der Laserbeugung wurde in der vorliegenden Arbeit die photodynamische Wirkung eines Johanniskrautextraktes (Hyperforat®) mit standardisiertem Hypericingehalt auf die Verformbarkeit humaner Erythrozyten untersucht. Die Photosensitierung erfolgte mit Hilfe eines handelsüblichen Gesichtsbrenners, der vorwiegend Licht im UVA-Bereich emittiert.

Aus den vorliegenden in vitro Versuchen konnten folgende Erkenntnisse gezogen werden :

- ◆ Eine UVA-Belichtung von 30 min bei einer Leistungsdichte von 3 mW/cm^2 bewirkt keine Veränderung der Erythrozytenverformbarkeit (Elongationswerte).
- ◆ Die Zugabe von Hyperforat ($0.50 - 15.50 \text{ } \mu\text{mol/l}$) zur Erythrozytensuspension bewirkt keine signifikante Veränderung der gemessenen Elongationswerte, so lange die Proben vor Lichtexposition geschützt werden.
- ◆ Bei dem hier genutzten Versuchsmodell ist der photodynamische Effekt des Hypericins durch eine Senkung des Elongationskoeffizienten [E] bei niedrigen Schubspannungen charakterisiert. Die maximale Verformbarkeit bleibt erhalten. Dieser Effekt läßt sich als eine Störung der Orientierung der Zellen im laminaren Strom interpretieren. In Analogie zu den Effekten hyperosmolarer Lösungen wird postuliert, daß die Photosensitierung durch eine Echinozytose bedingt ist.
- ◆ In desoxygeniertem Blut oder bei Anwesenheit von reduziertem Gluthation ($1.17 \text{ } \mu\text{mol/l}$) ließ sich kein entsprechender photodynamischer Effekt des Hypericins nachweisen.
- ◆ In Hinblick auf mögliche in vivo Photosensitierung wird die Tatsache diskutiert, daß die Transmission der Haut im UVA-Bereich zwar sehr gering ist, so daß nur etwa 20 % des Lichtes die Kapillaren und damit die Erythrozyten erreichen dürften. Da Hypericin als lipophiler Wirkstoff sich in Zellmembranen und intrazellulären Kompartimenten anreichert, ist anzunehmen, daß dies auch für die Erythrozyten zutrifft. Somit ist nicht auszuschließen, daß bei niedrig dosierter Dauertherapie eine Photosensitierung der Erythrozyten mit entsprechenden Veränderungen der Zelleigenschaften eintritt. Da die Flexibilität der Erythrozyten nur geringfügig, die Orientierung im laminaren Strom dagegen deutlich beeinflußt wird, ist eine Störung der Mikroperfusion kaum zu erwarten.

7. Lebenslauf

Familiäre Daten

2. 9. 1954 Renate Wilmanowicz, geboren in Düsseldorf als Tochter der Eheleute Tadeus und Erna Wilmanowicz.
 Seit 1985 Verheiratet mit Rolf Eßer-Wilmanowicz.

Schulbildung

- 1961 – 1965 Grundschulen in Düsseldorf und Herbede,
 1966 – 1975 Gymnasien: Mädchengymnasium Helene-Lange-Schule in Düsseldorf, Internat Schloß Heessen in Hamm/Westfalen (Abitur).

Berufsausbildung/Studium

- 1976 – 1981 Studium Design und Visuelle Kommunikation an der Fachhochschule in Düsseldorf (Staatsexamen als Diplomdesignerin).
 1978 – 1980 Heilpraktikerausbildung in Düsseldorf. Abschlußprüfung im Dezember 1980 am Gesundheitsamt Düsseldorf mit der Erlaubnis der Ausübung der Heilkunde ohne Bestallung.
 1981 – 1983 Ausbildung zum beratenden Psychologen und Psychotherapeuten in Düsseldorf/Köln, Abschlußprüfung in Köln.
 1984 Abschlußprüfung zur Gymnastiklehrerin in Weil am Rhein

- WS 86 – WS 87/88 Studium der Humanbiologie an der Universität Wien
 SS 88 – WS 89/90 Medizinstudium an der Universität Marburg
 SS 90 Physikum an der Ruhr Universität Bochum
 WS 90/91 – SS 91 Medizinstudium an der Universität Essen
 WS 91/92 – SS 95 Medizinstudium an der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

- Mai 1995 3. Staatsexamen

- Famulaturen: Evangelisches Krankenhaus Düsseldorf (Innere Medizin, 4 Wochen).
 Oak Hill Hospital Spring Hill, USA (Chirurgie, Orthopädie, Anästhesie, Pathologie und Radiologie, 6 Wochen).
 Internistische und naturheilkundliche Praxis (Dr. Richter, Düsseldorf, 3 Monate).

Praktisches Jahr (PJ): Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf: Innere Medizin, Hämatologie, Onkologie, Chirurgie, Psychosomatik (Wahlfach).

Ärztin im Praktikum (AiP): Institut für Lasermedizin der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf (7 Monate), Internistisch-naturheilkundliche Praxis Dr. Caratti, Düsseldorf (12 Monate).

- Oktober 1997 Approbation zur Ärztin

Berufliche Tätigkeiten

- Seit 1982 Selbstständige Heilpraktikerin und Gymnastiklehrerin

