

**In vitro Untersuchungen zur Wirkung von  
Phytopharmaka auf die Kontraktilität des  
Mäuse-Ileums:  
Mögliche Bedeutung für die Therapie des  
Reizdarmsyndroms**

**DISSERTATION**

**der Fakultät für Chemie und Pharmazie  
der Eberhard-Karls-Universität Tübingen  
zur Erlangung des Grades eines Doktors  
der Naturwissenschaften**

**2007**

**vorgelegt von**

**DANIELA HAGELAUER**

Tag der mündlichen Prüfung: 25. September 2007

Dekan: Professor Dr. L. Wesemann

1. Berichterstatter: Professor Dr. H. Heinle

2. Berichterstatter: Professor Dr. S. Laufer

## Bisherige Publikationen

D. Hagelauer, O. Kelber, D. Weiser, H. Heinle (2005):

Spasmolytic effects of STW 5 on hydrogen peroxide-induced contractions of mouse ileum in vitro.

Gut 2005; 54, Suppl. VII, A257 (Abstract)

Poster auf der „13th United European Gastroenterology Week“, Copenhagen, Oktober 2005

D. Zhang, D. Hagelauer, G. Drews, D. Weiser, H. Heinle (2006):

Mechanisms of peroxide-induced contractions in mice aorta.

In: Arteriosklerose: Neue Konzepte, Risikofaktoren und Targets. Hrsg: H. Heinle, H. Schulte, A. von Eckardstein. Deutsche Gesellschaft für Arterioskleroseforschung, Tübingen, 176-179.

D. Hagelauer, D. Zhang, O. Kelber, D. Weiser, H. Heinle (2006):

Neurotransmitter-induced effects on motility of ileum from mouse and guinea pig: inhibition by plant extracts.

Acta Physiologica 2006;186, Suppl 1, No.13129 (Abstract)

Poster auf dem 85. Kongress der Physiologischen Gesellschaft, München, März 2006

D. Zhang, G. Drews, D. Weiser, D. Hagelauer, H. Heinle (2006):

Pharmacological characterization of contraction induced by oxidative stress in mice aorta.

Journal of Laboratory Medicine 2006; 30; 5; 334 (Abstract)

Poster auf dem 2. Deutschen Atherosklerose Kongress, Münster, September 2006

D. Hagelauer, O. Kelber, D. Weiser, H. Heinle (2006):

Wirkung von STW 5 (Iberogast<sup>®</sup>) auf die Prostaglandin F<sub>2α</sub>-induzierte Kontraktion des Ileums der Maus in vitro.

Zeitschrift für Phytotherapie 2006; 27, S21 (Abstract)

Poster auf dem Kongress Phytopharmaka und Phytotherapie, Berlin, September 2006

D. Hagelauer, O. Kelber, B. Vinson, D. Weiser, H. Heinle (2006):

Effects of STW 5 on prostaglandin F<sub>2α</sub>-induced contractions of ileum of mice in vitro.

Gut 2006; 55, Suppl. V, A202 (Abstract)

Poster auf der „14th United European Gastroenterology Week“, Berlin, Oktober 2006

H. Heinle, D. Hagelauer, U. Pascht, O. Kelber, D. Weiser (2006):  
Intestinal spasmolytic effects of STW 5 (Iberogast<sup>®</sup>) and its components.  
Phytomedicine 2006, 13, Suppl. V, 75-79

I. Germann, D. Hagelauer, O. Kelber, B. Vinson, S. Laufer, D. Weiser, H. Heinle (2006):  
Antioxidative properties of the gastrointestinal phytopharmaceutical remedy STW 5  
(Iberogast<sup>®</sup>).  
Phytomedicine 2006, 13, Suppl. V, 45-50

D. Hagelauer, O. Kelber, D. Weiser, S. Laufer, H. Heinle (2007): Effekte von Substanz P  
und Neurentensin auf die Kontraktilität des Ileums der Maus in vitro: Inhibition durch  
STW 5.  
Zeitschrift für Gastroenterologie 2007; 45, P 086 (Abstract)  
Poster auf der 62. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Verdauungs- und  
Stoffwechselkrankheiten, Bochum, September 2007

---

<b>1</b>	<b>Einleitung und Fragestellung</b> .....	<b>1</b>
1.1	Ileum der Maus als Modell für pharmakologische Studien .....	1
1.1.1	Anatomie des Ileums .....	1
1.1.2	Physiologie des Ileums .....	2
1.1.2.1	Peristaltik.....	2
1.1.2.2	Enterisches Nervensystem .....	3
1.1.2.3	Kontraktionsmechanismus der glatten Muskulatur .....	4
1.2	Reizdarmsyndrom.....	6
1.2.1	Definition und Symptome .....	6
1.2.2	Ätiologie .....	6
1.2.3	Pathophysiologische Mechanismen.....	7
1.3	Reaktive Sauerstoffspezies und oxidativer Stress .....	9
1.3.1	Glutathionperoxidasen als Teil der antioxidativen Abwehr .....	9
1.4	Therapie mittels Phytopharmaka und Homöopathika.....	11
1.4.1	STW 5 .....	11
1.4.2	Homöopathische Tinkturen.....	14
1.5	Fragestellung.....	15
<b>2</b>	<b>Material</b> .....	<b>16</b>
2.1	Geräte.....	16
2.2	Chemikalien.....	16
2.3	Phytotherapeutika .....	18
2.3.1	STW 5 und seine Einzelextrakte.....	18
2.3.1.1	STW 5 - Varianten .....	19
2.3.1.2	Alkaloidangereicherte Schöllkrautextrakte und die Alkaloidfraktion	20
2.4	Homöopathika .....	21
2.5	Lösungen.....	22
2.5.1	Lösungen zur Messung der Chemilumineszenz .....	23
2.6	Biologische Materialien .....	24
2.6.1	Ileumpräparate der Wildtyp-Maus.....	24
2.6.2	Ileumpräparate der GPx1(-/-)-Maus .....	24
2.6.3	Humane Ileumpräparate .....	25
<b>3</b>	<b>Methoden</b> .....	<b>26</b>
3.1	Kontraktionsmessungen.....	26
3.1.1	Messanordnung zur Darmmotilität .....	26

3.1.2	Spontane Kontraktionen der Ileumpräparate der Wildtyp-Maus.....	27
3.1.3	Durch Neurotransmitter stimulierte Kontraktionen der Ileumpräparate der Wildtyp-Maus.....	29
3.1.4	Durch oxidativen Stress induzierte Kontraktionen der Ileumpräparate der Wildtyp- und der GPx1(-/-)-Maus.....	31
3.1.5	Kontraktionsmessungen humaner Ileumpräparate .....	33
3.2	Messung der Radikalbildung mittels Luminol-vermittelter Chemilumineszenz	34
3.3	Charakterisierung der GPx1(-/-)-Maus .....	35
3.3.1	Genotypisierung: Polymerase-Ketten-Reaktion.....	35
3.3.2	Phänotypisierung: Bestimmung der spezifischen Aktivität der Glutathionperoxidase.....	36
3.4	Statistik .....	39
<b>4</b>	<b>Ergebnisse.....</b>	<b>40</b>
4.1	Untersuchungen am Ileum von Wildtyp-Mäusen .....	40
4.1.1	Spontane Peristaltik und deren Beeinflussung durch Phytotherapeutika und Homöopathika .....	40
4.1.1.1	Spontane Peristaltik .....	40
4.1.1.2	Wirkung von STW 5 und seinen Einzelextrakten .....	40
4.1.1.3	Wirkungen von verschiedenen STW 5-Varianten.....	42
4.1.1.4	Wirkungen von Schöllkrautalkaloiden.....	44
4.1.1.5	Wirkungen von bei Verdauungsbeschwerden eingesetzten Homöopathika .....	45
4.1.2	Stimulierte Kontraktionen und deren Beeinflussung durch Phytopharmaka.....	47
4.1.2.1	Stimulation mit Acetylcholin und Wirkung von STW 5 und seinen Einzelextrakten .....	47
4.1.2.2	Stimulation mit Prostaglandin F <sub>2α</sub> und Wirkung von STW 5 und seinen Einzelextrakten.....	53
4.1.2.3	Stimulation mit Substanz P und Wirkung von STW 5 .....	56
4.1.2.4	Stimulation mit Neurotensin und Wirkung von STW 5 .....	58
4.2	Untersuchungen am Ileum der GPx1(-/-)-Maus.....	61
4.2.1	Einfluss von Phytopharmaka bei oxidativem Stress auf das Kontraktionsverhalten des Ileums .....	61
4.2.1.1	Wirkung der Peroxide.....	61
4.2.1.2	Wirkung von STW 5 und Einzelextrakten auf die Peroxid-vermittelten Effekte .....	65
4.2.2	Einfluss von STW 5 auf die Radikalproduktion bei oxidativem Stress.....	69
4.2.2.1	Einfluss von STW 5 auf die H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> -induzierte Radikalbildung.....	69
4.2.2.2	Einfluss von STW 5 auf die tBHP-induzierte Radikalbildung.....	71

---

4.3	Untersuchungen an humanen Ileum-Präparaten .....	73
4.3.1	Einfluss von STW 5 auf die spontane Kontraktilität .....	73
4.3.2	Einfluss von STW 5 auf stimulierte Kontraktionen .....	74
4.3.2.1	Stimulation mit Acetylcholin und Wirkung von STW 5 .....	74
4.3.2.2	Stimulation mit Histamin und Wirkung von STW 5.....	75
4.3.3	Einfluss von STW 5 auf die Radikalproduktion.....	76
<b>5</b>	<b>Diskussion.....</b>	<b>77</b>
5.1	Wahl des Untersuchungsmodells .....	77
5.2	Wirkungen der Phytotherapeutika und Homöopathika auf die spontane Peristaltik .....	78
5.3	Wirkungen der Phytotherapeutika auf induzierte Kontraktionen .....	83
5.3.1	Stimulation mit Acetylcholin und Wirkung von STW 5 und seinen Einzelextrakten .....	83
5.3.2	Stimulation mit Prostaglandin F <sub>2α</sub> und Wirkung von STW 5 und seinen Einzelextrakten .....	85
5.3.3	Stimulation mit Substanz P und Wirkung von STW 5 .....	86
5.3.4	Stimulation mit Neurotensin und Wirkung von STW 5 .....	88
5.4	Wirkungen der Phytotherapeutika auf oxidativen Stress und Darmperistaltik. 90	
5.4.1	Oxidativer Stress und reaktive Sauerstoffspezies.....	90
5.4.2	Wirkung von STW 5 auf die Peroxid-stimulierte ROS-Bildung .....	92
5.4.3	Wirkung von STW 5 und seinen Einzelextrakten auf die Peroxid-stimulierte Kontraktilität.....	94
5.5	Wirkungen der Phytotherapeutika in humanen Ileum-Präparaten .....	98
5.6	Therapie mittels Phytotherapeutika beim Reizdarmsyndrom .....	100
<b>6</b>	<b>Zusammenfassung.....</b>	<b>101</b>
<b>7</b>	<b>Literaturverzeichnis.....</b>	<b>105</b>

### Abkürzungsverzeichnis

ACh	Acetylcholin
Ang	Angelikawurzel
BSA	Bovines Serumalbumin
Bsc	N-Butylscopolaminbromid
Cham	Chamomilla
Colo	Colocynthis
DNA	Desoxyribonukleinsäure
ENS	Enterisches Nervensystem
GIT	Gastrointestinaltrakt
GPx	Glutathionperoxidase
GPx1-KO	Glutathionperoxidase1 Knock-Out
GSH	Glutathion
GSH-Red.	Glutathion-Reduktase
GSSG	Glutathiondisulfid
His	Histamin
HPLC	Hochleistungsflüssigkeitschromatographie
Ibe	Iberis amara
Kam	Kamille
Küm	Kümmel
Lyco	Lycopodium
Mar	Mariendistel
Mel	Melisse
MW	Mittelwert
NADPH	Nicotinsäureamid-Adenin-Dinucleotid-Phosphat
NT	Neurotensin
Pap	Papaverin
PCR	Polymerase Kettenreaktion



Pfe	Pfefferminz
PGF <sub>2α</sub>	Prostaglandin F <sub>2α</sub>
RDS	Reizdarmsyndrom
RLU	relative Lightunits
ROS	Reaktive Sauerstoffspezies
Schö	Schöllkraut
SD	Standardabweichung
SP	Substanz P
Süß	Süßholzwurzel
<i>t</i> BHP	<i>tertiär</i> -Butylhydroperoxid
WT	Wildtyp
ZNS	Zentrales Nervensystem



# 1 Einleitung und Fragestellung

## 1.1 Ileum der Maus als Modell für pharmakologische Studien

Für pharmakologische Untersuchungen am Gastrointestinaltrakt ist man zur Beurteilung der Wirksamkeit verschiedener Medikamente auf Tiermodelle angewiesen. Hieraus gewonnene Erkenntnisse können häufig auf den Menschen übertragen werden. In der Vergangenheit wurden Organpräparate überwiegend von Kaninchen und Meerschweinchen für Messungen der Darmkontraktilität verwendet. Zunehmend wird jedoch auch die Maus als geeignetes Tiermodell eingesetzt. Einerseits weil für diese Spezies eine große vegetative Reagibilität beschrieben wird, andererseits sind bei der Maus genetische Veränderungen vergleichsweise leicht möglich, da die genomische Sequenz der Maus, die Ähnlichkeiten zu der des Menschen aufweist, bereits entschlüsselt wurde [Bradley 2002; Waterston et al., 2002].

Da das Reizdarmsyndrom als Erkrankung den gesamten Dün- und Dickdarm betreffen kann, wählten wir für unsere Versuche das terminale Ileum, dessen Anatomie und Physiologie im nächsten Kapitel näher beschrieben werden.

### 1.1.1 Anatomie des Ileums

Die Darmwand besteht aus fünf Schichten. Von innen nach außen sind dies die Tunica mucosa, die Tela Submucosa, die Tunica muscularis, die Tunica adventitia und die Tunica serosa.

Die in der Tunica mucosa vorkommende Lamina muscularis mucosae und die Tunica muscularis sind als Schichten glatter Muskelzellen für die Peristaltik notwendig. Die Tunica muscularis gliedert sich aufgrund ihres jeweiligen Verlaufs in das Stratum circulare und das Stratum longitudinale. Zwischen dieser Ring- und Längsmuskulatur liegt das enterische Nervensystem mit den Plexus myentericus (P. Auerbach) und submucosus (P. Meissner). Der P. myentericus steuert insbesondere die Motilität und Peristaltik durch Innervation der glatten Muskelzellen, der P. submucosus innerviert dagegen die Lamina muscularis mucosae, führt zu gleichmäßiger Bewegung der Darmzotten, dadurch zu verstärkter Peristaltik, und reguliert die Sekretion der Drüsen in der

Darmwand.

In der Mukosa, Submukosa und Serosa ist der größte Teil der zellulären Komponenten des intestinalen Immunsystems, wie intestinale Makrophagen und Lymphozyten lokalisiert. Insbesondere im Ileum sind Ansammlungen von Lymphfollikeln in Peyer-Plaques in der Tunica mucosa, vor allem in der Lamina propria, und der Submukosa organisiert. Diese sind ebenfalls Teil des darmassoziierten Immunsystems.

### **1.1.2 Physiologie des Ileums**

#### **1.1.2.1 Peristaltik**

Die für die Durchmischung des Speisebreis mit den Verdauungsenzymen und für dessen Weitertransport notwendige Peristaltik des Darms wird über myogene, reflektorische und zentrale Mechanismen gesteuert.

Auf der Ebene der glatten Muskelzellen findet man spezielle Schrittmacherzellen, so genannte interstitielle Cajal-Zellen, die rhythmisch überschwellige Depolarisationen, d.h. Aktionspotentiale, unabhängig von externen Nervenimpulsen auslösen (slow waves). Diese Depolarisationen breiten sich in aboraler Richtung aus, wodurch ein basaler elektrischer Rhythmus entsteht, der im humanen Ileum mit einer Frequenz von ca.  $8 \text{ min}^{-1}$  zu entsprechenden Kontraktionen führt.

Reflektorisch wird die Peristaltik dadurch beeinflusst, dass, ausgelöst durch bestimmte Reize, wie z.B. mechanische Dehnung des Darms, lokale Reflexbögen innerhalb des ENS aktiviert werden (siehe Kap. 1.1.2.2).

Vom zentralen Nervensystem aus greifen über den Nervus vagus und parasympathische Nervengeflechte sowie über sympathische Fasern des Plexus thoracolumbalis Mechanismen in die Steuerung der Motilität ein, die die Funktionen des ENS modulieren (siehe Kap. 1.1.2.2) und die Konzentration motilitätswirksamer Peptide (z.B. Substanz P, Neurotensin, Motilin, Gastrin) verändern können. Allerdings muss berücksichtigt werden, dass aus dem Darmtrakt wesentlich mehr afferente Bahnen zum ZNS ziehen als umgekehrt, so dass auch eine Beeinflussung zentraler Regelzentren durch afferente Reize angenommen werden kann.

Man kann zwischen phasischen und tonischen Kontraktionen der glatten

Darmmuskulatur unterscheiden. Die phasische Peristaltik besteht aus propulsiven, nicht propulsiven und retrograden Kontraktionen. Bei der propulsiven Peristaltik handelt es sich um ringförmig einschnürende Kontraktionen, die dem Weitertransport des Darminhalts dienen. Sie beruhen einerseits auf dem Eigenrhythmus der Muskulatur und auf lokalen Reflexen, innerviert durch das ENS, andererseits können die Kontraktionen durch parasymphatische Aktivität gefördert werden. Im Gegensatz dazu dient die nicht propulsive Peristaltik insbesondere der Durchmischung des Chymus, durch lokale ringförmige Kontraktionswellen entstehen so genannte Segmentierungen. Die retroulsive Peristaltik tritt beim Menschen physiologischerweise nur im Dickdarm auf, wo sie der Stuhlspeicherung dient.

Die phasischen Kontraktionen führen zu Pendelbewegungen, die dadurch entstehen, dass während die Längsmuskulatur eines Darmabschnittes kontrahiert, der benachbarte Abschnitt relaxiert. Dies fördert ebenfalls die Durchmischung des Chymus.

Die tonische Kontraktion ist stationär und es kommt zur Bildung so genannter digestiver Sphinkteren. Hierdurch entstehen intestinale Kompartimente, in denen verschiedene Verdauungsvorgänge nebeneinander ablaufen können.

### **1.1.2.2 Enterisches Nervensystem**

Das enterische Nervensystem (ENS) ist Teil des vegetativen Nervensystems und steuert weitgehend eigenständig Funktionen wie die gastrointestinale Motilität, die Vermittlung des peristaltischen Reflexes, die Sekretion und die Resorption, die Durchblutung der Schleimhaut sowie die Immunabwehr. Die im Plexus myentericus zwischen Ring- und Längsmuskelschicht und Plexus submucosus in der Submukosa angeordneten Nervengeflechte durchziehen den gesamten GIT und enthalten mit ca.  $10^{10}$  Neuronen etwa genauso viele Nervenzellen wie das Rückenmark.

Gemäß ihren Aufgaben, unterscheidet man drei Arten von Neuronen: Die sensorischen afferenten Neurone nehmen Reize aus dem Darm über Chemo-, Mechano- und Thermorezeptoren auf und projizieren diese an Interneurone des ENS und an das ZNS. Die Interneurone stehen, quasi als periphere Reflexzentren, unter Kontrolle von Steuerzentren, die im Hypothalamus und in der Medulla oblongata lokalisiert sind, und

innervieren über die viszerale Motoneurone die glatte Muskulatur des GIT. Dabei werden Neurotransmitter mit muskelkontrahierender (wie z.B. ACh, Serotonin, Substanz P) oder muskelrelaxierender (bspw. Neurotensin, VIP, NO) Wirkung freigesetzt.

Die genannten Steuerzentren im ZNS stehen über Parasympathikus und Sympathikus mit dem ENS in Verbindung. So enden parasymphatische postganglionäre Fasern an Ganglienzellen und Interneuronen direkt an den Organen des GIT. Eine Reizung des Parasympathikus führt zu einer Erregung der glatten Muskulatur und damit zu einer gesteigerten Motilität und Sekretion.

Die postganglionären sympathisch innervierten Neurone hemmen die Erregungsübertragung an den exzitatorischen Nervenzellen und damit die Peristaltik, aber aktivieren die glatte Sphinktermuskulatur.

### **1.1.2.3 Kontraktionsmechanismus der glatten Muskulatur**

Die für die Kontraktion verantwortlichen Myofilamente sind innerhalb der glatten Muskelzellen ungleichmäßig angeordnet und durch so genannte „dense bodies“ und subsarkolemmale „dense plaques“ miteinander verbunden.

Obwohl auch in der glatten Muskulatur der Kontraktionsmechanismus direkt durch die intrazelluläre  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration reguliert wird, gibt es im Vergleich zum Skelettmuskel einige charakteristische Unterschiede. Diese sind zunächst in den Mechanismen der  $\text{Ca}^{2+}$ -Aktivierung zu finden: Einerseits gibt es, wie im Skelettmuskel, eine elektromechanische Kopplung, bei der durch Aktionspotentiale aktivierte  $\text{Ca}^{2+}$ -Kanäle einen  $\text{Ca}^{2+}$ -Einstrom vom Extrazellulärraum ermöglichen. Daneben spielen auch pharmakomechanische Kopplungen über durch Neurotransmitter und Second Messenger aktivierte Signalkaskaden eine große Rolle, wodurch  $\text{Ca}^{2+}$  über G-Proteingekoppelte Rezeptoren bzw. aus dem sarkoplasmatischen Retikulum freigesetzt wird.

Ein weiterer wichtiger Unterschied liegt in der Interaktion der Querbrücken-bildenden Filamente. In der glatten Muskulatur führt die  $\text{Ca}^{2+}$ -Aktivierung über Bildung des  $\text{Ca}^{2+}$ -Calmodulin-Komplexes zur Phosphorylierung der Myosin-Leichten-Ketten, wodurch deren ATPase-Aktivität und der Querbrückenmechanismus an die Aktinfilamente induziert werden.

Zu einer Abnahme des Tonus der glatten Muskulatur kommt es, sobald der intrazelluläre  $\text{Ca}^{2+}$ -Spiegel auf Werte unter  $10^{-7}$  mol/l sinkt, wodurch die Bildung des  $\text{Ca}^{2+}$ -Calmodulin-Komplexes abnimmt. Phosphat wird durch eine Phosphatase von den leichten Ketten der Myosinköpfe abgespalten, der Aktomyosin-Komplex wird nicht mehr gebildet bzw. dissoziiert zu Aktin und Myosin und ermöglicht die Relaxation.

## **1.2 Reizdarmsyndrom**

### **1.2.1 Definition und Symptome**

Das Reizdarmsyndrom (RDS) stellt eine der häufigsten Erkrankungen des Gastrointestinaltrakts (GIT) dar. Weltweit leiden ca. 10-20 % der Bevölkerung an RDS, in Deutschland 15-22 % [Hauser and Lempa 2004], wobei eine dreimal höhere Prävalenz bei Frauen zu finden ist.

RDS ist definiert als eine funktionelle Darmerkrankung mit vielfältigen Symptomen, die sowohl einzeln als auch gemeinsam auftreten können. Dazu gehören Beschwerden und Schmerzen des Abdomens, begleitet von Krämpfen, Völlegefühl und Blähungen, Diarrhö oder Obstipation. Des Weiteren findet man sehr häufig eine gesteigerte Schmerzwahrnehmung auf Dehnungsreize im Darm-Trakt und eine erhöhte oder gehemmte Peristaltik sowohl bei Nüchternheit als auch nach Nahrungsaufnahme.

Nach den neusten ROM III-Kriterien (Mai 2006) der American Gastroenterological Association kann die Erkrankung RDS diagnostiziert werden, wenn der Patient die auftretenden Symptome länger als sechs Monate beobachten konnte und diese für mindestens drei Tage pro Monat über einen zusammenhängenden Zeitraum von wenigstens drei Monaten präsent sind [Drossman and Dumitrascu 2006]. Anhand einer Klassifizierung der Stuhlkonsistenz können verschiedene Subtypen unterschieden werden [Longstreth et al., 2006].

Als Voraussetzung für die positive Diagnose „Reizdarmsyndrom“ müssen organische Erkrankungen als Ursache für das Beschwerdebild ausgeschlossen werden.

### **1.2.2 Ätiologie**

Das RDS gilt als multifaktorielle Erkrankung, deren Pathomechanismus noch nicht vollständig geklärt ist. Vor allem eine gestörte Motilität und Veränderungen der Peristaltik können das Krankheitsbild hervorrufen. Aber auch vorangegangene bakterielle Darminfektionen und inflammatorische Prozesse werden bei RDS-Patienten häufig beobachtet. Stresssituationen können die Symptome möglicherweise auslösen oder negativ beeinflussen. Ein weiterer Hintergrund der Erkrankung können Veränderungen der afferenten Verarbeitung, verbunden mit einer Modulation der



reflektorischen Steuerung, sein. Unter anderem wird auch eine viszerale Hypersensibilität gefunden, die auf eine zentrale Störung der Schmerzverarbeitung im Gehirn und eine gestörte Interaktion zwischen cerebraler und spinaler Ebene zurückzuführen ist. Ferner wird ein Zusammenhang von RDS und psychosozialen Faktoren bzw. genetischer Disposition diskutiert [Musial and Enck 1996].

### **1.2.3 Pathophysiologische Mechanismen**

Verschiedene Pathomechanismen werden mit der Entstehung des RDS in Zusammenhang gebracht.

Die „Motilitätshypothese“ beruht auf der Annahme, dass die primäre Störung in einer veränderten Motilität und Kontraktilität besteht. Diese könnte durch Nahrungsaufnahme [Rogers et al., 1989], Stresssituationen [Musial 2002] oder eine allgemein erhöhte Reaktivität des autonomen Nervensystems [Fukudo et al., 1993] bedingt sein. Da ein allgemeingültiges, reizdarmspezifisches Motilitätsmuster jedoch nicht definiert werden kann, wurde die These erweitert.

Die „Hypersensibilitätshypothese“ beschreibt eine erhöhte Empfindlichkeit bzw. eine erniedrigte Toleranzschwelle der RDS-Patienten für intestinale Dehnungsreize, die aufgrund einer gestörten Verarbeitung afferenter Impulse zu gesteigerter Wahrnehmung intestinaler Kontraktionen führen können. Damit einhergehend soll eine reflektorisch gesteigerte Motilität vorliegen [Gebhart 2000; Mertz et al., 1995]. Offensichtlich spielt hier auch die „brain-gut axis“, durch die Wechselbeziehungen zwischen Darm und ZNS vermittelt werden, eine wichtige Rolle [Mayer et al., 2000; Silverman et al., 1997; Talley 2006].

Des Weiteren rückt die „Entzündungshypothese“ zunehmend in den Fokus der Untersuchungen, da sie sowohl mit einer gestörten Darmmotilität als auch mit einer veränderten Funktion des ENS einhergeht. Im Inflammationsgeschehen konnte einerseits in Tierexperimenten gezeigt werden, dass lokale Entzündungen zu einer Sensibilisierung viszeraler Afferenzen und einer Vergrößerung der rezeptiven Felder der Rückenmarksneurone führen können [Gebhart 2000; Mayer and Gebhart 1994]. Andererseits wird auch der Zusammenhang zwischen dem Auftreten des RDS und zeitlich vorangegangenen gastrointestinalen Infektionen [Tornblom et al., 2007] diskutiert.

Akiho et al. [2005] stellten dazu die Hypothese auf, dass die postinfektiöse Hyperkontraktilität aus einer erhöhten Präsenz immunaktiver Zellen resultiert, die wiederum zu einer vermehrten Expression von COX-2 und Bildung von Prostaglandinen und damit zu einer verstärkten Erregbarkeit der glatten Muskelzellen führen. Aber nicht nur die Kontraktilität scheint postinfektiös betroffen. Spiller et al. fanden nach vorangegangener *Campylobacter*-Enteritis neben einem Anstieg der enterochromaffinen Zellen und der T-Lymphozyten eine erhöhte Permeabilität der Darmwand [Chadwick et al., 2002; Spiller et al., 2000]. Diese Faktoren könnten das postinfektiöse RDS fördern.

In der Inflammationsreaktion sind pathophysiologisch auch Reaktive Sauerstoffspezies (ROS) von großer Bedeutung. Sie können als Stressoren zu Veränderungen der Zellfunktionen führen und dadurch unter anderem Motilität und Kontraktilität, mukosale Durchblutung und Sekretion beeinflussen. In dieser Arbeit liegt daher ein Schwerpunkt auf der Untersuchung der Zusammenhänge zwischen oxidativem Stress, ROS und der Darmkontraktilität, u.a. auch durch Verwendung von Ileumpräparaten aus Mäusen, bei denen das Enzym Glutathionperoxidase1 (GPx1) ausgeknockt war. Daher wird im nächsten Kapitel auf ROS und oxidativen Stress eingegangen, bevor die therapeutischen Ansätze beschrieben werden.

### 1.3 Reaktive Sauerstoffspezies und oxidativer Stress

Zu den reaktiven Sauerstoffspezies zählen radikalische Substanzen, wie das Hydroxylradikal ( $\cdot\text{OH}$ ), das Superoxidradikal ( $\text{O}_2^{\cdot-}$ ) und Peroxylradikale ( $\text{ROO}\cdot$ ), und nicht radikalische Verbindungen wie Wasserstoffperoxid ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ) oder die Hypochlorsäure ( $\text{HOCl}$ ).

ROS entstehen im Körper sowohl endogen, z.B. in der mitochondrialen Atmungskette oder in der NADPH-Oxidase-Reaktion, als auch exogen durch Umwelteinflüsse wie z.B. Chemikalien und Arzneimittel. Auch bei inflammatorischen Erkrankungen werden im Körper vermehrt Radikale gebildet. Entsteht dadurch ein Ungleichgewicht zwischen der Bildung reaktiver Sauerstoffspezies und ihrer Entgiftung in Richtung einer erhöhten ROS-Konzentration, spricht man von oxidativem Stress [Kohen and Nyska 2002].

Entzündungsprozesse sind durch ein vermehrtes Auftreten proinflammatorisch wirksamer Mediatoren wie zum Beispiel Zytokine, Prostaglandine und Leukotriene gekennzeichnet und gehen mit Aktivierung der beteiligten Zellen einher [Katz et al., 1999; Laufer 2003; Schreiber et al., 1992]. ROS werden in diesem Geschehen vermehrt freigesetzt, einerseits um beispielsweise Bakterien abzuwehren, andererseits entstehen sie als Nebenprodukte bei der Prostaglandin-Bildung. Des Weiteren haben ROS eine Signalwirkung, indem sie unter anderem Transkriptionsfaktoren und inflammatorische Gene aktivieren und Protein-Tyrosin-Phosphatasen inaktivieren [Chapple 1997; Di Virgilio 2004].

#### 1.3.1 Glutathionperoxidasen als Teil der antioxidativen Abwehr

Die Zellen können über verschiedene Mechanismen oxidative Schäden verhindern bzw. reparieren. Die antioxidative Abwehr wird dabei sowohl durch nicht enzymatische als auch durch enzymatische Prozesse realisiert. Zu den nicht enzymatischen Antioxidantien zählen u.a. die Vitamine C, A und E, aber auch das Tripeptid Glutathion (GSH). Zur Gruppe der enzymatischen Antioxidantien gehören u.a. die Glutathionperoxidase (GPx), die Superoxid-Dismutase (SOD) und die Katalase. Die SOD katalysiert die Entgiftung der Superoxidradikale. Bei dieser Reaktion wird durch Disproportionierung Wasserstoffperoxid und Sauerstoff gebildet. Die Katalase reguliert

neben der GPx die  $\text{H}_2\text{O}_2$ -Konzentration, indem sie  $\text{H}_2\text{O}_2$  durch Disproportionierung zu Sauerstoff und Wasser umsetzt.

Die Glutathionperoxidasen sind Selenoproteine, die organische und anorganische Hydroperoxide unter Verbrauch von Glutathion oder einem anderen Thiol in die entsprechenden Hydroxyverbindungen reduzieren können. Fünf GPx-Isoenzyme wurden bisher näher beschrieben: die zytosolische GPx (GPx1), die gastrointestinale GPx (GPx2), die plasmatische GPx (GPx3), die Phospholid-Hydroperoxid GPx (GPx4a) und die in späten Spermatischen kernlokalisierte GPx (GPx4b).

Ho et al. [1997] konnten zeigen, dass die GPx1 den größten Beitrag an der GPx-Aktivität im Gewebe liefert. Messungen mit GPx1-defizienten Mäusen führten zu dem Ergebnis, dass diesem Enzym eine bedeutende Rolle im Schutz vor oxidativen Zellschäden zukommt [Flentjar et al., 2002]. Fehlt dieses Enzym, tritt vermehrt durch ROS hervorgerufener oxidativer Stress auf, der im Gefäßsystem mit einer endothelialen Dysfunktion verbunden ist [Forgione et al., 2002].

## 1.4 Therapie mittels Phytopharmaka und Homöopathika

Die derzeitige Therapie des Reizdarmsyndroms richtet sich nach den jeweiligen Leitsymptomen, da aufgrund des ungeklärten Pathomechanismus keine kausale Therapie zur Verfügung steht. So werden je nach Beschwerden u.a. Spasmolytika, Antidiarrhoika, Laxantien, Karminativa und Probiotika eingesetzt. Des Weiteren laufen derzeit klinische Studien mit Opioid-Agonisten und Serotonin-Antagonisten und -Agonisten [Hansen 2003], sowie Untersuchungen zu möglichen Neurokinin-Rezeptor-Antagonisten [Herbert and Holzer 2002b]. Dabei erweist sich jedoch vor allem die gezielte Wirkung an den spezifischen Rezeptoren als schwierig. In den USA wurde erst im April diesen Jahres dem 5-HT<sub>3</sub>-Rezeptor-Antagonist Tegaserod aufgrund schwerer kardiovaskulärer Nebenwirkungen die Zulassung entzogen [Thompson 2007].

Daher stellen pflanzliche Mehrkomponenten-Präparate eine sehr gute Alternative dar. Die darin enthaltenen Arzneipflanzenextrakte bieten ein breites Wirkspektrum im Sinne einer Multi-Target-Therapie [Wagner 2006]. Zudem kann das Risiko von Nebenwirkungen aufgrund einer geringeren Dosierung der einzelnen Extrakte deutlich gesenkt werden. Darüber hinaus werden auch homöopathische Arzneimittel als Monosubstanz oder in Komplexpräparaten in der Therapie des RDS eingesetzt. Seitens der Patienten spielt sowohl die Phytotherapie als auch die Homöopathie durch eine hohe Compliance und vergleichsweise geringe Kosten eine wichtige Rolle.

Da in der vorliegenden Arbeit Wirkungen von Iberogast<sup>®</sup> und seinen Einzelextrakten sowie von homöopathischen Tinkturen untersucht wurden, sollen diese Pharmaka in den folgenden Abschnitten näher beschrieben werden.

### 1.4.1 STW 5

STW 5 (Iberogast<sup>®</sup>) ist ein Kombinationspräparat, das bei funktionellen Beschwerden des Gastrointestinaltrakts eingesetzt wird, und aus alkoholischen Auszügen aus der Frischpflanze *Iberis amara* und acht Drogen besteht: Pfefferminzblätter, Kamillenblüten, Süßholzwurzel, Angelikawurzel, Kümmelfrüchte, Mariendistelfrüchte, Melissenblätter und Schöllkraut. Die beschriebenen Wirkungen der Einzelextrakte auf den Gastrointestinaltrakt sind sehr vielfältig und in Tab. 1 zusammengefasst dargestellt.

In verschiedenen Studien konnten bereits motilitätsmodulierende Effekte für die

pflanzlichen Extrakte und teilweise auch für einzelne isolierte Inhaltsstoffe auf den GIT des Meerschweinchens und der Ratte gezeigt werden. [Ammon et al., 2006; Gharzouli and Holzer 2004; Hammad and Abdalla 1997; Heinle et al., 2006; Nahde and Murad 2004; Schemann et al., 2006; Wegener and Wagner 2006].

Im Entzündungsgeschehen scheint STW 5 ebenso eine Rolle zu spielen: antioxidative radikalfangende Eigenschaften konnten in verschiedenen Modellen gezeigt werden [Germann et al., 2006; Schempp et al., 2006]. Die viszerale Hypersensitivität als ein diskutierter pathophysiologischer Mechanismus der funktionellen Störungen konnte unter Behandlung mit STW 5 gesenkt werden [Muller et al., 2006].

Des Weiteren wurde anhand experimenteller Untersuchungen an der Ratte eine ulcusprotektive Wirkung für STW 5 beschrieben, die mit einer erhöhten Bildung des schleimhautschützenden Prostaglandin E<sub>2</sub> und einer verminderten Produktion an Magensäure einhergeht [Khayyal et al., 2006]. Bislang wenig untersucht sind die Effekte im Mausmodell.

Extrakt aus	Wirkung im GIT
Pfefferminzblätter (Menthae pip. folium)	spasmolytisch, antioxidativ, karminativ, antiphlogistisch
Kamillenblüten (Matricariae flos)	antiphlogistisch, antioxidativ, spasmolytisch, karminativ, ulcusprotektiv
Süßholzwurzel (Liquiritiae radix)	spasmolytisch, ulcusprotektiv, antioxidativ, antiphlogistisch
Angelikawurzel (Angelicae radix)	spasmolytisch, karminativ, antiphlogistisch, fördert die Magensaftsekretion
Kümmelfrüchte (Carvi fructus)	karminativ, spasmolytisch, antiphlogistisch, antioxidativ
Mariendistel Früchte (Cardui mariae fructus)	antioxidativ, antidyspeptisch, cytoprotektiv in Leber und Magen
Melissenblätter (Melissae folium)	spasmolytisch, antioxidativ, beruhigend
Schöllkraut (Chelidonii herba)	spasmolytisch, cholekinetisch, choloretisch, antiphlogistisch
Bittere Schleifenblume (Iberis amara)	prokinetisch, tonisierend an glatter relaxierter, intestinaler Muskulatur

Tab. 1: Wirkungen der Einzextrakte aus STW 5 auf den GIT [Germann et al., 2006; Heinle et al., 2006; Hohenester et al., 2004; Khayyal et al., 2006; Reichling and Saller 2002; Saller et al., 2002; Wegener and Wagner 2006]

### 1.4.2 Homöopathische Tinkturen

Die bekannten Grundprinzipien der klassischen Homöopathie, nämlich das Ähnlichkeitsprinzip („similia similibus curentur“) und die Potenzierung bzw. Dynamisierung, wurden in dieser Arbeit außer Acht gelassen. Es sollte hier nur der Frage nachgegangen werden, welche Wirkungen verschiedene homöopathische Tinkturen auf die spontane Kontraktilität des Mäuse-Ileums ausüben. Dafür wurden die in Tab. 2 genannten Homöopathika aufgrund ihrer Verwendung als Monosubstanz und in Komplexpräparaten mit Anwendungsgebieten im Bereich der Magen-Darm-Erkrankungen ausgewählt. Homöopathische Arzneimittel, die Chamomilla, Colocynthis, Ignatia, Lachesis oder Asa foetida enthalten, werden bevorzugt bei gastrointestinalen Beschwerden eingesetzt, die von „Krämpfen und spastischen Störungen“ begleitet sind. Demgegenüber wird für Präparate, die Lycopodium oder Magnesium chloratum beinhalten, eine allgemeine „Verdauungsschwäche“ als Indikation genannt.

<b>Substanz</b>	<b>Anwendung im GIT bei folgenden Beschwerden</b>
Asa Foetida Urtinktur	Nervöse Störungen der Verdauungswege, Darmträgheit
Chamomilla Urtinktur	Entzündungen und Krämpfe der Verdauungsorgane, Meteorismus, Diarrhö
Colocynthis Urtinktur	Schmerzhafte Krämpfe des Magen-Darm-Kanals und des Gallensystems, Meteorismus
Ignatia Urtinktur	Nervöse Störungen, Krämpfe und Spasmen
Lachesis D4	Krämpfe, Infektionen
Lycopodium Urtinktur	Verdauungsschwäche, Entzündungen im Darm, Leberstörungen
Magn. chlorat. Urtinktur	Verdauungsschwäche, Obstipation

Tab. 2: Anwendungsgebiete der hier eingesetzten Homöopathika im GIT [Boericke 2004]



## 1.5 Fragestellung

Ausgehend einerseits von der Vorstellung, dass das Reizdarmsyndrom letztlich in einer gestörten Peristaltik bzw. Kontraktilität des Dünndarms besteht, (wobei offensichtlich Entzündungsmechanismen und damit oxidativer Stress von wesentlicher Bedeutung sind), andererseits von der praktischen Erfahrung aus der Apotheke, dass die Therapie solcher chronischen Erkrankungen vor allem mit phytotherapeutischen Mitteln eine hohe Compliance aufweist, sollten an normalen Mäusen folgende Untersuchungen durchgeführt werden:

- 1) Charakterisierung der Effekte von STW 5 und seinen Einzelkomponenten auf die spontane Peristaltik. Neben Dosis-Wirkungs-Beziehungen sollten auch mögliche synergistische Effekte untersucht werden.
- 2) Charakterisierung der Effekte ausgewählter homöopathischer Tinkturen auf die spontane Peristaltik.
- 3) Charakterisierung der Effekte von STW 5 auf die durch Modulatoren (Acetylcholin, Prostaglandin  $F_{2\alpha}$ , Substanz P und Neurotensin) erzielten Veränderungen der Peristaltik.

Des Weiteren sollten unter der Annahme, dass Entzündungen und damit oxidativer Stress pathophysiologisch für das Reizdarmsyndrom eine wichtige Rolle spielen, Untersuchungen am Ileum von GPx1(-/-)-Mäusen durchgeführt werden, bei denen gestörte Peroxidstoffwechsel und oxidativer Stress erwartet werden können.

- 4) Charakterisierung der Effekte von STW 5 und seinen Einzelkomponenten auf Peroxid-stimulierte Kontraktilität in Wildtyp- und KO-Tieren
- 5) Charakterisierung der Effekte von STW 5 auf Peroxid-stimulierte ROS-Bildung in Wildtyp- und KO-Tieren
- 6) Letztlich sollten orientierende Versuche an humanen Ileumpräparaten durchgeführt werden, um die Ergebnisse der Untersuchungen am Maus-Modell besser bewerten zu können.

## **2 Material**

### **2.1 Geräte**

Biophotometer, Eppendorf, Hamburg

Digital pH-Meter Typ 643-1, Knick, Berlin

Kraftaufnehmer SG3-0.25 SWEMA, Stockholm

Luminometer TD-20/20, Turner Designs, Promega, Mannheim

Thermocycler, Mastercycler, Eppendorf, Hamburg

Messkraftverstärker MGCplus, Hottinger Baldwin Messtechnik, Darmstadt

Metallblockthermostat DRI-Block® DB-3D, Techne, England

Operationsbinokular mit Beleuchtungseinheit, Zeiss, Oberkochen

Perfusionskammer mit Messeinrichtung zur Untersuchung der Darmkontraktion,  
Physiologisches Institut, Universität Tübingen

Stativpumpe ISM 853 Ismatec, Glattbrugg-Zürich

Thermometer HI 8314 Membrane pH-Meter HANNA-Instruments, Roth, Karlsruhe

Thermo-Spectrometer, Genesys6, Rochester, USA

Thermostat Colora, Lorch

Vortex-Genie, Bender & Hobein, Zürich, Schweiz

Waage AC 100, Mettler, Gießen

Waage BP 121 S, Sartorius, Göttingen

Zentrifuge Hettich EBA 3S, Hettich, Tuttlingen

### **2.2 Chemikalien**

Acetylcholinhydrochlorid, Sigma, Steinheim

Agarose, Biomol, Hamburg

Rinderserumalbumin (BSA), Sigma, St.Louis

Bio-RAD-Reagenz Coomassie Brilliant Blue G250, Bio-Rad Laboratories GmbH, München

Calciumchlorid-Dihydrat, Roth, Karlsruhe

Dikaliumhydrogenphosphat, Merck, Darmstadt

Dimethylsulfoxid, Sigma, Steinheim

Dinatriumhydrogenphosphat-Dihydrat, Merck, Darmstadt

Ethanol absolut zur Analyse, Merck, Darmstadt

Ethidiumbromid, Roth, Karlsruhe

Etylendiamintetraessigsäure, Sigma, Steinheim

Glucose-Monohydrat, Roth, Karlsruhe

Glutathion Reductase, Sigma, Steinheim

HEPES, Roth, Karlsruhe

Histamindihydrochlorid, Sigma, Steinheim

Kaliumchlorid, Roth, Karlsruhe

Kaliumdihydrogenphosphat, Roth, Karlsruhe

L-Glutathion reduziert, Sigma, Steinheim

Luminol, Merck, Darmstadt

Magnesiumsulfat-Heptahydrat, Roth, Karlsruhe

Natriumchlorid, Merck, Darmstadt

Natriumdihydrogenphosphat-Monohydrat, Merck, Darmstadt

Natriumhydroxid, Merck, Darmstadt

N-Butylscopolaminbromid, Sigma, Steinheim

Neurotensin, Sigma, Steinheim

Nicotinamidadenindinukleotidphosphat reduziert, Sigma, Steinheim

NucleoSpin® Tissue Kit, Macherey-Nagel, Düren

Papaverin, Sigma, Steinheim

Prostaglandin F<sub>2α</sub> TrisSalt, Sigma, Steinheim

Protein Assay, Bio-Rad Labor GmbH, München

Salzsäure, Merck, Darmstadt

Substanz P Acetate Salt Hydrate, Bachem, Bubendorf, Schweiz

*tertiär*-Butylhydroperoxid, Merck, Darmstadt

Wasserstoffperoxid 30 %, Universitätsapotheke, Tübingen

## **2.3 Phytotherapeutika**

Alle genannten Extrakte wurden von der Firma Steigerwald Arzneimittel GmbH (Darmstadt) zur Verfügung gestellt.

### **2.3.1 STW 5 und seine Einzextrakte**

STW 5 (Iberogast<sup>®</sup>) ist ein Kombinationspräparat aus neun Einzextrakten. Es handelt sich bei den Extrakten um Auszüge aus getrockneten Pflanzenteilen von Pfefferminzblättern, Kamillenblüten, Süßholzwurzel, Angelikawurzel, Kümmelfrüchten, Mariendistelrüchten, Melissenblättern und Schöllkraut. Der Extrakt aus Iberis Amara stellt als Frischpflanzenauszug eine Ausnahme dar. Tab. 3 charakterisiert die Einzextrakte und zeigt deren Anteil in STW 5.

Alle Extrakte wurden vor der Verwendung gut geschüttelt, um eventuell vorhandenen Bodensatz zu suspendieren. Die Verdünnungen erfolgten mit Tyrode-Lösung. Dazu wurden die Pflanzenextrakte in jeweils 100 ml Tyrode-Lösung appliziert, so dass sich jeweils Endkonzentrationen von 2, 5 und 10 µl/ml ergaben. Genauere Angaben zu den eingesetzten Konzentrationen finden sich im Kapitel 4.1.1.2.

Einzelextrakt	Zusammensetzung von STW 5 (ml/100 ml)	Drogen-Extrakt-Verhältnis	Extraktionsmittel	Abkürzung
<b>Pfefferminzblätter</b>	5	1:3	Ethanol 30 %	Pfe
<b>Kamillenblüten</b>	20	1:3	Ethanol 31 %	Kam
<b>Süßholzwurzel</b>	10	1:3	Ethanol 30 %	Süß
<b>Angelikawurzel</b>	10	1:3	Ethanol 31 %	Ang
<b>Kümmelfrüchte</b>	10	1:3	Ethanol 30 %	Küm
<b>Mariendistel Früchte</b>	10	1:3	Ethanol 31 %	Mar
<b>Melissenblätter</b>	10	1:3	Ethanol 30 %	Mel
<b>Schöllkraut</b>	10	1:3	Ethanol 30 %	Schö
<b>Iberis amara Frischpflanze</b>	15	1:2	Ethanol 33 %	Ibe

Tab. 3: Zusammensetzung von STW 5

### 2.3.1.1 STW 5 - Varianten

Zum Vergleich gegenüber STW 5 standen weitere Forschungspräparate zur Verfügung. Tab. 4 gibt einen Überblick über deren Zusammensetzung. STW5Komb6 und STW5Komb4 sind Kombinationspräparate aus sechs bzw. vier Einzelextrakten, STW5-Ibe enthält alle Komponenten von STW 5 außer dem Frischpflanzenauszug Iberis amara. STW5Schö10 enthält ebenfalls alle Einzelextrakte von STW 5, jedoch ist der Schöllkrautextrakt auf 10 % alkaloidabgereichert.

Alle Extrakte wurden vor Verdünnung mit Tyrode ebenfalls gut geschüttelt und in der Konzentration [10 µl/ml] eingesetzt.

Extrakt	STW 5	STW5Komb6	STW5Komb4	STW5-Ibe	STW5Schö10
<b>Pfefferminzblätter</b>	5	10	30	5	5
<b>Kamillenblüten</b>	20	30	30	20	20
<b>Süßholzwurzel</b>	10	10	10	10	10
<b>Angelikawurzel</b>	10			10	10
<b>Kümmelfrüchte</b>	10	20		10	10
<b>Mariendistelfrüchte</b>	10			10	10
<b>Melissenblätter</b>	10	15		10	10
<b>Schöllkraut</b>	10			10	10*
<b>Iberis amara</b>	15	15	30		15
<b>Ethanol 30 %</b>				15	

Tab. 4: Zusammensetzung der STW 5-Varianten, alle Angaben in ml/100 ml. \*enthält den Schöllkrautextrakt Schö10.

### 2.3.1.2 Alkaloidabgereicherte Schöllkrautextrakte und die Alkaloidfraktion

Neben dem vollständigen Schöllkrautextrakt (Schö) standen mittels Festphasenextraktion auf 10 % (Schö10) und 2 % (Schö2) Gesamtalkaloidgehalt abgereicherte Extrakte sowie die abgetrennte Alkaloidfraktion (SchöAlk) zur Verfügung.

Zur vergleichenden Beurteilung mit dem vollständigen Schöllkrautextrakt wurde Schö2 mit der Alkaloidfraktion rekonstituiert, so dass der Gesamtalkaloidgehalt von 4,17 µg/ml wieder erreicht wurde. Genaue Angaben zu den eingesetzten Konzentrationen finden sich im Kapitel Ergebnisse.

## 2.4 Homöopathika

Tab. 5 gibt einen Überblick über die verwendeten homöopathischen Substanzen, die alle in Lösung vorlagen und von der Firma Steigerwald Arzneimittel GmbH (Darmstadt) zur Verfügung gestellt wurden. Angegeben sind der Alkoholgehalt der Lösung, der Trockenrückstand, die in den Versuchen eingesetzte Konzentration und die im Text verwendete Abkürzung. Bis auf Lachesis lagen alle Lösungen als Urtinkturen vor, aus welchen durch Verdünnung mit Tyrode-Lösung die entsprechenden Konzentrationen hergestellt wurden. Hierbei wurde nicht nach homöopathischer Verfahrensweise verdünnt. Das Ziel der Versuche war die Wirkung der Substanzen am Ileum näher zu charakterisieren.

Substanz	Alkohol- gehalt [V%]	Trocken- rückstand [%]	Verwendete Konzentration [ $\mu\text{g}/\text{ml}$ bzw. $\text{mol}/\text{l}$ ]	Abkürzung
<b>Asa Foetida Urtinktur</b>	86	4,6	46 $\mu\text{g}/\text{ml}$	Asa
<b>Chamomilla Urtinktur</b>	64	1,4	14 und 140 $\mu\text{g}/\text{ml}$	Cham
<b>Colocynthis Urtinktur</b>	88	1,7	170 $\mu\text{g}/\text{ml}$	Colo
<b>Ignatia Urtinktur</b>	70,8	1,5	150 $\mu\text{g}/\text{ml}$	Ign
<b>Lachesis D4</b>	0	k.A.	1:100 verdünnt	Lach
<b>Lycopodium Urtinktur</b>	89	2,1	210 $\mu\text{g}/\text{ml}$	Lyco
<b>Magn. chlorat. Urtinktur</b>	52	k.A.	$5 \cdot 10^{-4}$ und $5 \cdot 10^{-3}$ $\text{mol}/\text{l}$	Mag

Tab. 5: Untersuchte homöopathische Tinkturen. Aufgelistet sind Alkoholgehalt und Trockenrückstand der jeweiligen Tinktur nach Herstellerangaben, sowie die in den Messungen verwendeten Konzentrationen und Abkürzungen. (k.A. = keine Angaben).

## 2.5 Lösungen

### Normal-Tyrode-Lösung als physiologische Salzlösung

NaCl	118,0 mM
KCl	5,0 mM
CaCl <sub>2</sub> x 2 H <sub>2</sub> O	2,5 mM
MgSO <sub>4</sub> x 7 H <sub>2</sub> O	1,2 mM
NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> x H <sub>2</sub> O	1,5 mM
Glucose-Monohydrat	5,0 mM
HEPES	10,0 mM

Die Lösung wurde mit NaOH 10M auf pH 7,4 eingestellt.

### Acetylcholin-Lösung

Es wurde eine Acetylcholin-Stammlösung [ $10^{-2}$ M] in Tyrode-Lösung hergestellt und daraus durch weitere Verdünnung mit Tyrode-Lösung  $10^{-6}$ ,  $10^{-5}$  und  $10^{-4}$  Molare Lösungen.

### ProstaglandinF<sub>2α</sub>-Lösung

Es wurde eine ProstaglandinF<sub>2α</sub>-Stammlösung [ $10^{-3}$ M] in Ethanol 50 % hergestellt und daraus durch weitere Verdünnung mit Tyrode-Lösung eine  $10^{-6}$  Molare Lösung.

### Substanz P-Lösung

Es wurde eine Substanz P-Stammlösung [ $5 \cdot 10^{-4}$ M] in Tyrode-Lösung hergestellt und daraus durch weitere Verdünnung mit Tyrode-Lösung  $10^{-8}$  und  $10^{-7}$  Molare Lösungen.

### Neurotensin-Lösung

Es wurde eine Neurotensin-Stammlösung [ $5 \cdot 10^{-4}$ M] in Tyrode-Lösung hergestellt und daraus durch weitere Verdünnung mit Tyrode-Lösung  $10^{-9}$ ,  $10^{-8}$  und  $10^{-7}$  Molare Lösungen.

### Histamin-Lösung

Es wurde eine Histamin-Stammlösung [ $10^{-2}$ M] in Tyrode-Lösung hergestellt und daraus durch weitere Verdünnung mit Tyrode-Lösung eine  $10^{-5}$  Molare Lösung.



### H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Lösung

Es wurde eine H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Stammlösung [5\*10<sup>-2</sup>M] in Tyrode-Lösung hergestellt und daraus durch weitere Verdünnung mit Tyrode-Lösung 10<sup>-4</sup>, 2.5\*10<sup>-4</sup>, 5\*10<sup>-4</sup> und 10<sup>-3</sup> Molare Lösungen.

### tertiär-Butylhydroperoxid-Lösung

Es wurde eine tBHP-Stammlösung [5\*10<sup>-2</sup>M] in Tyrode-Lösung hergestellt und daraus durch weitere Verdünnung mit Tyrode-Lösung eine 5\*10<sup>-4</sup> Molare Lösung.

### Butylscopolaminbromid-Lösung

Es wurde eine Butylscopolaminbromid-Stammlösung [10<sup>-3</sup>M] in Tyrode-Lösung hergestellt und daraus durch weitere Verdünnung mit Tyrode-Lösung eine 10<sup>-5</sup> Molare Lösung.

### Papaverin-Lösung

Es wurde eine Papaverin-Stammlösung [10<sup>-3</sup>M] in Tyrode-Lösung hergestellt und daraus durch weitere Verdünnung mit destilliertem Wasser eine 10<sup>-5</sup> Molare Lösung.

## **2.5.1 Lösungen zur Messung der Chemilumineszenz**

### Luminol-Lösung

Für die 11,3 mM Lösung wurden 2,0 mg Luminol in 1,0 ml DMSO im Dunkeln gelöst.

### H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Lösung

Es wurde eine 10<sup>-1</sup>M Stammlösung in Tyrode-Lösung hergestellt und daraus durch weitere Verdünnung mit Tyrode-Lösung 10<sup>-5</sup>, 5\*10<sup>-4</sup> und 10<sup>-3</sup> Molare Lösungen.

### tertiär-Butylhydroperoxid-Lösung

Es wurde eine 10<sup>-1</sup>M Stammlösung in Tyrode-Lösung hergestellt und daraus durch weitere Verdünnung mit Tyrode-Lösung 10<sup>-5</sup>, 5\*10<sup>-4</sup> und 10<sup>-3</sup> Molare Lösungen.

## **2.6 Biologische Materialien**

### **2.6.1 Ileumpräparate der Wildtyp-Maus**

Die Wildtyp-Mäuse (WT) der Zuchtlinie C57Bl6 wurden von der Firma Charles River, Sulzfeld bezogen und entsprechend gesetzlicher Regularien in Tierräumen des Physiologischen Instituts der Universität Tübingen (offene Gemeinschaftskäfige, 12/12 Stunden Hell-Dunkel-Rhythmus) gehalten und weitergezüchtet; Standardfutter (Nagetierfutter, Ssniff, Soest) und Wasser standen ad libitum zu Verfügung.

Die Tiere wurden durch CO<sub>2</sub>-Asphyxie und zervikale Dislokation getötet. Nach Öffnung des Peritoneums wurde ein ca. 2 cm langes Präparat des distalen Ileums entnommen. Dies wurde mit Tyrode-Lösung durchgespült und von Fettgewebe und Mesenterium befreit. Anschließend wurden 4 mm lange Ringpräparate für die Bestimmung der Kontraktilität und der Radikalbildung vorbereitet.

### **2.6.2 Ileumpräparate der GPx1(-/-)-Maus**

Von der Arbeitsgruppe Prof. Dr. Lackner des Institutes für Klinische Chemie und Laboratoriumsmedizin der Universität Mainz wurden uns Glutathionperoxidase1(-/-)-Mäuse (GPx1-KO) zur Verfügung gestellt und in den Tierräumen des Physiologischen Instituts der Universität Tübingen weitergezüchtet. Die Tiere haben den genetischen Hintergrund der C57Bl6-Mäuse, jedoch wurde das für die GPx1 kodierende Gen inaktiviert, indem die kodierende Sequenz durch Einsetzen einer „Neomycin-Resistenz-Gen-Kassette“ in Exon 2 unterbrochen wurde [Ho et al., 1997]. Die dadurch erhaltenen Tiere waren homozygot bzgl. GPx1(-/-), dennoch erfolgte bei den Nachkommen stichprobenartig eine Überprüfung des Genotyps mittels PCR (siehe Kapitel 3.1.8).

Für die Messungen wurden 4 mm lange Ringpräparate des distalen Ileums, wie unter 2.6.1 beschrieben, vorbereitet.

### **2.6.3 Humane Ileumpräparate**

Von der Universitätsklinik für Allgemeine, Viszeral- und Transplantationschirurgie Tübingen wurden humane Ileumpräparate, die im Rahmen von Operationen für histopathologische Untersuchungen entfernt worden sind, anonym zur Verfügung gestellt.

Die Gewebeproben wurden von Fettgewebe und Mesenterium befreit und als ca. 4 \* 4 mm große Streifenpräparate für die Messungen der Kontraktilität sowie der Chemilumineszenz vorbereitet.

### 3 Methoden

#### 3.1 Kontraktionsmessungen

##### 3.1.1 Messanordnung zur Darmmotilität

Die Darmpräparate wurden mit 2 Edelstahladeln quer zum Darmlumen im Abstand von 2 mm durchstoßen und an den Nadeln in eine thermostatisierte Versuchskammer eingehängt, die mit auf 37°C erwärmter Tyrode-Lösung perfundiert wurde. Die eine Nadel war mit einer Mikrometerschraube verbunden, um die Grundspannung vorzugeben, die andere war mit dem Kraftaufnehmer verbunden, der die durch Vordehnung oder durch spontane bzw. stimulierte Kontraktionen auftretenden isometrischen Kräfte erfasste und das Signal über den Messverstärker an den Computer weitergeleitet hat. Dieses Signal wurde mit der Software AxoScope9 kontinuierlich aufgezeichnet, gespeichert und wie später beschrieben ausgewertet. Regelmäßig wurde die Kraftregistrierung mit Hilfe einer Federwaage im Messbereich bis 50 mN geeicht. In Abb. 1 wird die Versuchsanordnung schematisch gezeigt.

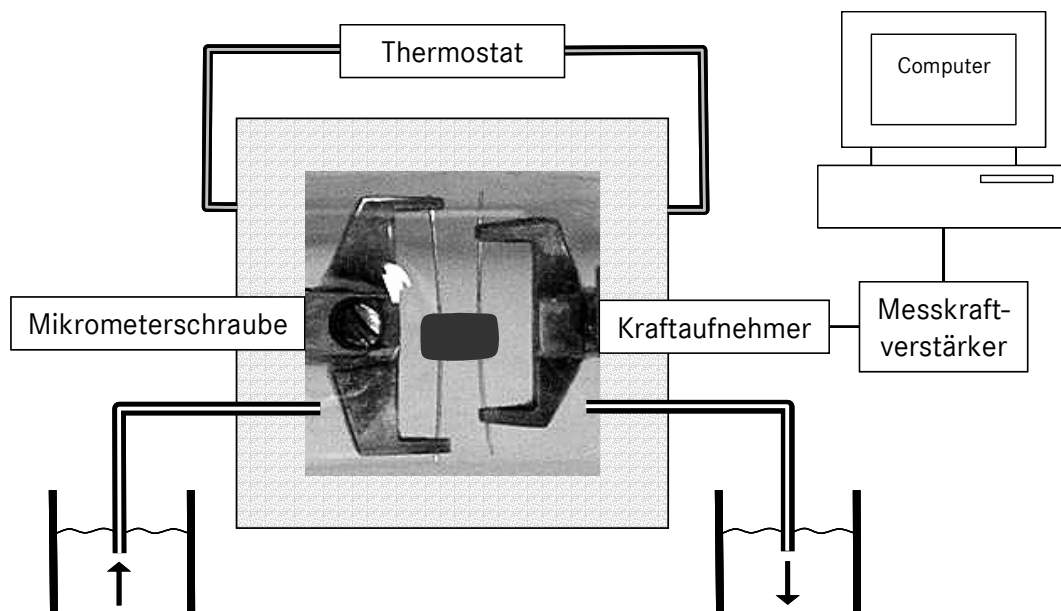


Abb. 1: Messanordnung zur in vitro-Messung der mechanischen Darmmotilität

### 3.1.2 Spontane Kontraktionen der Ileumpräparate der Wildtyp-Maus

Die in die auf 37°C beheizte Versuchskammer eingespannten Ileumpräparate wurden zunächst auf einen Kraftwert von 0,8 mN vorgedehnt. Unter Perfusion mit Tyrode-Lösung zeigten sie nach einer Equilibrierungsphase von ca. 30 Minuten eine gleichmäßige, phasische Spontanrhythmik, die in einem Zeitraum von durchschnittlich acht Stunden konstant zu beobachten war.

Zur Charakterisierung der unbeeinflussten spontanen Peristaltik wurden die mittlere Amplitude  $P_{\text{Tyr}}$  (in mN) und die mittlere Frequenz  $F_{\text{Tyr}}$  (in  $\text{min}^{-1}$ ) ausgewertet.  $P_{\text{Tyr}}$  wurde ermittelt, indem in einem repräsentativen Zeitraum von zwei Minuten die Höhe der einzelnen Amplituden gemessen und anschließend gemittelt wurde. Um  $F_{\text{Tyr}}$  anzugeben, wurde die Anzahl der Amplituden in einem Zeitraum von fünf Minuten gezählt und pro Minute berechnet. Diese unter Tyrode-Perfusion gemessenen Parameter wurden für jedes Präparat gleich 100% gesetzt.

Um Effekte der verschiedenen Extrakte auf die spontane Peristaltik zu messen, wurde die zulaufende Tyrode-Lösung durch die jeweilige vorbereitete Testlösung ersetzt. Dafür wurden die in Kap. 2.3 und 2.4 genannten Pflanzenextrakte und homöopathischen Tinkturen in jeweils 100 ml Tyrode-Lösung appliziert, so dass sich für die Phytopharmaka Konzentrationen von 2 bis 10  $\mu\text{l/ml}$  und für die Homöopathika von 14 bis 210  $\mu\text{g/ml}$  (berechnet aus den Trockengehalt-Angaben) ergaben. Zum Vergleich mit den Extrakten wurden Papaverin (Pap) und Butylscopolamin (Bsc) [je  $10^{-5}$  M] eingesetzt.

Für alle Extrakte betrug die jeweilige Applikationsdauer zehn Minuten, während der die Effekte auf die Peristaltik ausgewertet wurden. Folgte der Verlauf der typischen Registrierung, wie in Abb. 2 dargestellt, so wurden  $P_{8\text{Min.}}$  und  $F_{8\text{Min.}}$  aus den Kontraktionen in der achten Minute ermittelt. Als Besonderheit traten nach Applikation von Lachesis-Tinktur transiente Effekte auf, die zusätzlich ausgewertet wurden: eine Relaxation des Präparats, verbunden mit einer reduzierten Amplitude der spontanen Kontraktilität. Alle ermittelten Werte wurden auf die jeweils mittleren Werte  $P_{\text{Tyr}}$  bzw.  $F_{\text{Tyr}}$  (=100%) bezogen.

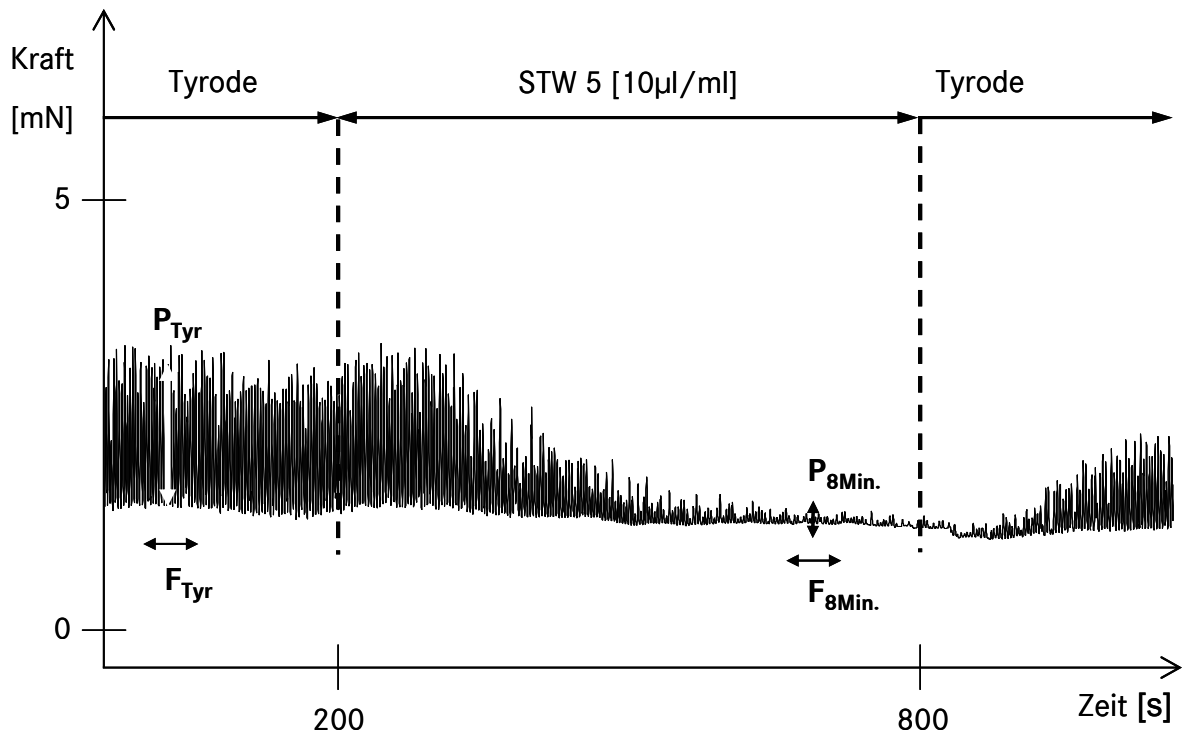


Abb. 2: Einfluss eines Phytopharmakons auf die Spontanrhythmik: Typischer Verlauf mit Darstellung der Parameterauswertung (Beispiel einer Originalregistrierung).

### Lösungsmittel-Kontrollen

Da sowohl die Phytopharmaka als auch die Homöopathika als ethanolische Extrakte oder Lösungen vorlagen, wurden Kontroll-Messungen mit Ethanol entsprechender Konzentration [Endkonzentration 3,0, 4,2, 5,2 bzw. 8,6 ‰] durchgeführt.

Die Ergebnisse zeigten, dass das Lösungsmittel in diesen Konzentrationen weder die Amplitude noch die Frequenz der phasischen Spontanrhythmik signifikant beeinflusste, so dass auf ihre Darstellung verzichtet wurde.

### 3.1.3 Durch Neurotransmitter stimulierte Kontraktionen der Ileumpräparate der Wildtyp-Maus

Um verschiedene funktionelle Störungen zu simulieren, wurden Acetylcholin (ACh), Prostaglandin  $F_{2\alpha}$  ( $PGF_{2\alpha}$ ), Substanz P (SP) und Neurotensin (NT) als physiologische bzw. pathophysiologische Modulatoren der Darmfunktion in Konzentrationen von  $10^{-6}$  bis  $10^{-4}$  M (nähere Angaben jeweils bei den Ergebnissen) eingesetzt.

Zunächst wurden deren Wirkungen während einer Applikationsdauer von zehn Minuten auf die Spontanperistaltik der Ileumpräparate untersucht. Um die meist in ähnlicher Weise auftretenden typischen Effekte auf die Kontraktilität zu charakterisieren, wurden einerseits die Wirkungen auf die Amplitude und die Frequenz im Zeitraum einer maximalen Antwort,  $P_{Max}$  bzw.  $F_{Max}$ , sowie in der achten Minute nach Applikationsbeginn,  $P/F_{8Min.}$ , ausgewertet. Andererseits wurden tonische Kontraktion T bzw. Relaxation R ausgewertet, sofern diese im Beobachtungszeitraum auftraten.

Anschließend wurde die Wirkung der pflanzlichen Extrakte auf die induzierte Kontraktion untersucht.

Am Beispiel von ACh wurden dabei zwei verschiedene Applikationsprotokolle verglichen. Im ersten Fall wurden Extrakt [ $10 \mu\text{l/ml}$ ] und ACh [ $10^{-5}\text{M}$ ] für zehn Minuten gleichzeitig zur Perfusionslösung appliziert, im zweiten Fall wurde das Gewebe zunächst für zehn Minuten mit Extrakt [ $10 \mu\text{l/ml}$ ] vorbehandelt und daraufhin ACh [ $10^{-5}\text{M}$ ] der Extrakt-Lösung zugesetzt (Abb. 3).

Ausgewertet wurden jeweils die gleichen Parameter wie bei alleiniger Applikation der Stimulantien, so dass die Differenzen, die sich aufgrund des zugesetzten Extrakts ergaben, deutlich wurden. Alle durch Wirkstoffzugaben auftretenden Änderungen der Amplitude und Frequenz sowie weitere Effekte (T bzw. R) wurden in prozentualer Relation zu  $P_{Tyr}$  bzw.  $F_{Tyr}$  angegeben.

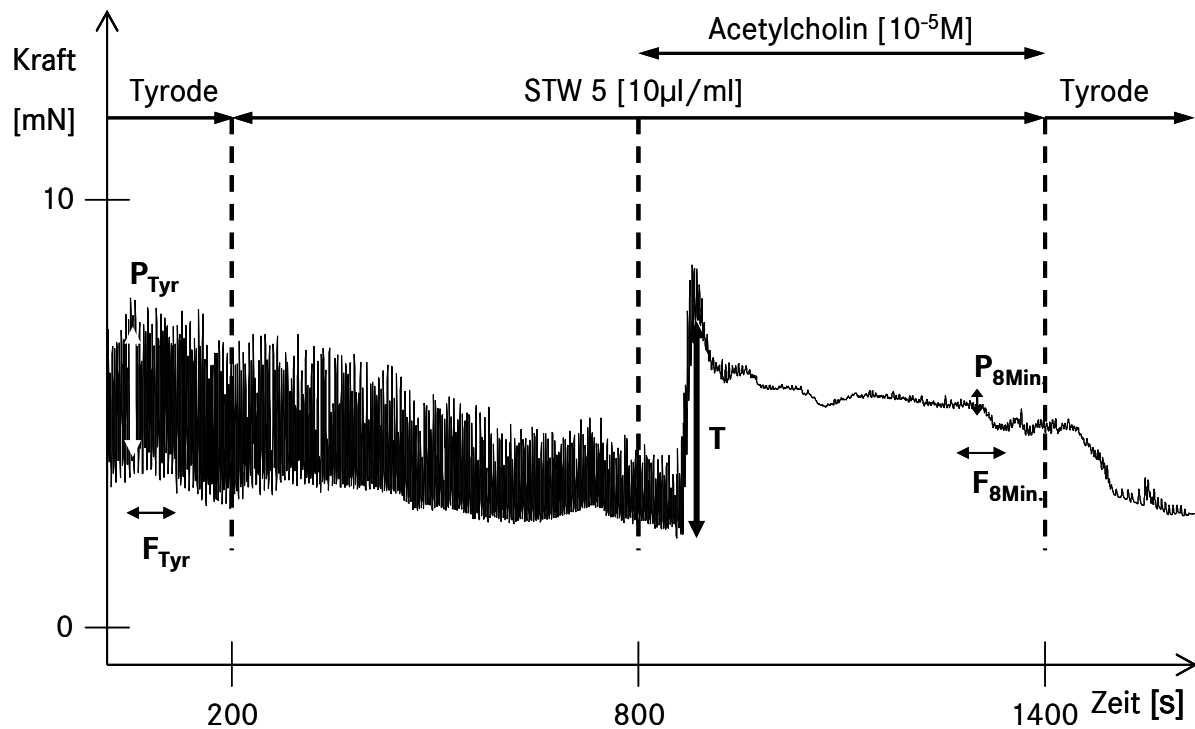


Abb. 3: Einfluss von STW 5 auf die ACh-induzierte Kontraktion (Beispiel einer Originalregistrierung). Ausgewertet wurden die tonische Kontraktion T sowie  $P_{8\text{Min.}}$  und  $F_{8\text{Min.}}$ . Diese Werte wurden auf  $P/F_{\text{Tyr}}$  (=100%) bezogen und verglichen mit denen der alleinigen ACh-Applikation.

Um die Wirkung der pflanzlichen Extrakte auf die Prostaglandin  $F_{2\alpha^-}$ , die Substanz P- und die Neurotensin-induzierte Stimulation des Ileums zu untersuchen, wurde das zweite Protokoll verwendet, d.h. dass das Gewebe bereits für zehn Minuten mit dem jeweiligen Extrakt vorbehandelt wurde. Abb. 4 veranschaulicht dieses Vorgehen am Beispiel von STW 5 und Substanz P.



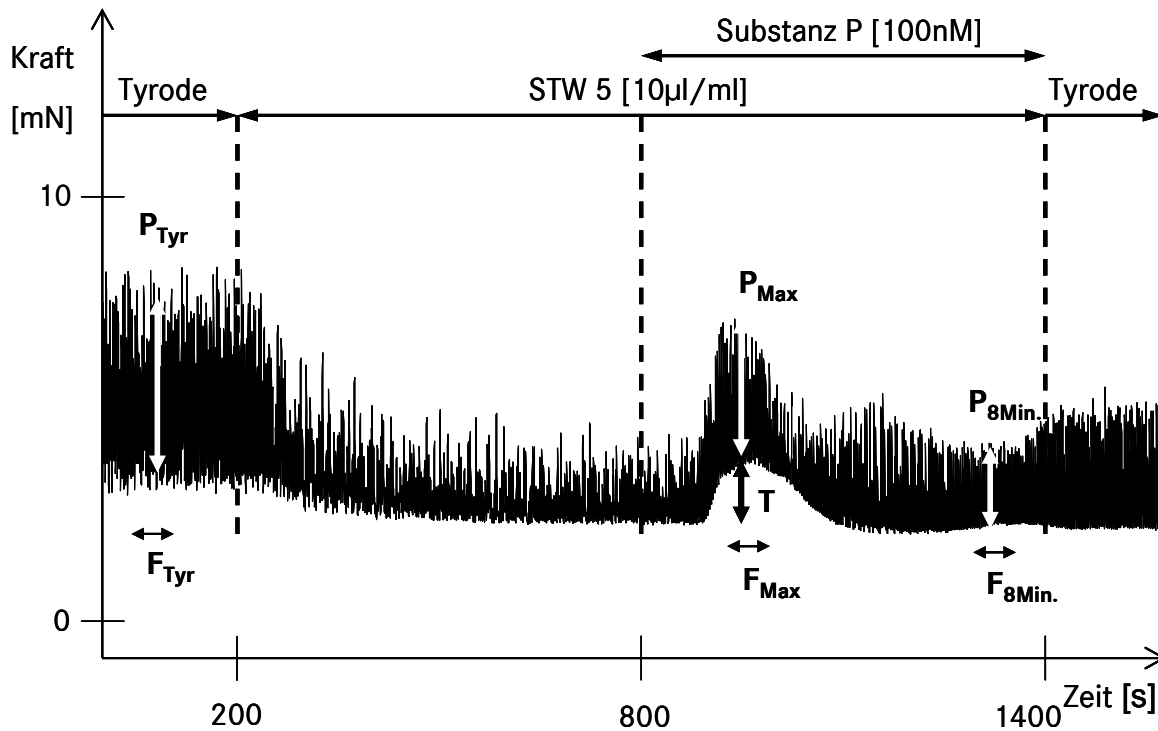


Abb. 4: Einfluss von STW 5 auf die Substanz P-induzierte Kontraktion (Beispiel einer Originalregistrierung). Ausgewertet wurden  $P$  und  $F$  im Maximum der SP-Antwort ( $P/F_{Max}$ ) und in der achten Minute nach SP-Applikation ( $P/F_{8Min.}$ ), sowie die tonische Kontraktion  $T$ . Diese Werte wurden auf  $P/F_{Tyr}$  (=100%) bezogen und verglichen mit denen der alleinigen SP-Applikation.

### 3.1.4 Durch oxidativen Stress induzierte Kontraktionen der Ileumpräparate der Wildtyp- und der GPx1(-/-)-Maus

Für diese Untersuchungen wurden Ileumpräparate sowohl von WT- als auch von GPx1(-/-)-Mäusen verwendet. Um festzustellen, welchen Einfluss oxidativer Stress auf die Darmkontraktilität ausübte, wurden dem Perfusionsmedium Wasserstoffperoxid und *tertiär*-Butylhydroperoxid in verschiedenen Konzentrationen [100, 250, 500 und 1000  $\mu$ M] zugesetzt. Dies führte nach zwei bis fünf Minuten zu verstärkten tonischen und phasischen Kontraktionen, die aber noch während der Peroxidperfusion wieder abgeschwächt wurden.

Um die Peroxidwirkung zu erfassen, wurde daher der Maximaleffekt während der tonischen Kontraktion ( $T$ ) ausgewertet ( $P_{Max}$ ,  $F_{Max}$ ), sowie Amplitude und Frequenz in der achten Minute nach Beginn der  $H_2O_2$ -Perfusion ( $P_{8Min.}$ ,  $F_{8Min.}$ ).

Die Wirkung der pflanzlichen Extrakte auf die Peroxid-induzierte Kontraktion wurde untersucht, indem die Präparate, wie im Schaubild Abb. 5 erläutert, mit dem jeweiligen Extrakt vorbehandelt wurden. Die so erhaltenen Werte wurden mit denen der alleinigen Peroxidstimulation verglichen.

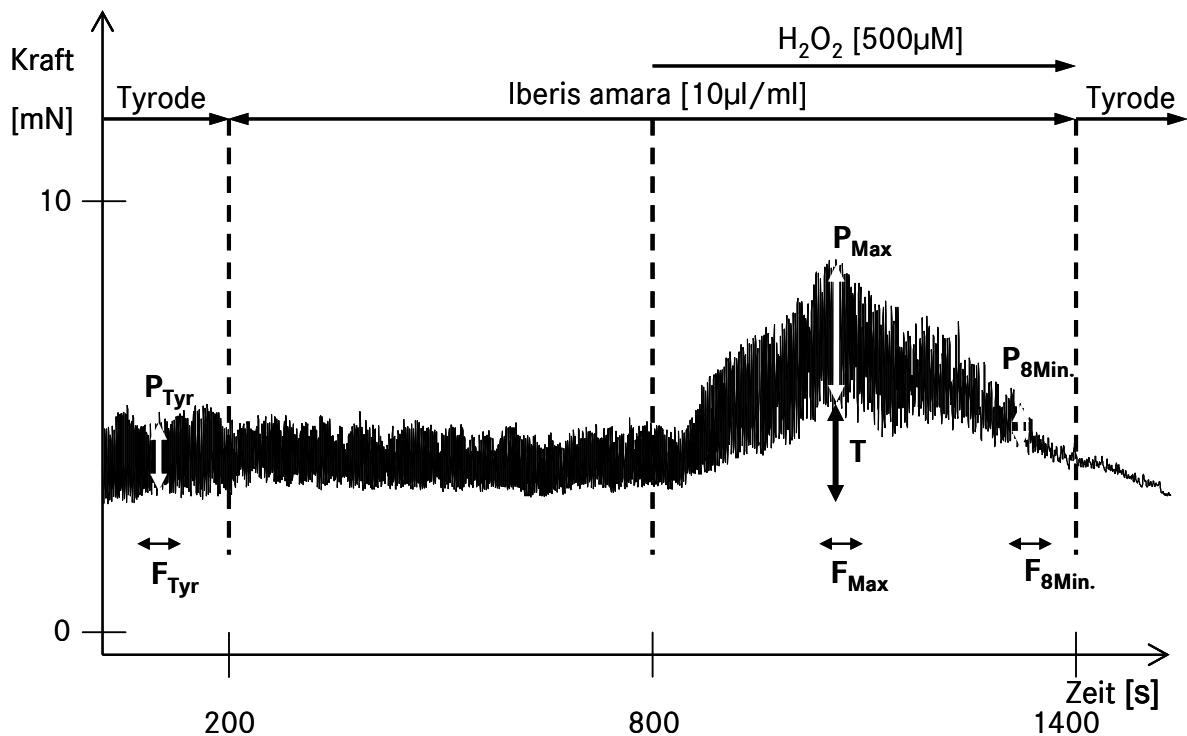


Abb. 5: Einfluss von *Iberis amara* auf die H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-induzierte Kontraktion (Beispiel einer Originalregistrierung). Ausgewertet wurden P<sub>Max</sub> und F<sub>Max</sub> im Zeitraum der tonischen Kontraktion T, sowie P<sub>8Min.</sub> und F<sub>8Min.</sub>. Diese Werte wurden auf P<sub>Tyr</sub> bzw. F<sub>Tyr</sub> (=100 %) bezogen und verglichen mit denen der alleinigen H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Applikation.

### 3.1.5 Kontraktionsmessungen humaner Ileumpräparate

Die Messungen an humanen Ileumpräparaten wurden wie in Kap. 3.1.2 beschrieben durchgeführt. Die Darmpräparate wurden jedoch auf einen höheren Kraftwert von 2,5 mN vorgedehnt und zur Equilibrierung für eine Stunde mit Tyrode-Lösung perfundiert.

Im Unterschied zum Mäuse-Ileum trat nicht bei jedem humanen Präparat eine regelmäßige Spontanrhythmik auf. Daher konnte die Wirkung von STW 5 nur in wenigen Fällen ( $n = 5$ ) bei gleichmäßig ablaufender Peristaltik untersucht werden; dann wurde STW 5 in Tyrode-Lösung [ $10 \mu\text{l/ml}$ ] für zehn Minuten appliziert. Hier zeigte sich zusätzlich zu einer reduzierten phasischen Rhythmik,  $P_{8\text{Min.}}$  und  $F_{8\text{Min.}}$ , eine auftretende Relaxation R des Präparats, die ebenfalls ausgewertet wurde.

Um die Effekte auf stimulierte Kontraktionen untersuchen zu können, wurden zunächst Acetylcholin und Histamin, jeweils in einer Konzentration von  $10^{-5}$  M für je zehn Minuten appliziert, (wobei für jeden Agonisten ein neues Darmpräparat verwendet wurde). Während dieser Perfusionszeit wurde die maximale tonische Kontraktionskraft  $T_{\text{Max}}$  sowie die acht Minuten nach Beginn der Applikation verbleibende Kontraktionskraft  $T_{8\text{Min.}}$  ausgewertet (Beispiele von Originalregistrierungen siehe Kap. 4.3).

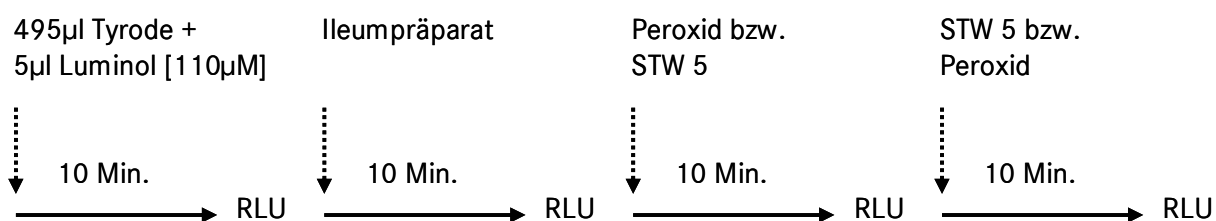
Anschließend wurden die Stimulationen unter Applikation von STW 5 [ $10 \mu\text{l/ml}$ ] wiederholt, auch hier wurden die Ileumpräparate für zehn Minuten mit STW 5 vorbehandelt.

### 3.2 Messung der Radikalbildung mittels Luminol-vermittelter Chemilumineszenz

Die Messung der Radikalproduktion erfolgte mittels Luminol-vermittelter Chemilumineszenz. Dieses Verfahren beruht darauf, dass Luminol mit ROS unter Bildung von 5-Aminophthalsäure und Emission von Licht der Wellenlänge 425 nm reagiert. Die Photonen können im Luminometer gemessen werden, wobei das verwendete Gerät, Luminometer TD-20/20 (Turner Designs, Promega, Mannheim), keine direkte Photonenzählung in „counts per minute“ durchführte, sondern nur eine Integration über die Messzeit und den Messwert als so genannte „relative light units“ (RLU) lieferte.

Ileumpräparate der WT- und der GPx1-KO-Maus sowie humane Gewebeproben wurden, wie in Kap. 2.6 beschrieben, vorbereitet und vor Beginn jeder Messung gewogen, um die späteren Messergebnisse auf das Gewicht beziehen zu können.

Nach Messung der basalen Radikalproduktion wurde die Wirkung von STW 5 auf die Peroxid-stimulierte Radikalbildung wie im folgenden Schema veranschaulicht untersucht: Die mit Gewebe und Lösung beschickten Küvetten wurden im konstant auf 37°C beheizten Luminometer platziert und die Radikalbildung jeweils für zehn Minuten gemessen:



Die Peroxide  $H_2O_2$  und *t*BHP wurden jeweils in den Konzentrationen 10, 500 und 1000 µM eingesetzt. STW 5 [10 µl/ml] wurde einerseits nach, andererseits am WT-Ileum auch vor der Peroxid-Applikation zupipettiert.

Zur Kontrolle wurden Referenzmessungen ohne Ileumpräparate durchgeführt, um die Chemilumineszenz der Peroxide mit Luminol zu zeigen. Diese ermittelten „Peroxid-Leerwerte“ sind ebenfalls im Ergebnisteil dargestellt. Die Radikalbildung der untersuchten Ileumpräparate wurde in RLU sowie in RLU pro g Gewebe angegeben.

### 3.3 Charakterisierung der GPx1(-/-)-Maus

Zur Beurteilung der GPx1-KO-Mäuse wurde sowohl die Genotypisierung der DNA als auch die phänotypische Charakterisierung der GPx durchgeführt.

#### 3.3.1 Genotypisierung: Polymerase-Ketten-Reaktion

Bei der PCR wird durch einen zyklisch verlaufenden Prozess eine Kettenverlängerung zweier gegenläufiger Oligonukleotid-Primer durch eine hitzestabile DNA-Polymerase erzielt. Durch die mehrfache Wiederholung eines Reaktionszyklus (Denaturierung, Primeranlagerung, Elongation) wird eine exponentielle Vervielfältigung des zwischen den Primern liegenden DNA-Abschnittes erreicht, so dass diese DNA nachgewiesen werden kann.

Im Rahmen dieser Arbeit wurde die PCR angewendet, um die GPx1-KO-Mäuse auf ihren Mangel des GPx1-Gen zu charakterisieren. Die Isolierung der genomischen DNA aus „eartags“ erfolgte mittels einem NucleoSpin<sup>®</sup>Tissue Kit nach den Angaben des Herstellers [Macherey-Nagel 2003].

Für die PCR wurde mittels des TaKaRa LA Taq<sup>™</sup>-Kits ein Reaktionsansatz vorbereitet, der neben LA PCR<sup>™</sup>Puffer-, MgCl<sub>2</sub>- [2 mM], Taq-Polymerase [5 U/μl] und dNTP (Desoxynukleotidtriphosphat)-Lösung [2,5 mM] sowie die geeigneten Primer (FinN, R3N, RPGKN) enthielt [Takara Biotechnology 2005]. Der Forward-Primer FinN [10 pM] und der Reverse-Primer R<sub>3</sub>N [10 pM] wurden dabei zur Vervielfältigung des 293 bp langen DNA-Fragmentes verwendet. Zur Amplifikation des 509 bp langen Fragments in der „Neomycin-Resistenz-Gen-Kassette“ der DNA der GPx1-KO-Mäuse wurde ebenfalls FinN [10 pM] als Forward-Primer eingesetzt, als Reverse-Primer jedoch RpgkN [10 pM] gewählt. Die isolierte DNA wurde kurz vor Beginn der Messung mit dem Reaktionsansatz gemischt, anschließend wurde die PCR in einem Thermocycler (Mastercycler, Eppendorf) gestartet. Dort fanden nach einer Initialphase von zehn Minuten bei 95°C, (um sicherzustellen, dass sich die DNA-Doppelstränge teilen), 40 Zyklen statt, die jeweils aus Denaturierung bei 95°C (2 Min.), Primerhybridisierung bei 60,5°C (1 Min.) und Elongation bei 72°C (1 Min.) bestanden.

Anschließend wurden die Amplifikate bei -20°C bis zur Gelelektrophorese aufbewahrt.

## Gelelektrophorese

Mittels der Agarose-Gelelektrophorese wurden die PCR-Produkte, d.h. die Nukleinsäure-Stränge, nach ihrer Größe unter Anlegen einer Spannung von 77 Volt aufgetrennt. Bei dieser Methode wurden durch Zugabe von Ethidiumbromid [0,6 µg/ml] zum Agarose-Gel [1 %] die einzelnen DNA-Fragmente sichtbar gemacht, da Ethidiumbromid durch Interkalation an die Duplex-DNA bindet und damit eine Intensivierung der Fluoreszenz-Emission bewirkt. Mit Hilfe der ebenfalls in einer Gelkammertasche applizierten DNA-Leiter konnten anschließend unter UV-Licht die DNA-Stränge anhand ihrer Basenpaare identifiziert werden (Abb. 6).

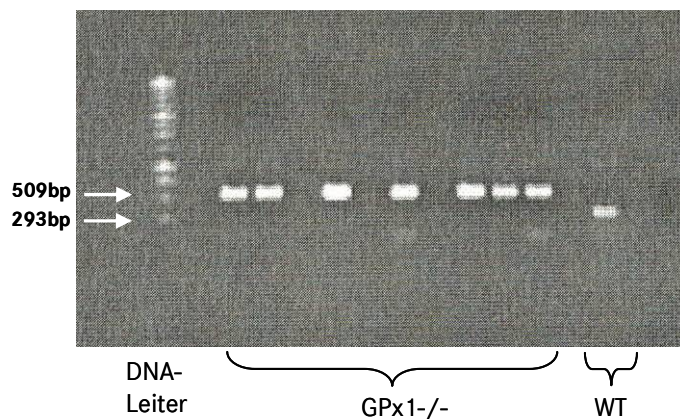


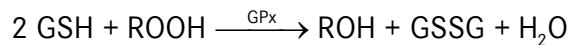
Abb.6: Gelelektrophorese zur Bestimmung des Genotyps: Anhand der DNA-Leiter wurden die Fragmente identifiziert.

### 3.3.2 Phänotypisierung: Bestimmung der spezifischen Aktivität der Glutathionperoxidase

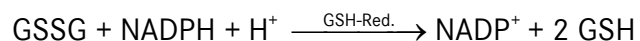
Um das Resultat der KO-Manipulation bewerten zu können, sollte die spezifische Aktivität der GPx in Erythrozyten, in der Leber und im Ileum der GPx1(-/-)- und der WT-Maus bestimmt werden. Hierfür wurden einerseits Hämolysate der isolierten Erythrozyten verwendet, gewonnen durch osmotische Schädigung und anschließende Zentrifugation. Andererseits wurden Proben aus der Leber und dem Ileum vorbereitet, indem das jeweilige Gewebe mit dem ca. dreifachen Volumen an Kaliumphosphat-Puffer homogenisiert und danach bei 5000 U/min für fünf Minuten zentrifugiert wurde.

### Bestimmung der GPx-Aktivität mittels gekoppeltem Enzymtest

Die Glutathionperoxidase katalysierte dabei die Reduktion von *tertiär*-Butylhydroperoxid (*t*BHP) zu Alkohol und die Oxidation von Glutathion (GSH) zu Glutathion-Disulfid (GSSG).



Die Indikatorreaktion lieferte die Glutathion-Reduktase (GSH-Red.), wodurch GSSG unter Verbrauch von NADPH wieder zu GSH reduziert wurde.



Das bedeutete, dass aus der Geschwindigkeit der Abnahme der NADPH-Konzentration die Aktivität der GPx bestimmt werden konnte.

Die Durchführung der Bestimmung erfolgte in einer Halbmikroküvette mit folgender Zusammensetzung: Kaliumphosphat-Puffer [pH 7,2; 100 mM], EDTA [2,5 mM], Glutathion [10 mM], Glutathion-Reduktase [0,58 U/ml] und NADPH [2,4 mM]. Nach Zugabe von 100 µl des Gewebehomogenats bzw. -hämolsats wurde fünf Minuten bei 37°C inkubiert und die Reaktion anschließend durch 16 mM *t*BHP-Lösung gestartet (Endvolumen 400 µl). Die NADPH-Oxidation wurde über sieben Minuten bei 366 nm kontinuierlich photometrisch im Thermo-Spectrometer (Genesys 6, Rochester, USA) gemessen.

Die Volumenaktivität ergab sich dann aus folgender Berechnung:

$$394 \times \frac{V_{\text{Total}}}{V_{\text{Probe}}} \times \frac{\Delta E}{\Delta t} = \text{Aktivität GPx} \left[ \frac{\text{mU}}{\text{ml}} \right]$$

$V_{\text{Total}}$ : Gesamtvolumen in der Küvette  
 $V_{\text{Probe}}$ : Volumen der Probe/:Pexkn Kontrolle  
 über der Zeit t  
 394: reaktionsspezifischer Faktor

### Bestimmung des Gesamtproteingehalts nach Bradford

Diese quantitative Messung des Gesamtproteingehalts der Proben basiert auf der Beobachtung, dass sich das Absorptionsmaximum einer sauren Coomassie-Brilliantblau-Lösung nach Bindung an die protonierten Aminogruppen der Proteine (und somit nach Bildung stabiler Farbstoffkomplexe) von 465 nm auf 595 nm verschiebt.

Die Extinktion wurde daher im Biophotometer (Eppendorf, Hamburg) bei 595 nm gegen einen Leerwert gemessen. Mit dem Proteinstandard Rinderserumalbumin (BSA) [0,5-10 mg BSA/ml] wurde eine Eichgerade erstellt und zur Bestimmung der Proteinkonzentration in den Homogenaten verwendet.

### Berechnung der spezifischen Aktivität der GPx

Zur Ermittlung der spezifischen Aktivität der GPx wurde die oben berechnete (Volumen-) Aktivität auf die Gesamt-Proteinkonzentration im Homogenat bezogen:

$$\frac{\text{Aktivität GPx} \left[ \frac{\text{mU}}{\text{ml}} \right]}{\text{Gesamtproteinkonz.} \left[ \frac{\text{mg}}{\text{ml}} \right]} = \text{spezifische Aktivität GPx} \left[ \frac{\text{mU}}{\text{mg}} \right]$$

Die Ergebnisse der Messung der spezifischen Aktivität der Glutathionperoxidase in Proben des Ileums, der Leber sowie in hämolysierten Erythrozyten der GPx1-KO-Maus und der WT-Maus werden in Tab. 6 gezeigt. Es ist erkennbar, dass die spezifische Aktivität der GPx in den Geweben der WT-Maus signifikant höher war: In Ileum- und Leber-Präparaten war die Aktivität um den Faktor 3 und in den Erythrozyten um den Faktor 1,5 erhöht. Bei den KO-Tieren ist speziell nur die GPx-1 defizient, weshalb immer noch eine Rest-Aktivität der GPx in den Organen dieser Mäuse gemessen werden konnte.

Spezifische Aktivität der GPx [mU/mg]	<b>WT-Maus</b>	<b>n</b>	<b>GPx1-KO-Maus</b>	<b>n</b>
Ileum	1,32 ± 0,7	5	0,38 ± 0,17	5
Leber	27,03 ± 6,1	7	8,59 ± 6,2	9
Erythrozyten	6,92 ± 0,7	6	4,82 ± 0,9	10

Tab. 6: Spezifische Aktivität der GPx im Ileum, in der Leber und in Erythrozyten der WT- und der GPx-KO-Maus. Angegeben sind die Mittelwerte ± Standardabweichung in mU/mg. n = Anzahl der untersuchten Tiere.



### **3.4 Statistik**

Die statistische Auswertung der Versuche erfolgte mit dem Programm WINSTAT für Excel. Unter Annahme der Normalverteilung wurden Mittelwertsvergleiche zwischen den Messwerten vor und nach Applikation der verwendeten Lösungen an gleichen Präparaten mittels t-Test für abhängige Stichproben gerechnet. Mittelwertsvergleiche zwischen der Gruppe der GPx1-KO-Präparate und derjenigen der WT-Präparate erfolgten mittels zweiseitigem t-Test für unabhängige Stichproben. Das Signifikanzniveau wurde auf  $p < 0,05$  festgelegt, genauere Angaben finden sich im Ergebnisteil.

## 4 Ergebnisse

### 4.1 Untersuchungen am Ileum von Wildtyp-Mäusen

#### 4.1.1 Spontane Peristaltik und deren Beeinflussung durch Phytotherapeutika und Homöopathika

##### 4.1.1.1 Spontane Peristaltik

Die Ileumpräparate der Wildtyp-Mäuse zeigten eine über ca. acht Stunden stabile peristaltische Kontraktionsaktivität mit einer mittleren Amplitude ( $P_{Tyr}$ ) von  $3,4 \pm 2,3$  mN und einer mittleren Frequenz ( $F_{Tyr}$ ) von  $21,6 \pm 3,7$  min<sup>-1</sup>, ermittelt an 642 Ileumpräparaten (m) von 155 Tieren (n).

##### 4.1.1.2 Wirkung von STW 5 und seinen Einzelextrakten

Die Untersuchungen zeigten, dass STW 5 und seine Einzelextrakte in den eingesetzten Verdünnungen von 1:500, 1:200 und 1:100, entsprechend 2, 5 und 10 µl/ml, die spontane Peristaltik beeinflussen können.

Dieser Effekt war insbesondere am Amplitudenwert  $P_{8Min.}$  zu beobachten, der durch alle Extrakte dosisabhängig inhibiert wurde (Abb. 7). Bei der Dosierung 10 µl/ml wurde dies sehr deutlich bei STW 5 sowie bei Pfefferminz-, Kamillen- und Angelikawurzel-Extrakt, die  $P_{8Min.}$  signifikant um 72,4 sowie um 90,2, 72,5 und 71,6 % reduzierten. Die weiteren Extrakte waren schwächer wirksam, doch selbst die mit der geringsten Wirksamkeit, Schöllkraut und Iberis amara, hemmten  $P_{8Min.}$  noch signifikant um ca. 24 %.

Eine ähnliche Abstufung fand sich auch in der Dosierung von 5 µl/ml: Die Extrakte aus Pfefferminz und Kamille zeigten die stärkste signifikante Hemmung, sie reduzierten  $P_{8Min.}$  um 82,8 und 49,8 %. Obwohl generell eine verminderte Amplitude gefunden wurde, waren die Effekte von Kümmel und Schöllkraut statistisch nicht mehr signifikant (Abb. 7).

Bei einer Konzentration von 2 µl/ml (nicht in der Abbildung dargestellt) zeigte sich nur noch Signifikanz für STW 5, sowie für Pfefferminz, Kamille und Angelikawurzel ( $P_{8Min.}$  wurde um 32,4 bzw. um 44,3, 29,0 und 17,4 % reduziert), während kein Effekt unter

Behandlung mit Kümmel, Schöllkraut, usw. auftrat.

Die Effekte auf die Frequenz, angegeben als  $F_{8\text{Min.}}$ -Wert sind weniger ausgeprägt (Abb. 8). In der Konzentration von 10  $\mu\text{l/ml}$  reduzierten STW 5, Pfefferminz, Kamille, Angelikawurzel und Schöllkraut  $F_{8\text{Min.}}$  noch signifikant, während bei Applikation von 5  $\mu\text{l/ml}$  Signifikanz nur noch für Pfefferminz gefunden wurde. Die Versuche mit der Konzentration 2  $\mu\text{l/ml}$  zeigten für  $F_{8\text{Min.}}$  keine signifikanten Änderungen gegenüber der Perfusion mit Tyrode-Lösung.

Als Vergleich wurde die Wirkung von Butylscopolamin (Bsc) und Papaverin (Pap), jeweils in der Konzentration  $10^{-5}\text{M}$ , untersucht (Abb. 7/8). Während sich die Amplitude durch Bsc und Pap signifikant um 14,4 bzw. um 47,9 % verkleinerte, wurde die Frequenz nur durch Pap signifikant um 19,2 % verringert.

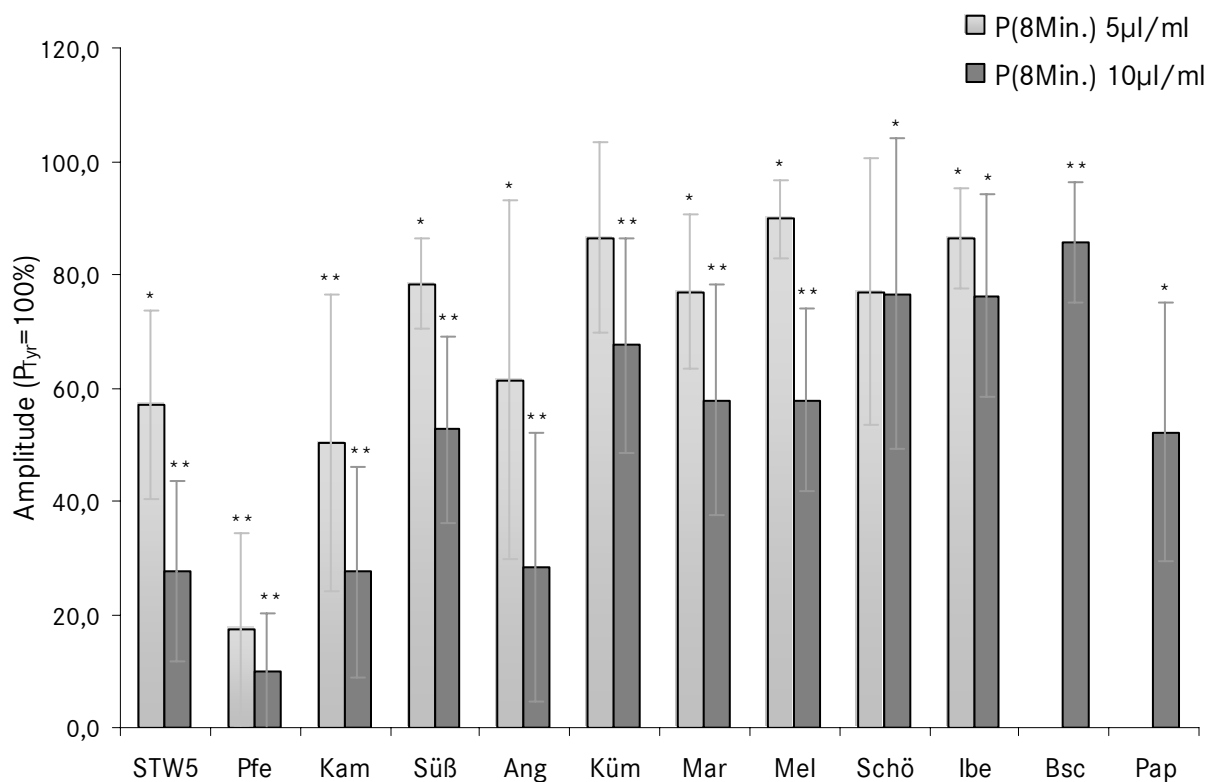


Abb. 7: Einfluss von STW 5 und seinen Einzalextrakten auf die Amplitude  $P_{8\text{Min.}}$  der Spontanrhythmik (bezogen auf  $P_{\text{Tyr}}=100\%$ ). Bsc und Pap [ $10^{-5}\text{M}$ ] als Vergleich.  $\text{MW} \pm \text{SD}$ ; für [5  $\mu\text{l/ml}$ ]  $n = 3-5$ , für [10  $\mu\text{l/ml}$ ]  $n = 11-18$ , Signifikanzen bezogen auf  $P_{\text{Tyr}}$  \* $p < 0,05$ , \*\* $p < 0,01$ .

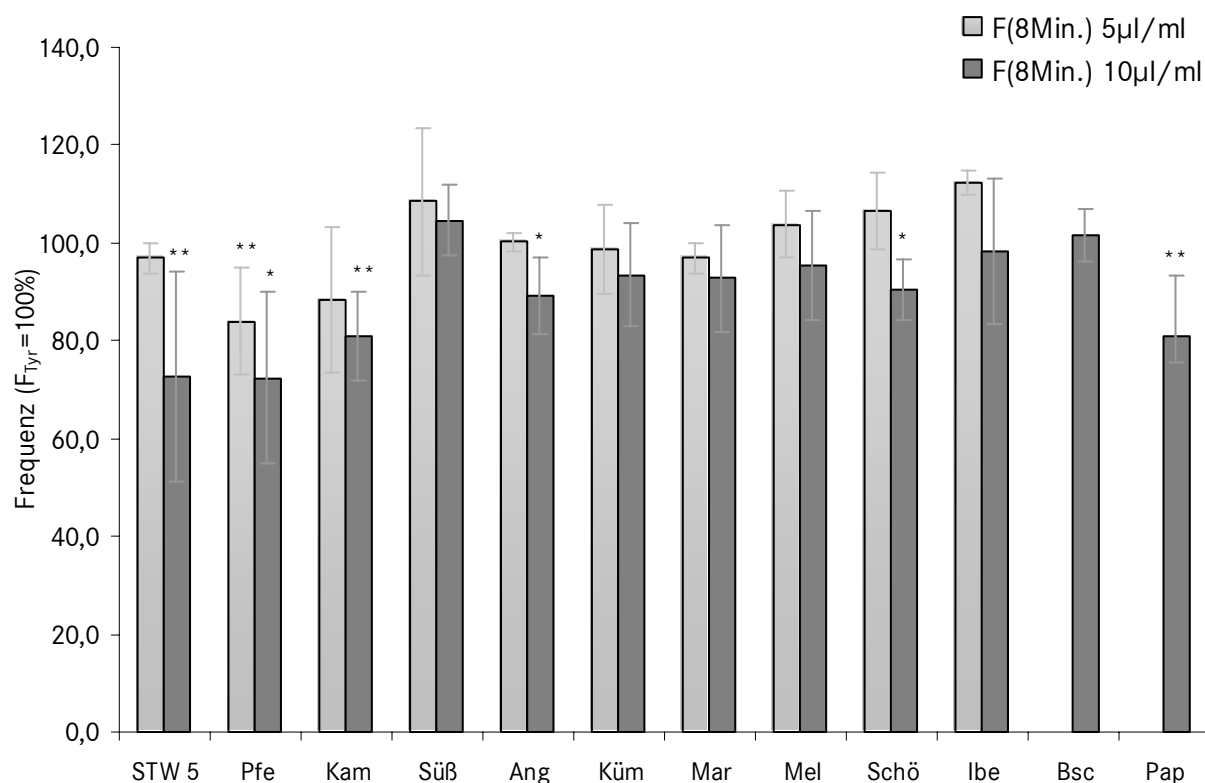


Abb. 8: Einfluss von STW 5 und seinen Einzelnextrakten auf die Frequenz  $F_{8\text{Min.}}$  der Spontanrhythmik (bezogen auf  $F_{\text{Tyr}}=100\%$ ). Bsc und Pap [ $10^{-5}\text{M}$ ] als Vergleich. MW  $\pm$  SD; für 5  $\mu\text{l/ml}$  n = 3-5, für 10  $\mu\text{l/ml}$  n = 11-18, Signifikanzen bezogen auf  $F_{\text{Tyr}}$  \*p < 0,05, \*\*p < 0,01.

#### 4.1.1.3 Wirkungen von verschiedenen STW 5-Varianten

Aus der Weiterentwicklung von STW 5 entstanden neue Forschungspräparate: STW5Komb6, bestehend aus sechs Einzelnextrakten (Pfe, Kam, Süß, Küm, Mel, Ibe), und STW5Komb4, als Kombination von vier Extrakten (Pfe, Kam, Süß, Ibe). Des Weiteren wurden STW5-Ibe, analog STW 5 ohne Iberis amara, und STW5Schö10, analog STW 5 mit auf 10 % abgereichertem Alkaloidgehalt, untersucht.

In Abb. 9 und Abb. 10 kann man erkennen, dass alle getesteten Präparate [10  $\mu\text{l/ml}$ ] die Kontraktionskraft signifikant reduzierten. STW5Komb6 und STW5Komb4 wirkten stärker inhibierend auf  $P_{8\text{Min.}}$  und  $F_{8\text{Min.}}$  gegenüber STW 5. Dieser Effekt lässt sich aufgrund der höheren Konzentration der stark wirksamen Extrakte Pfefferminz und Kamille in STW5Komb6 bzw. STW5Komb4 erklären.

Für STW5-Ibe wurde eine schwächere Wirkung auf  $P_{8\text{Min.}}$  und  $F_{8\text{Min.}}$  gefunden. Unter Berücksichtigung der in Kap. 4.1.1.2 vorgestellten Ergebnisse, in denen der

Einzelextrakt *Iberis amara* nur eine schwache Wirkung auf die Parameter zeigte, deutet dieser Befund auf mögliche synergistische Effekte zwischen *Iberis amara* und den weiteren Extrakten hin.

STW5Schö10 zeigte ebenso eine weniger hemmende Wirkung auf Amplitude und Frequenz als STW 5, so dass der Einfluss der Schöllkrautalkaloide im nächsten Kapitel näher untersucht werden sollte.

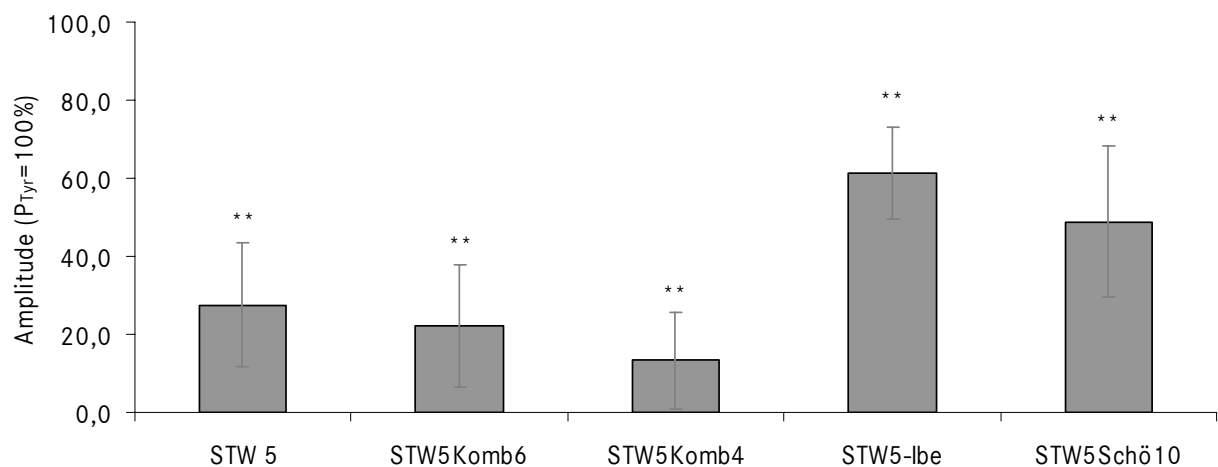


Abb. 9: Einfluss der STW 5 - Varianten [10µl/ml] auf die Amplitude  $P_{8Min}$ . (bezogen auf  $P_{Tyr}=100\%$ ).  $MW \pm SD$ ; für STW 5  $n=14$ , sonst  $n = 4-8$ , Signifikanzen bezogen auf  $P_{Tyr}$  \*\* $p < 0,01$ .

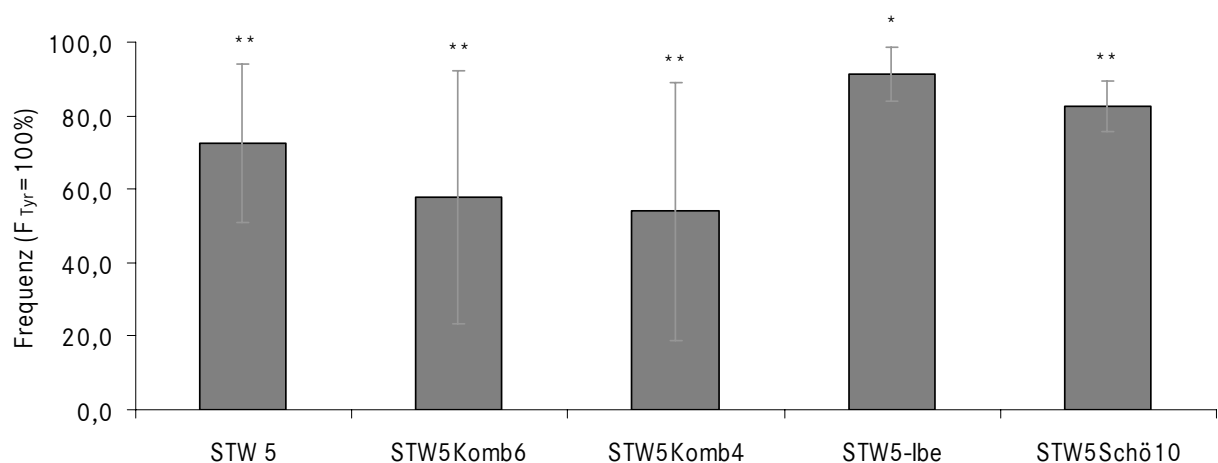


Abb. 10: Einfluss der STW 5 - Varianten [10µl/ml] auf die Frequenz  $F_{8Min}$ . (bezogen auf  $F_{Tyr}=100\%$ ).  $MW \pm SD$ ; für STW 5  $n=14$ , sonst  $n = 4-8$ , Signifikanzen bezogen auf  $P_{Tyr}$  \* $p < 0,05$ , \*\* $p < 0,01$ .

#### 4.1.1.4 Wirkungen von Schöllkrautalkaloiden

Um den Einfluss der Alkaloide im Schöllkrautextrakt auf das Kontraktionsverhalten genauer zu bestimmen, wurden neben dem nativen Schöllkrautextrakt Schö die alkaloidabgereicherten Extrakte Schö10 (10 % Alkaloidgehalt) und Schö2 (2 % Alkaloidgehalt) sowie die abgetrennte Alkaloidfraktion SchöAlk untersucht.

Während Schö in einer Konzentration von 10  $\mu\text{l/ml}$  signifikant die Amplitude  $P_{8\text{Min.}}$  und die Frequenz  $F_{8\text{Min.}}$  hemmte, war dieser Effekt schwächer bei Schö10 und Schö2 [10  $\mu\text{l/ml}$ ] ausgeprägt (Abb. 11). Die Alkaloidfraktion SchöAlk zeigte in einer Konzentration von 0,643  $\mu\text{l/ml}$ , in der der Gesamtalkaloidgehalt theoretisch dem nativen Schöllkrautextrakt [10  $\mu\text{l/ml}$ ] entspricht, eine Steigerung der Amplitude bei signifikant verminderter Frequenz.

Zur vergleichenden Beurteilung mit Schö und zur Untersuchung auf synergistische Effekte wurden die Extrakte derart kombiniert, dass der Gesamtalkaloidgehalt von 4,17  $\mu\text{g/ml}$  wieder dem des nativen Extrakts Schö entspricht. Abb. 11 zeigt, dass die Wirkung der Kombination eher der von Schö2 und SchöAlk entspricht, nicht aber dem nativen Schöllkrautextrakt Schö; synergistische Effekte sind dabei nicht zu beobachten.

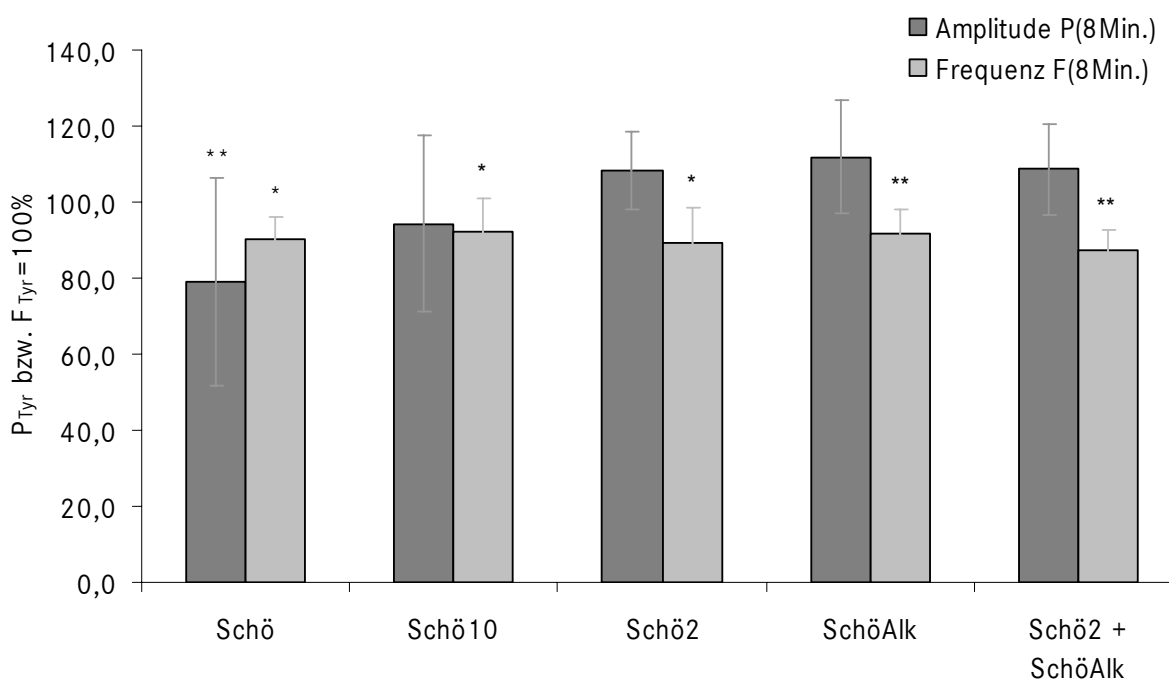


Abb. 11: Einfluss verschiedener Schöllkrautextrakte mit unterschiedlichem Alkaloidgehalt auf  $P_{8\text{Min.}}$  und  $F_{8\text{Min.}}$  (bezogen auf  $P/F_{\text{Tyr}}=100\%$ ). MW  $\pm$  SD; für Schö n=17, sonst n=4-6, Signifikanzen bezogen auf  $P/F_{\text{Tyr}}$  \*p < 0,05, \*\*p < 0,01.

#### 4.1.1.5 Wirkungen von bei Verdauungsbeschwerden eingesetzten Homöopathika

Tab. 7 stellt die Ergebnisse dar, die mit den aus den homöopathischen Urtinkturen hergestellten Lösungen erzielt worden sind. Gezeigt werden die Effekte auf die Amplitude  $P_{8Min.}$  und auf die Frequenz  $F_{8Min.}$  als relative Mittelwerte  $\pm$  Standardabweichung bezogen auf die Standardkontraktion (=100%). Die spontane Kontraktilität des Ileums wurde durch die Tinkturen auf unterschiedliche Art beeinflusst: *Asa foetida* zeigte den stärksten inhibitorischen Effekt der getesteten Substanzen und reduzierte bereits in einer Konzentration von 46  $\mu\text{g/ml}$   $P_{8Min.}$  signifikant um 97,7 % und  $F_{8Min.}$  um 89,2 %. Die spasmolytisch eingesetzten *Chamomilla*- [140  $\mu\text{g/ml}$ ] und *Colocynthis*-Lösungen [170  $\mu\text{g/ml}$ ] hemmten  $P_{8Min.}$  signifikant um 34,0 bzw. um 32,4 %. *Chamomilla* wurde zusätzlich in geringerer Konzentration, 14  $\mu\text{g/ml}$ , getestet, wobei die Amplitude ebenfalls inhibiert wurde, wenngleich nur um ca. 16 %.

*Lachesis*, das als Dilution D4 vorlag und im Experiment nochmals 1:100 verdünnt angewandt wurde, verursachte als einzige Tinktur eine signifikante Relaxation des basalen Tonus um 45,1 %, verbunden mit einer transienten Abnahme der Amplitude um 45,5 %. Des Weiteren zeigten Lösungen aus *Lycopodium* [210  $\mu\text{g/ml}$ ] und *Magnesium chloratum* [0,5 und 5 mmol/l] signifikante Effekte: *Lycopodium* verringerte  $P_{8Min.}$  um 32,8 % und  $F_{8Min.}$  um 9,7 %, *Magnesium chloratum* hemmte  $P_{8Min.}$  in der Konzentration 5 mmol/l sogar um 54,1 %. *Ignatia* übte keinen signifikanten Einfluss auf die Kontraktilität aus.

Substanz	Konz.	P <sub>8Min.</sub>	F <sub>8Min.</sub>	n (m)
<b>Asa foetida</b> ∅	46 µg/ml	2,3 ± 2,0 *	10,8 ± 6,4 **	3 (6)
<b>Chamomilla</b> ∅	14 µg/ml	83,4 ± 18,1 *	103,3 ± 12,3	4 (8)
<b>Chamomilla</b> ∅	140 µg/ml	66,0 ± 10,9 *	92,0 ± 11,7	4 (8)
<b>Colocynthis</b> ∅	170 µg/ml	67,6 ± 14,4 *	85,0 ± 7,9 **	5 (10)
<b>Ignatia</b> ∅	150 µg/ml	91,6 ± 24,3	94,6 ± 10,9	3 (8)
<b>Lachesis D4</b> <sup>a</sup>	1:100 verdünnt	86,6 ± 24,9	93,5 ± 5,5 *	4 (7)
<b>Lycopodium</b> ∅	210 µg/ml	67,2 ± 8,2 *	90,3 ± 10,4 *	4 (8)
<b>Mag. chlorat.</b> ∅	5·10 <sup>-4</sup> mol/l	89,9 ± 11,1	106,1 ± 8,5	3 (7)
<b>Mag. chlorat.</b> ∅	5·10 <sup>-3</sup> mol/l	45,9 ± 14,4 **	98,1 ± 12,4	3 (8)

Tab. 7: Daten der untersuchten Homöopathika. Dargestellt sind die Mittelwerte mit Standardabweichung für P<sub>8Min.</sub> und F<sub>8Min.</sub>. Konz. = Wirkkonzentration im Organbad, [µg/ml] berechnet aus den jeweiligen Trockengehalt-Angaben. n = Anzahl der untersuchten Tiere, m = Anzahl der untersuchten Ileumpräparate, Signifikanzen bezogen auf P/F<sub>Tyr</sub> \*p < 0,05, \*\*p < 0,01.



#### 4.1.2 Stimulierte Kontraktionen und deren Beeinflussung durch Phyto-pharmaka

In weiterführenden Untersuchungen sollten die Effekte pflanzlicher Extrakte auf induzierte Kontraktionen herausgefunden werden. Zur Stimulation der Ileumpräparate wurden folgende Substanzen eingesetzt: Acetylcholin, Prostaglandin  $F_{2\alpha}$ , Substanz P und Neurotensin. Zunächst wird jeweils die Wirkung der alleinigen Applikation dieser Stimulantien beschrieben, dann die Effekte der Extrakte darauf.

##### 4.1.2.1 Stimulation mit Acetylcholin und Wirkung von STW 5 und seinen Einzalextrakten

###### Wirkung von Acetylcholin

Acetylcholin-Applikation führte am Ileum zu einer persistenten tonischen Kontraktion  $T$  und einer Abnahme der Amplitude  $P_{8Min.}$  der phasischen Spontanrhythmik (Abb. 12).

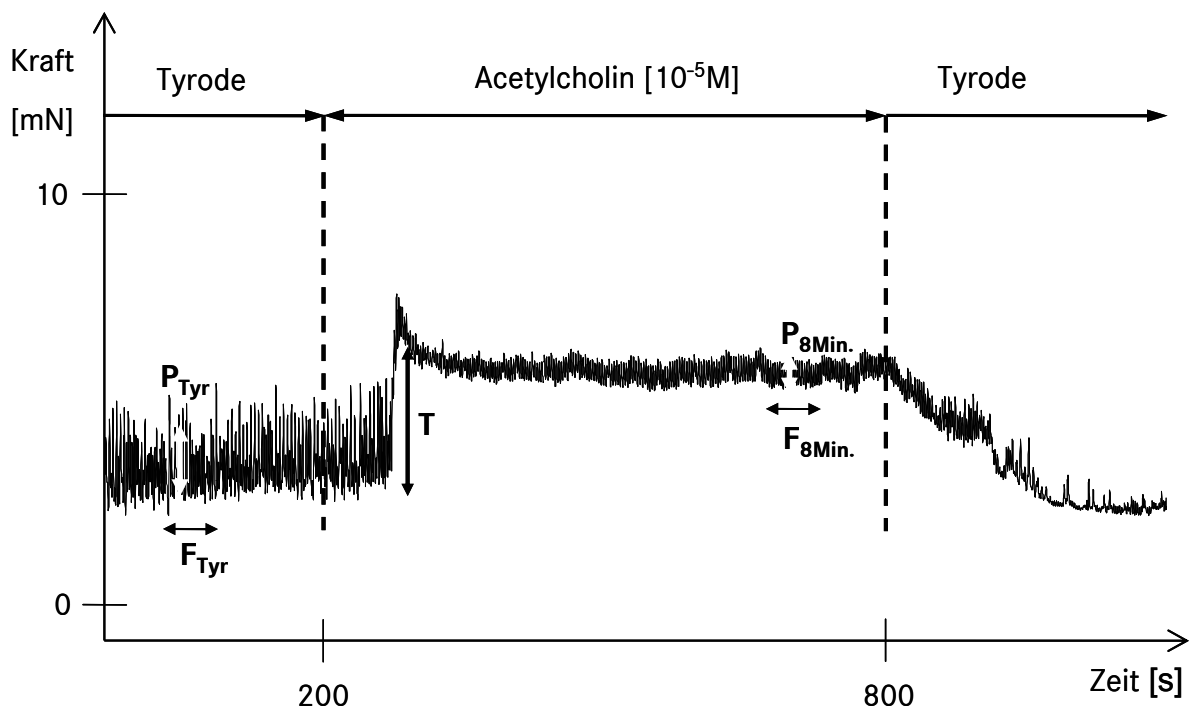


Abb. 12: Einfluss von ACh auf die Spontanrhythmik des Ileumpräparates. Ausgewertet wurden die durch ACh induzierte tonische Kontraktion  $T$ , sowie  $P_{8Min.}$  und  $F_{8Min.}$  bezogen auf  $P_{Tyr}$  bzw.  $F_{Tyr}$  (=100%).

Messungen mit verschiedenen ACh-Konzentrationen [ $10^{-6}$ ,  $10^{-5}$  und  $10^{-4}$  M] zeigten dabei eine Dosisabhängigkeit: Mit steigender Konzentration wurde T signifikant größer, während  $P_{8\text{Min.}}$  sank (Abb. 13).

Die Frequenz  $F_{8\text{Min.}}$  der phasischen Kontraktionen nahm tendenziell mit zunehmender ACh-Konzentration ab; dieser Effekt war jedoch nicht signifikant.

Für die weiteren Versuche wurde eine  $10^{-5}$ -Molare Acetylcholin-Lösung verwendet.

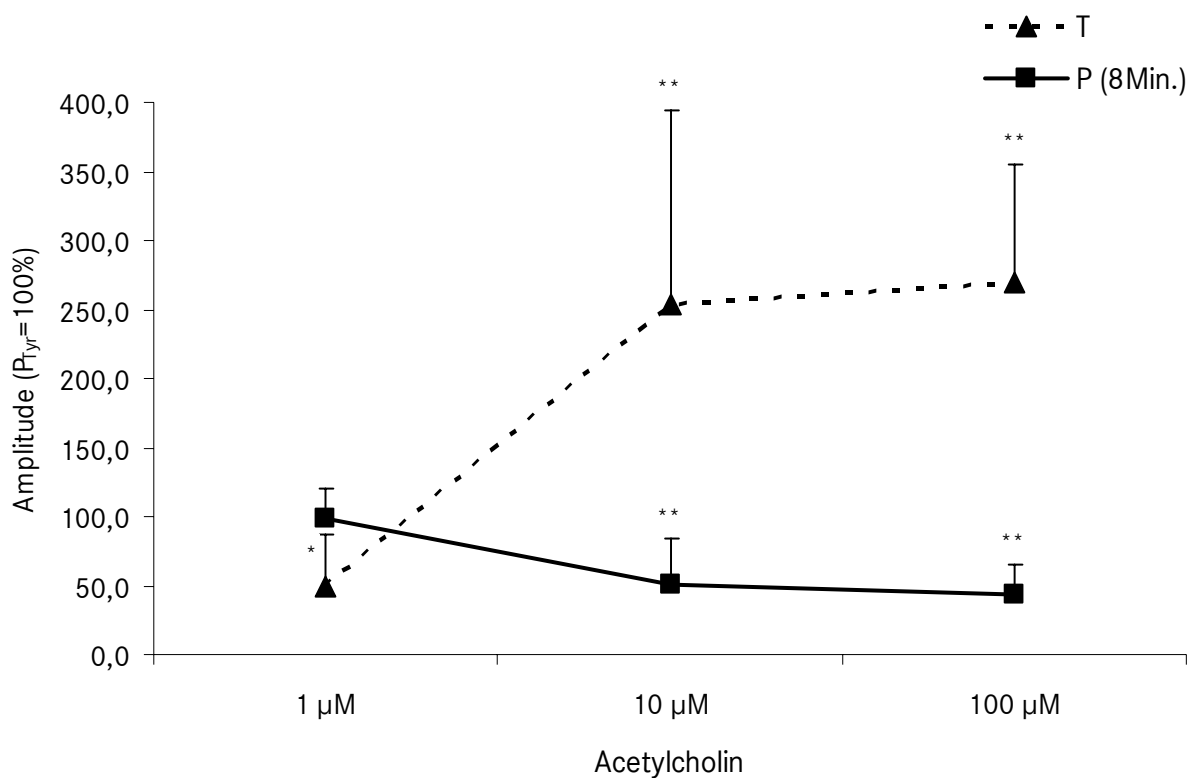


Abb. 13: Wirkung von Acetylcholin auf tonische und phasische Kontraktionen T,  $P_{8\text{Min.}}$  (bezogen auf  $P_{\text{Tyr}}=100\%$ ). MW + SD; für [ $10^{-5}$  M]  $n=22$ , für [ $10^{-6}$ ,  $10^{-4}$  M]  $n=5$ , Signifikanzen bezogen auf  $P_{\text{Tyr}}$  \* $p < 0,05$ , \*\* $p < 0,01$ .

## Einfluss von STW 5 und seinen Einzelnextrakten auf die ACh-induzierte Kontraktion

Die Wirkung von STW 5 und seinen Einzelnextrakten auf die beschriebene ACh-induzierte Kontraktion wurde in zwei verschiedenen experimentellen Protokollen untersucht.

### Wirkung bei gleichzeitiger Applikation von Acetylcholin und Extrakt

Alle pflanzlichen Extrakte [10 µl/ml] verminderten bei gleichzeitiger Applikation mit ACh [10<sup>-5</sup>M] die tonische Kontraktion in ihrer Stärke und Persistenz. Signifikant wurde T durch Pfefferminz, Kamille, Angelikawurzel, Mariendistel und das zum Vergleich eingesetzte Butylscopolamin [10<sup>-5</sup>M] reduziert (Abb. 14).

Die durch ACh reduzierten phasischen Kontraktionen P<sub>8Min.</sub> wurden unterschiedlich beeinflusst: Süß, Mar, Kam, Küm und Pfe verstärkten diesen Effekt, während STW 5 und Iberis amara sowie Bsc diesen abschwächten. Die übrigen Extrakte nahmen durchschnittlich keinen Einfluss (Abb. 15).

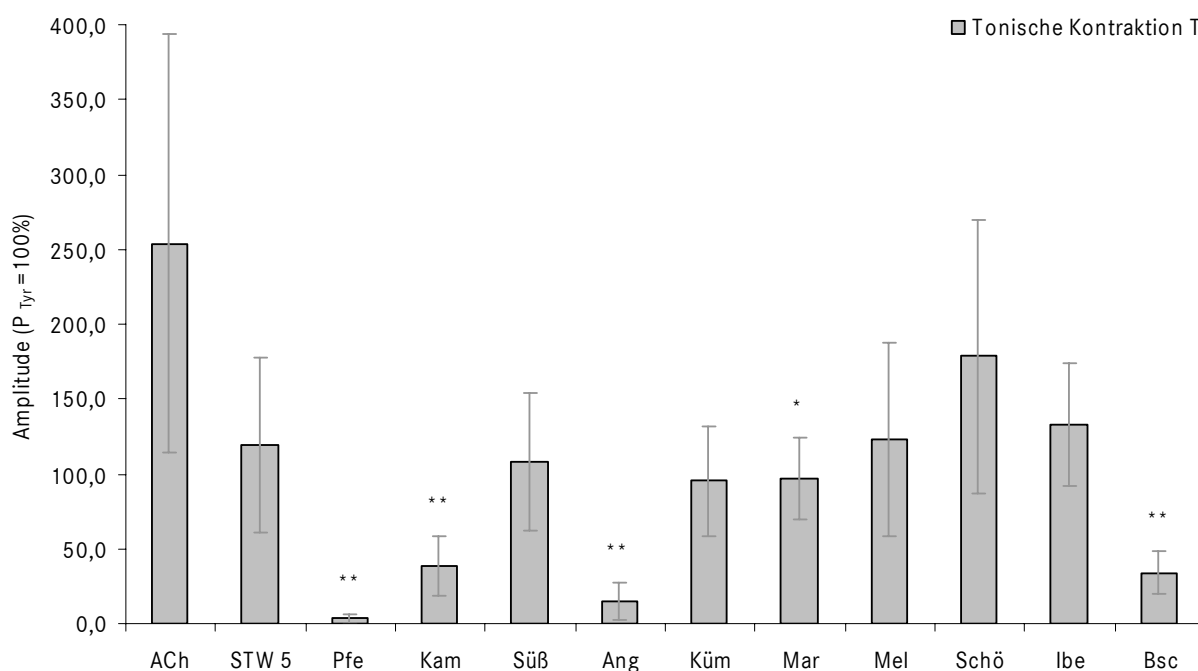


Abb. 14: Einfluss der Extrakte bei gleichzeitiger Applikation mit ACh auf die ACh-induzierte tonische Kontraktion T (jeweils bezogen auf P<sub>Tyr</sub>=100%). Butylscopolamin [10<sup>-5</sup>M] als Vergleich. MW ± SD, für ACh n = 22, für ACh und Extrakte n = 3-8, Signifikanzen gegenüber ACh \*p < 0,05, \*\*p < 0,01.

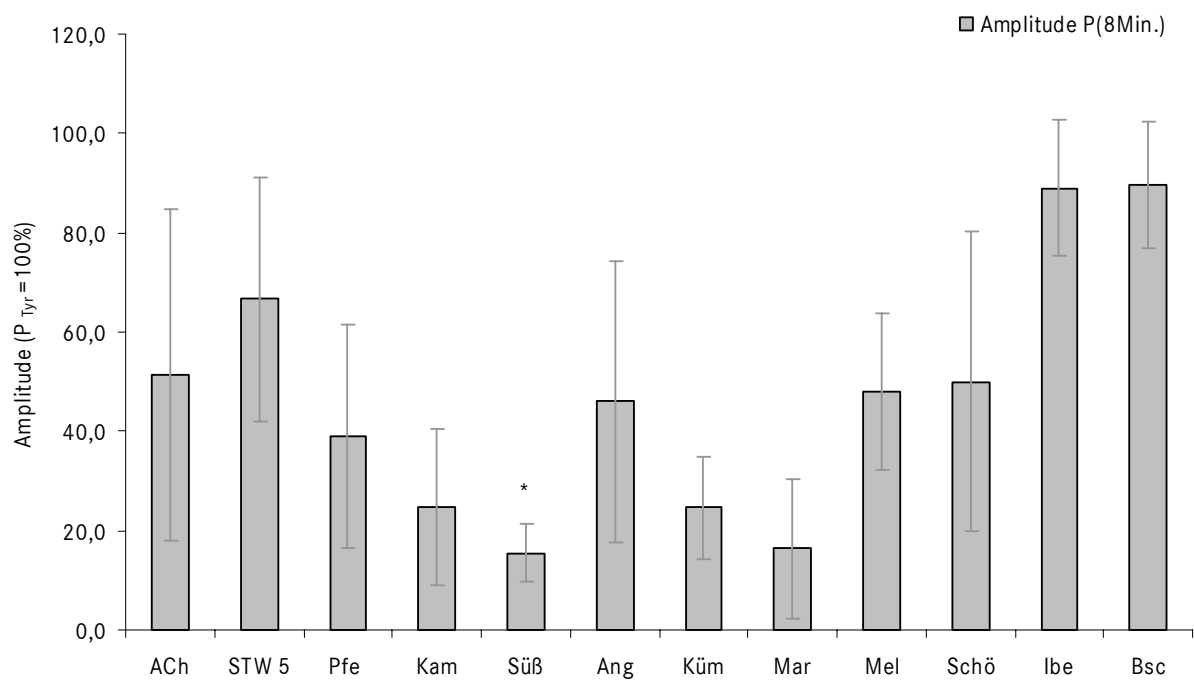


Abb. 15: Einfluss der Extrakte bei gleichzeitiger Applikation mit ACh auf die Amplitude der phasischen Kontraktionen  $P_{8\text{Min.}}$  (jeweils bezogen auf  $P_{\text{Tyr}}=100\%$ ). Butylscopolamin [ $10^{-5}\text{M}$ ] als Vergleich. MW  $\pm$  SD, für ACh  $n = 22$ , für ACh und Extrakte  $n = 3-8$ , Signifikanzen gegenüber ACh  $*p < 0,05$ .

Berücksichtigt man die Wirkung von Acetylcholin auf die Extrakt-vermittelten Effekte, konnte man erkennen, dass ACh-Applikation zu einer Zunahme von  $P_{8\text{Min.}}$  bei STW 5, Pfe, Ang, lbe und Bsc führte (vgl. Kap. 4.1.1.2).

### Wirkung nach Vorbehandlung mit Extrakt

In einem zweiten Modell sollte herausgefunden werden, inwieweit eine Vorbehandlung des Gewebes mit den Extrakten [ $10 \mu\text{l/ml}$ ] deren Wirksamkeit bezüglich der Acetylcholin-Stimulation [ $10^{-5}\text{M}$ ] erhöhen kann. Abb. 3 in Kap.3.1.3 veranschaulicht dieses Vorgehen.

Wie in Abb. 16 dargestellt, führte die Vorinkubation für alle Extrakte außer Kümmel zu einer Reduzierung der tonischen Kontraktion, signifikant war dieser Effekt bei STW 5, Pfefferminz- und Mariendistelextrakt sowie bei dem zum Vergleich untersuchten Bsc [ $10^{-5}\text{M}$ ] zu beobachten.

Ähnliches zeigte sich für  $P_{8\text{Min}}$ . (Abb. 17): STW 5, Kamille und Mariendistel bewirkten nach Vorbehandlung eine signifikante Abnahme der Amplitude, die weiteren Extrakte zeigten tendenziell ebenso eine eher hemmende Wirkung, nur Iberis amara und Bsc schwächten den ACh-induzierten Effekt ab.

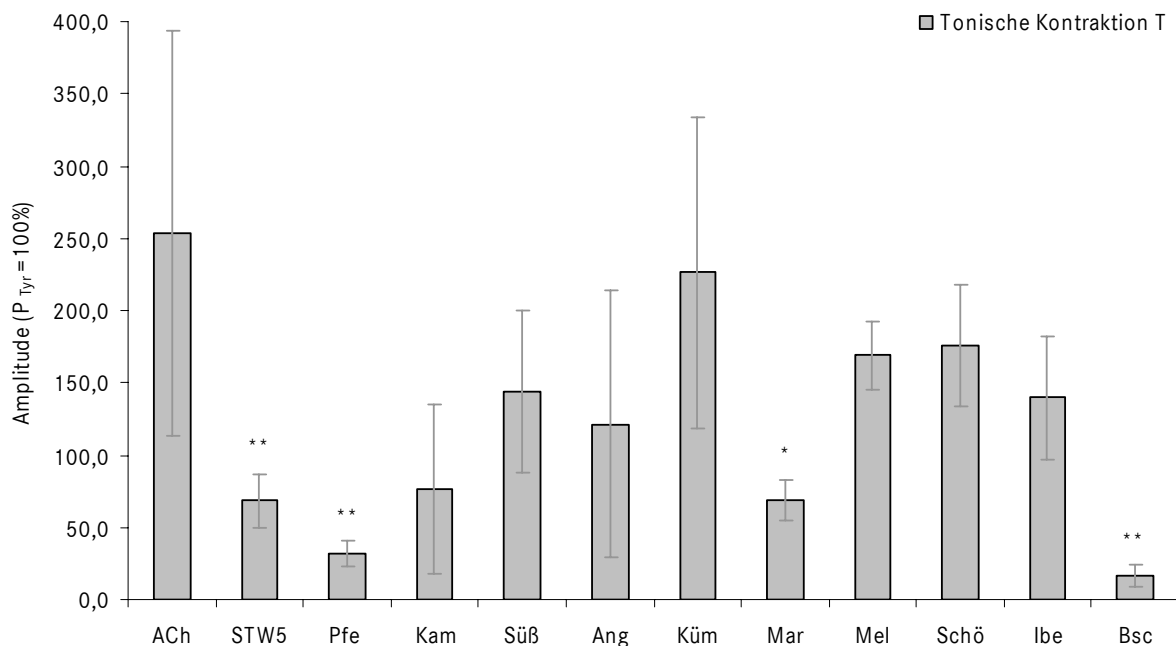


Abb. 16: Einfluss der Extrakte auf die ACh-induzierte Kontraktion T bei vorheriger Perfusion der Präparate mit dem jeweiligen Extrakt (jeweils bezogen auf  $P_{\text{Tyr}}=100\%$ ). Butylscopolamin [ $10^{-5}\text{M}$ ] als Vergleich. MW  $\pm$  SD, für ACh  $n = 22$ , sonst  $n = 3-5$ , Signifikanzen gegenüber ACh \* $p < 0,05$ , \*\* $p < 0,01$ .

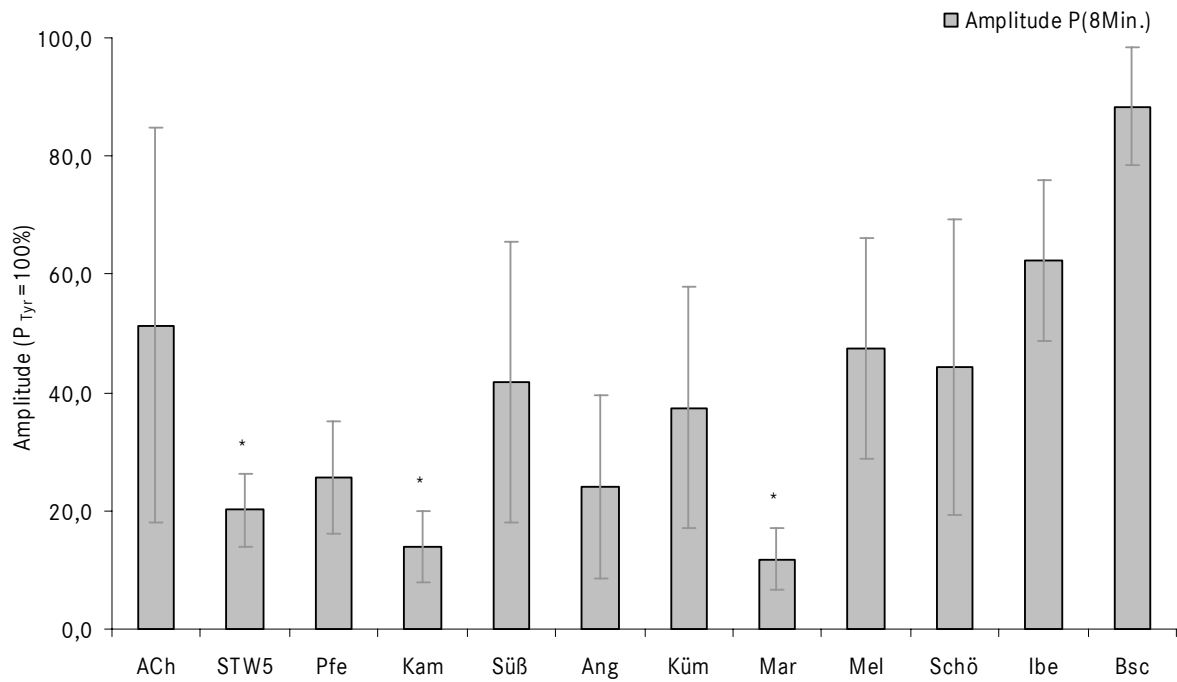


Abb. 17: Einfluss der Extrakte auf die durch ACh reduzierte Amplitude  $P_{8\text{Min.}}$  bei vorheriger Perfusion der Präparate mit dem jeweiligen Extrakt (jeweils bezogen auf  $P_{\text{Tyr}}=100\%$ ). Butylscopolamin als Vergleich. MW  $\pm$  SD, für ACh  $n = 22$ , sonst  $n = 3-5$ , Signifikanzen gegenüber ACh \* $p < 0,05$ .

#### 4.1.2.2 Stimulation mit Prostaglandin $F_{2\alpha}$ und Wirkung von STW 5 und seinen Einzelextrakten

##### Wirkung von Prostaglandin $F_{2\alpha}$

Prostaglandin  $F_{2\alpha}$  ( $PGF_{2\alpha}$ ) induzierte in einer Konzentration von  $10^{-6}M$  eine signifikante transiente tonische Kontraktion von ca. 170 % und eine Erhöhung der Amplitude  $P_{Max}$  bzw.  $P_{8Min.}$  um ca. 20 %, jeweils bezogen auf die Werte der Spontanperistaltik (Abb. 18). Die Frequenz  $F_{Max}$  blieb unverändert, während  $F_{8Min.}$  um  $6,4 \pm 2,0$  % reduziert wurde (nicht signifikant).

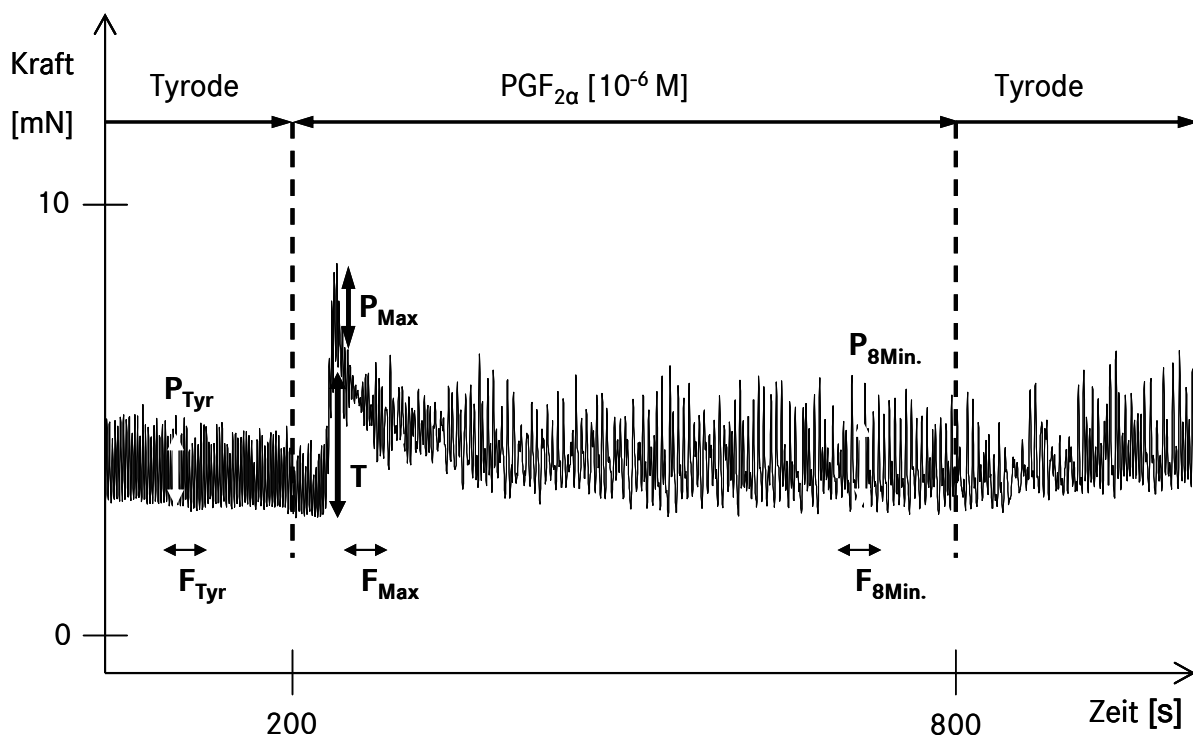


Abb. 18: Einfluss von Prostaglandin  $F_{2\alpha}$  auf die Spontanrhythmik. Ausgewertet wurden  $P_{Max}$  und  $F_{Max}$  während der tonischen Kontraktion T, sowie  $P_{8Min.}$  und  $F_{8Min.}$ , bezogen auf  $P_{Tyr}$  bzw.  $F_{Tyr}$  (=100%).

### Einfluss von STW 5 und seinen Extrakten auf die Prostaglandin $F_{2\alpha}$ -induzierte Kontraktion

Die Wirkung der pflanzlichen Extrakte [10  $\mu$ l/ml] auf die induzierte Kontraktion wurde untersucht, indem die Ileumpräparate vor  $PGF_{2\alpha}$ -Applikation [ $10^{-6}$  M] bereits für zehn Minuten mit dem jeweiligen Extrakt vorperfundiert wurden.

STW 5 und alle Einzelnextrakte hemmten die  $PGF_{2\alpha}$ -induzierten Reaktionen. So trat T zwar bei allen Extrakten auf, jedoch zum Teil signifikant reduziert gegenüber alleiniger  $PGF_{2\alpha}$ -Applikation. Dies war bei Pfefferminz-, Kamillen-, Angelikawurzel-, Süßholzwurzel- und Mariendistel-Extrakt zu beobachten, sowie bei Vorperfusion mit STW 5. Auch das zum Vergleich getestete Bsc [ $10^{-5}$  M] hemmte T signifikant (Abb. 19).

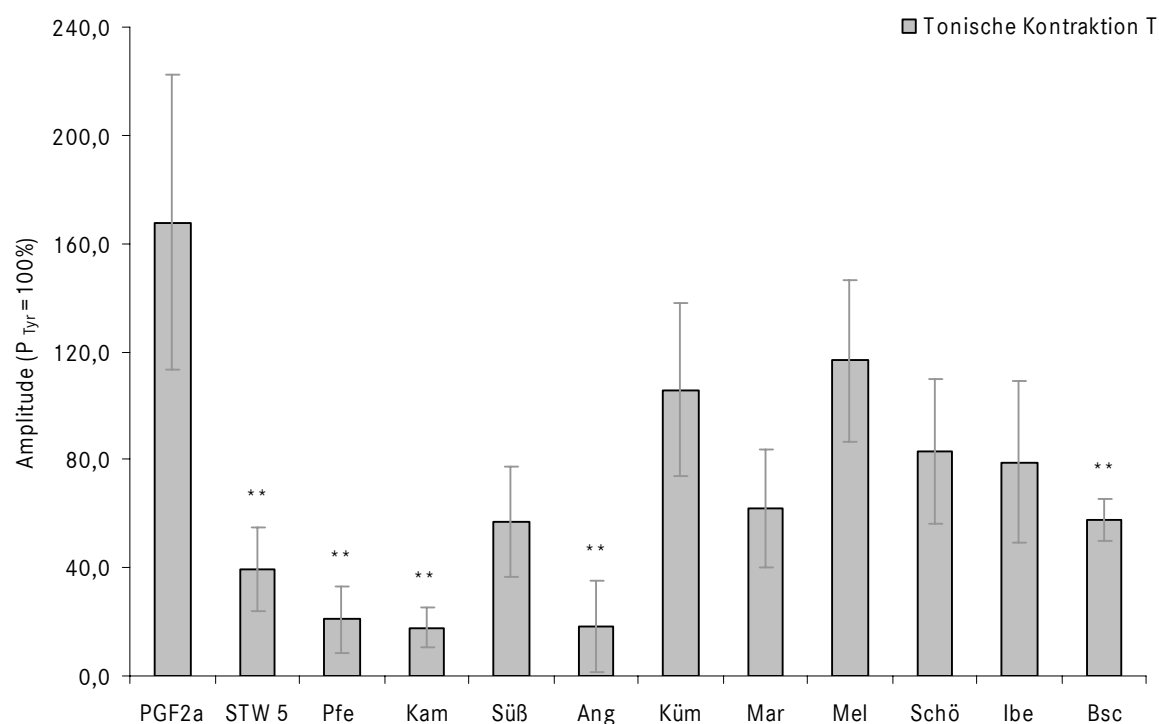


Abb. 19: Einfluss von STW 5 und seinen Einzelnextrakten auf die  $PGF_{2\alpha}$ -induzierte tonische Kontraktion T (jeweils bezogen auf  $P_{Tyr}=100\%$ ).  $MW \pm SD$ , für  $PGF_{2\alpha}$   $n=12$ , sonst  $n=3-6$ , Signifikanzen gegenüber  $PGF_{2\alpha}$  \* $p < 0,05$ , \*\* $p < 0,01$ .

Die unter  $PGF_{2\alpha}$ -Applikation vergrößerten Amplituden  $P_{Max}$  und  $P_{8Min}$  wurden insbesondere durch Vorperfusion der Darmpräparate mit Pfefferminz, Kamille, Süßholzwurzel, Angelikawurzel und Mariendistel signifikant gehemmt (Abb. 20).

Zu berücksichtigen ist jedoch auch die Wirkung von  $PGF_{2\alpha}$  auf die Extrakt-vermittelten



Effekte. Hier konnte festgestellt werden, dass  $\text{PGF}_{2\alpha}$ -Applikation zu einer persistenten Zunahme der Amplitude der phasischen Kontraktionen von STW 5, Pfefferminz, Kamille und Angelikawurzel führte (vgl. Kap. 4.1.1.2).

Extrakte aus Kümmel, Mariendistel, Melisse, Schöllkraut, Iberis amara und das zum Vergleich eingesetzte Bsc zeigten schwach ausgeprägte, inhibitorische Wirkung auf die  $\text{PGF}_{2\alpha}$ -induzierten vergrößerten Amplituden, aber umgekehrt bewirkte  $\text{PGF}_{2\alpha}$  hier auch nur eine geringe Zunahme der Amplitude gegenüber der vorangegangenen alleinigen Extraktperfusion.

Die Frequenz  $F_{\text{Max}}$  wurde durch die Extrakte nicht beeinflusst, während  $F_{8\text{Min}}$  tendenziell reduziert wurde, vor allem durch Pfefferminz-, Kamillen- und Angelikawurzel-Extrakt.

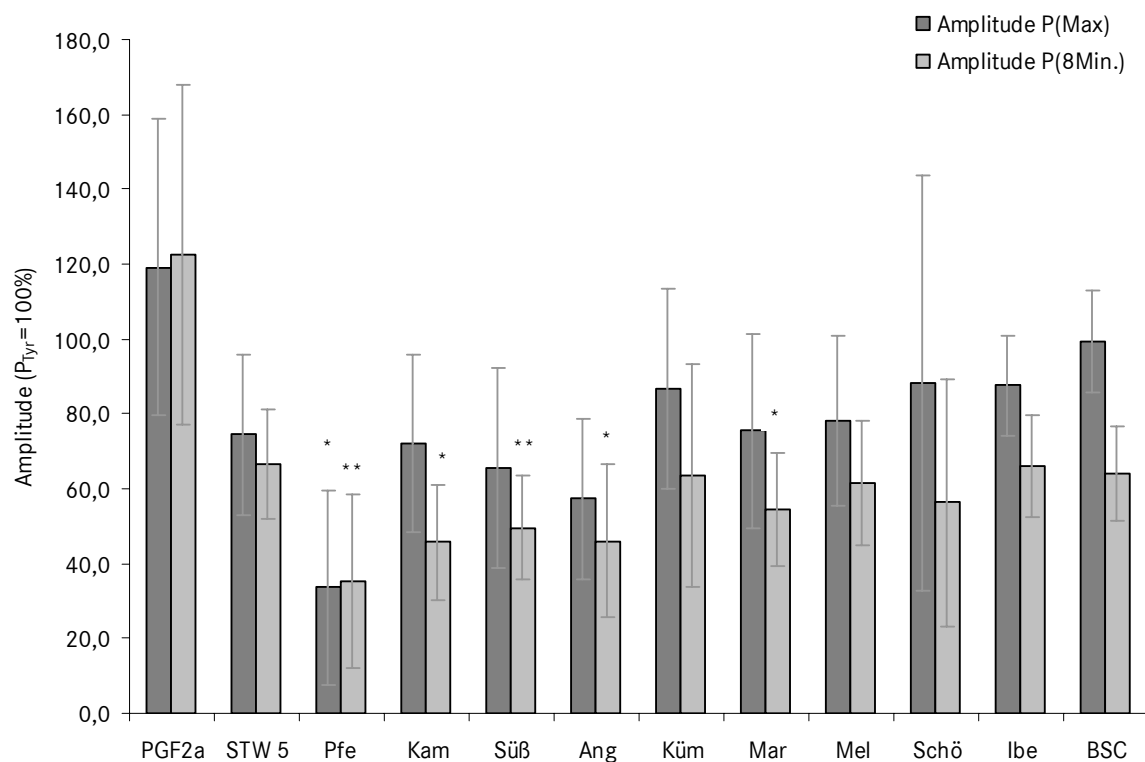


Abb. 20: Einfluss von STW 5 und seinen Einzelextrakten auf die  $\text{PGF}_{2\alpha}$ -induzierten Amplituden  $P_{\text{Max}}$  und  $P_{8\text{Min}}$ . (bezogen auf  $P_{\text{Tyr}}=100\%$ ).  $\text{MW} \pm \text{SD}$ , für  $\text{PGF}_{2\alpha}$   $n=12$ , sonst  $n=3-6$ , Signifikanzen gegenüber  $\text{PGF}_{2\alpha}$  \* $p<0,05$ , \*\* $p<0,01$ .

### 4.1.2.3 Stimulation mit Substanz P und Wirkung von STW 5

#### Wirkung von Substanz P

Während einer 10-minütigen Applikation von Substanz P [10, 100 nM] wurden zwei Effekte deutlich: Einerseits wurde die Amplitude der phasischen Kontraktionen ( $P_{Max}$ ) transient um durchschnittlich ca. 60 % vergrößert. Andererseits trat eine tonische Kontraktion auf (T), die aber noch während der Substanz P-Applikation wieder relaxierte (Abb. 21, 22). Dabei zeigten die eingesetzten Konzentrationen nur geringe Unterschiede: für SP 10 nM konnte eine Tonuszunahme um  $20,8 \pm 12,2 \%$ , für SP 100 nM um  $35,8 \pm 21,6 \%$  registriert werden. Die Frequenz wurde durch Substanz P nicht signifikant beeinflusst. Abb. 21 zeigt eine Originalregistrierung der Messung mit Substanz P-Lösung in einer Konzentration von 100 nM.

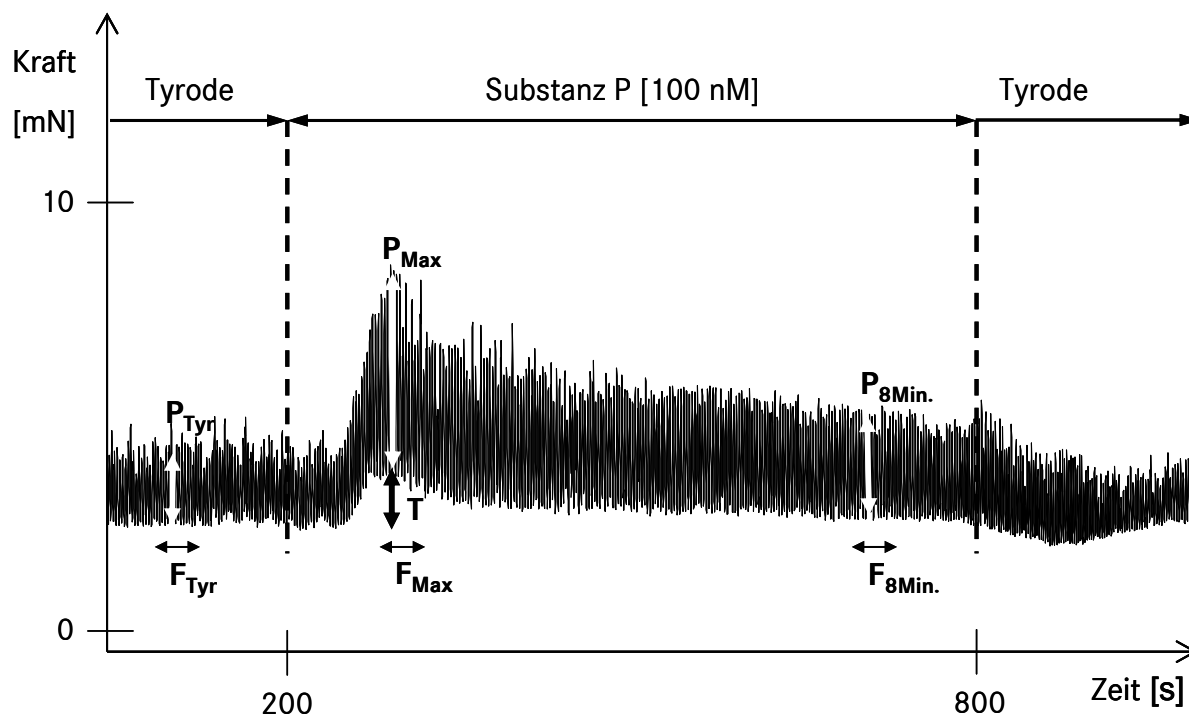


Abb. 21: Einfluss von Substanz P auf die Spontanrhythmik. Ausgewertet wurden  $P_{Max}$  und  $F_{Max}$  während der tonischen Kontraktion T, sowie  $P_{8Min.}$  und  $F_{8Min.}$ , bezogen auf  $P_{Tyr}$  bzw.  $F_{Tyr}$  (=100%).

#### Einfluss von STW 5 auf die Substanz P-induzierte Kontraktion

Bei diesen Untersuchungen wurden die Darmpräparate mit STW 5 [10  $\mu$ l/ml] für zehn Minuten vorbehandelt, bevor Substanz P für zehn Minuten zur STW 5-Lösung appliziert wurde (Originalregistrierung siehe Abb. 4, Kap. 3.1.3)

In Abb. 22 wird deutlich, dass STW 5 die SP-induzierte Zunahme [ $10^{-8}$  M] der phasischen Kontraktionen signifikant verhindern konnte:  $P_{\text{Max}}$  und  $P_{8\text{Min.}}$  wurden um ca. 70 % reduziert. Die tonische Kontraktion wurde dagegen durch STW 5 nicht inhibiert. Das zum Vergleich untersuchte Butylscopolamin [ $10^{-5}$ M] hatte auf die phasischen Amplituden keinen signifikanten Einfluss, hemmte jedoch T signifikant um  $51,8 \pm 35,8$  %.

Die Frequenz der phasischen Kontraktionen ( $F_{8\text{Min.}}$ ) wurde unter Perfusion von SP und STW 5 signifikant um  $43,4 \pm 23,8$  % reduziert. Daran ist auffallend, dass diese Reduzierung deutlich stärker ist als die nach alleiniger STW 5- bzw. SP-Applikation. Butylscopolamin beeinflusste  $F_{\text{Tyr}}$  nicht.

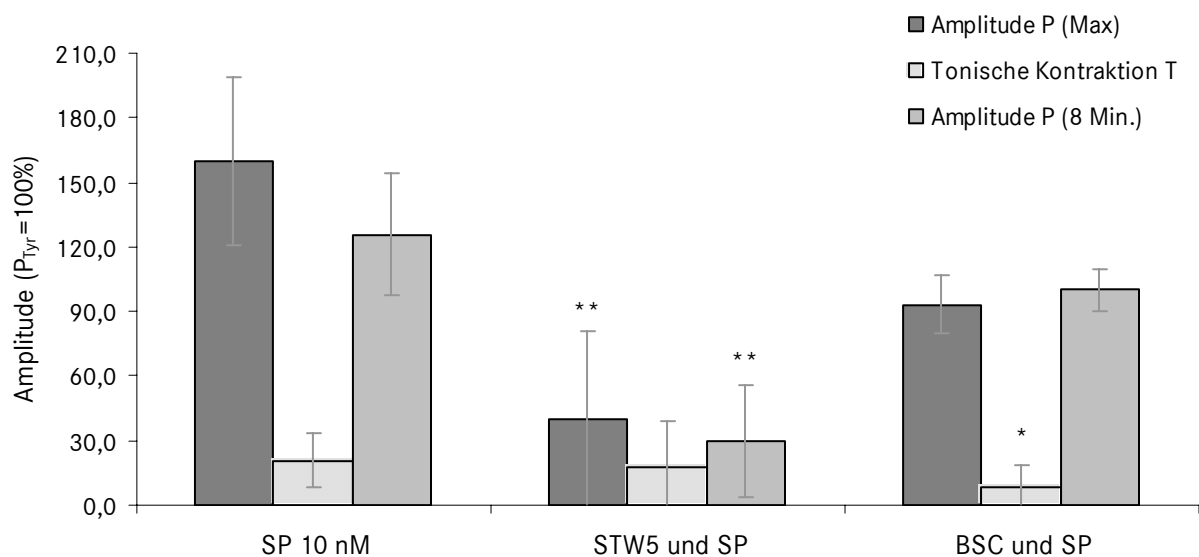


Abb. 22: Einfluss von Substanz P, STW 5 und SP sowie Bsc und SP auf phasische und tonische Kontraktionen  $P_{\text{Max}}$ ,  $P_{8\text{Min.}}$  und T, jeweils bezogen auf  $P_{\text{Tyr}}$  (=100%). MW  $\pm$  SD, n = 3-6, Signifikanzen gegenüber SP \*p < 0,05, \*\*p < 0,01.

In Versuchen, in denen SP in einer Konzentration von 100 nM appliziert wurde, zeigte STW 5 eine schwächere Wirkung:  $P_{\text{Max}}$  wurde nur um  $39,3 \pm 18,0$  % inhibiert, T sogar um  $41,7 \pm 29,6$  % (gegenüber alleiniger SP-Applikation) erhöht, während nur  $P_{8\text{Min.}}$  (um  $83,2 \pm 50,9$  %) und  $F_{8\text{Min.}}$  (um  $12,2 \pm 5,1$  %) signifikant reduziert wurden. Bsc zeigte auf die erhöhte SP-Konzentration keine signifikanten Effekte.

#### 4.1.2.4 Stimulation mit Neurotensin und Wirkung von STW 5

##### Wirkung von Neurotensin

Zunächst wurde die Wirkung von Neurotensin auf die Spontanrhythmik in drei verschiedenen Konzentrationen [1, 10, 100 nM] untersucht. Wie man in Abb. 23 erkennen kann, wurden die Amplitude ( $P_{Max}$ ) und die Frequenz ( $F_{Max}$ ) im Zeitraum einer maximalen Antwort, hier eine auftretende Relaxation (R), und in der achten Minute nach Neurotensin-Applikation ( $P_{8Min.}$ ,  $F_{8Min.}$ ) ausgewertet.

In Abb. 23 und Abb. 24 wird deutlich, dass durch NT nur ein kurzzeitiger Effekt zu beobachten ist: So wurde  $P_{Max}$  dosisabhängig, signifikant verkleinert. Gleichzeitig trat ab einer Konzentration von 10 nM eine signifikante Relaxation auf. Im weiteren Verlauf der Perfusion näherte sich die Amplitude wieder der Standardkontraktion.

Die Frequenz wurde nur in der höchsten Konzentration von 100 nM beeinflusst: Hier trat kurzzeitig eine signifikante Reduzierung um  $18,0 \pm 3,5 \%$  ( $F_{Max}$ ) gegenüber  $F_{Tyr}$  auf.

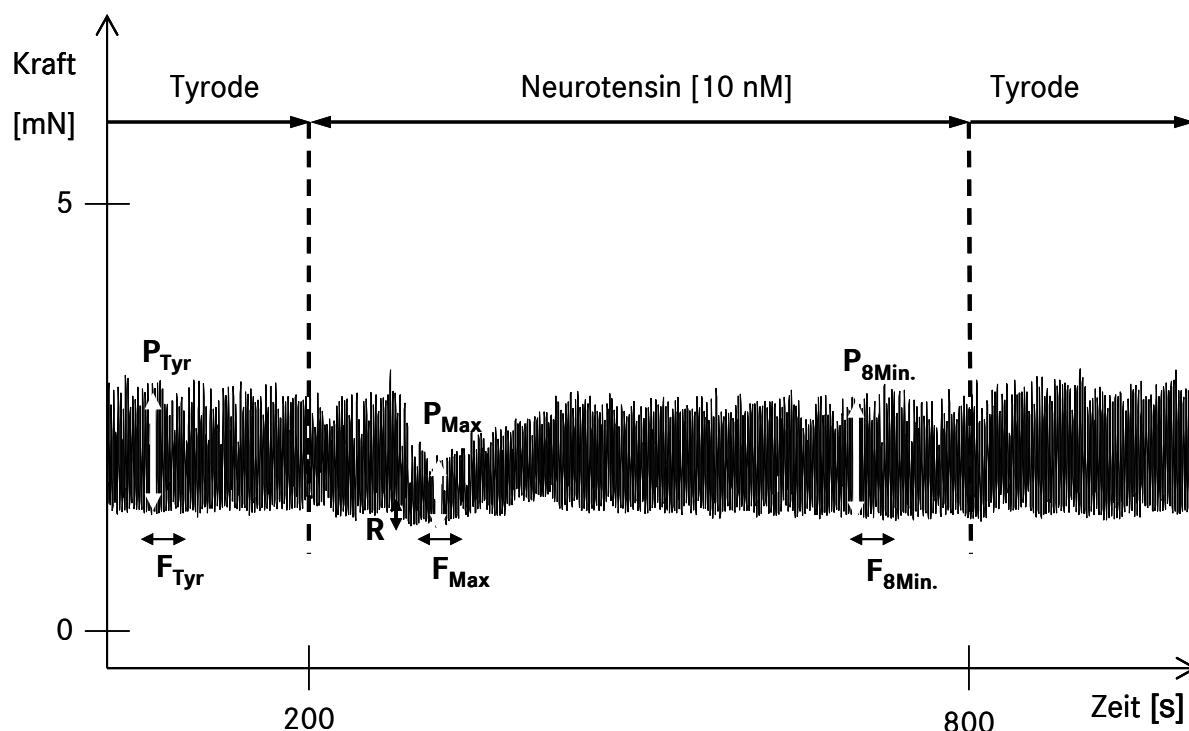


Abb. 23: Einfluss von Neurotensin auf die Spontanrhythmik. Ausgewertet wurden  $P_{Max}$  und  $F_{Max}$  während der auftretenden Relaxation R, sowie  $P_{8Min.}$  und  $F_{8Min.}$ , bezogen auf  $P_{Tyr}$  bzw.  $F_{Tyr}$  (=100%).

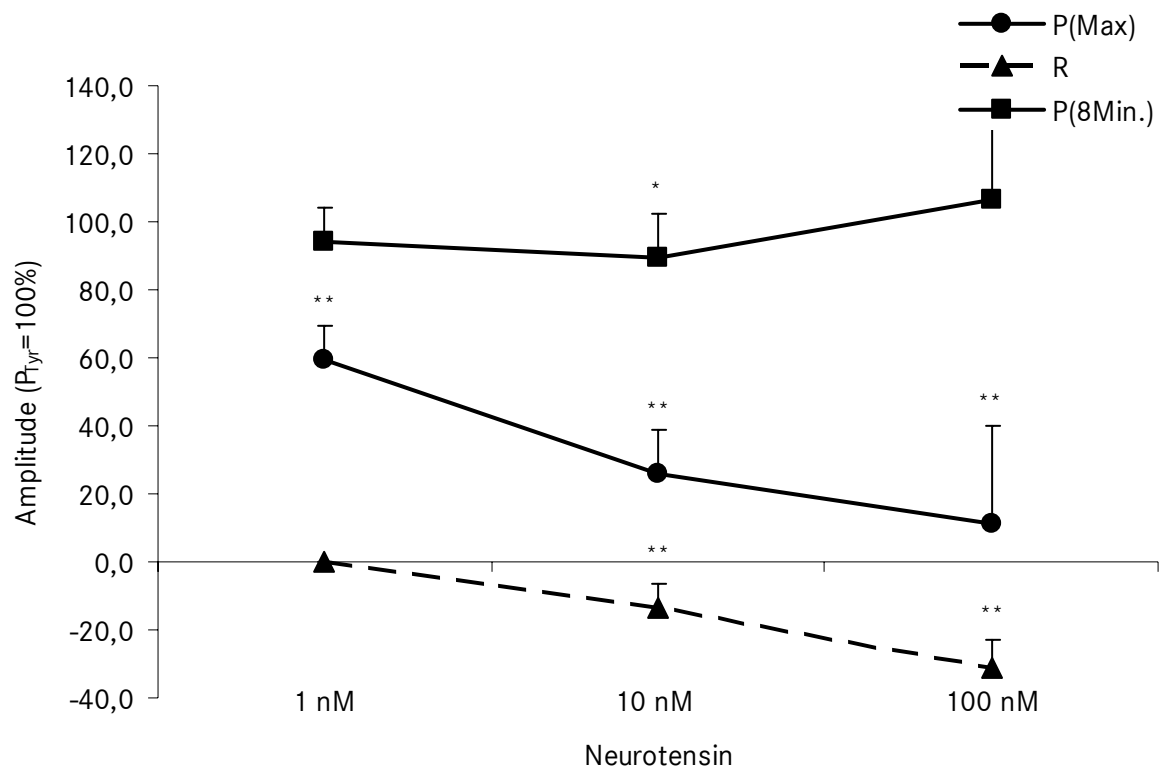


Abb. 24: Wirkung von Neurotensin auf phasische Kontraktionen ( $P_{Max}$ ,  $P_{8Min.}$ ) und Relaxation R (bezogen auf  $P_{Tyr}=100\%$ ). MW + SD, n = 4-9, Signifikanzen gegenüber  $P_{Tyr}$  \* $p < 0,05$ , \*\* $p < 0,01$ .

### Einfluss von STW 5 auf die Neurotensin-induzierte Reaktion

Der Einfluss einer vorausgegangenen 10-minütigen Perfusion mit STW 5 [10  $\mu\text{l}/\text{ml}$ ] auf die oben beschriebenen Reaktionen der NT-Lösung [10nM] sollte untersucht werden. Als signifikanter Unterschied gegenüber der alleinigen Perfusion der NT-Lösung zeigte sich, dass durch STW 5 die Relaxation verhindert wurde.  $P_{8Min.}$  und  $F_{8Min.}$  blieben persistent vermindert (Abb. 25). Hier wurden die inhibierenden Effekte von STW 5 auf die phasischen Kontraktionen erneut deutlich. Das zum Vergleich getestete Butylscopolamin [10<sup>-5</sup>M] zeigte keine signifikanten Effekte gegenüber Neurotensin-induzierten Veränderungen.

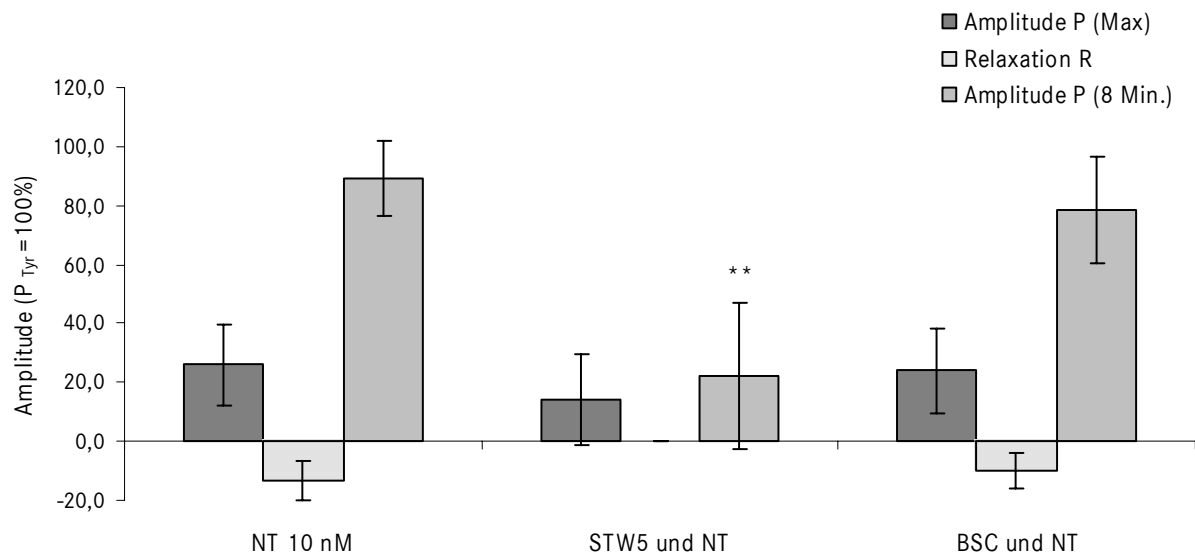


Abb. 25: Einfluss von Neurotensin, STW 5 und NT sowie Bsc und NT auf phasische Kontraktionen ( $P_{Max}$ ,  $P_{8Min.}$ ) und Relaxation R, jeweils bezogen auf  $P_{Tyr}$  (=100%). MW  $\pm$  SD, n = 4-9, Signifikanzen gegenüber NT \*\*p < 0,01.

## 4.2 Untersuchungen am Ileum der GPx1(-/-)-Maus

### 4.2.1 Einfluss von Phytopharmaka bei oxidativem Stress auf das Kontraktionsverhalten des Ileums

In dieser Messreihe sollten Ileumpräparate der WT-Maus mit solchen der GPx1(-/-)-Maus verglichen werden.

Dabei zeigten Präparate der GPx1-defizienten Mäuse eine Spontanrhythmik, deren Kraft und Frequenz nur tendenziell erhöht war: Die mittlere Amplitude betrug  $4,0 \pm 2,6$  mN, bei einer Frequenz von durchschnittlich  $23,6 \pm 4,2$  min<sup>-1</sup>, ermittelt an 38 Ileumpräparaten (m) von 13 Tieren (n).

In den weiteren Versuchen sollte zunächst die Wirkung der Peroxide H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> und *tertiär*-Butylhydroperoxid (*t*BHP) allein, dann in Gegenwart der Phytopharmaka, auf die Kontraktilität des Darms untersucht werden. Letztlich sollte eine Charakterisierung des induzierten oxidativen Stresses durch die Bestimmung der Radikalbildung vorgenommen werden.

#### 4.2.1.1 Wirkung der Peroxide

##### Wasserstoffperoxid

Abb. 26 zeigt eine Originalregistrierung der Darmperistaltik der GPx1-KO-Maus unter dem Einfluss von 500 µM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Die typischen Effekte, wie Stimulation einer tonischen Kontraktion, Beeinflussung der Amplitude und Hemmung der Frequenz traten nach H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>- Applikation [100, 250, 500 und 1000 µM] sowohl bei der GPx1-KO- als auch bei der WT-Maus auf und sind in Abb. 27 und Abb. 28 jeweils in ihrer Dosisabhängigkeit dargestellt.

Deutlich wird bei beiden Genotypen insbesondere die Zunahme des Tonus mit steigender Konzentration. Dieser war durch H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> [100 µM] bei der WT-Maus signifikant gegenüber der GPx1-KO-Maus erhöht, in den Konzentrationen 250 und 1000 µM konnte tendenziell eine vergrößerte tonische Kontraktion der GPx1-KO-Ileumpräparate beobachtet werden. P<sub>Max</sub> wurde bei der GPx1-defizienten Maus bei H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Konzentrationen von 500 und 1000 µM signifikant um ca. 35 % gegenüber P<sub>Tyr</sub> erhöht, im Vergleich zur WT-Maus ergaben sich hier keine signifikanten Effekte. Im

weiteren Perfusionsverlauf nahm  $P_{8\text{Min.}}$  ab, signifikant stärker jedoch nur bei den WT-Präparaten nach  $\text{H}_2\text{O}_2$ -Applikation in den Konzentrationen 500 und 1000  $\mu\text{M}$ .

Die Frequenz  $F_{\text{Max}}$  wurde bei beiden Genotypen in den untersuchten Konzentrationen nicht beeinflusst.  $F_{8\text{Min.}}$  wurde dagegen bei der GPx1(-/-)-Maus tendenziell und bei der WT-Maus dosisabhängig signifikant reduziert, nämlich bei  $\text{H}_2\text{O}_2$ -Konzentrationen von 500 und 1000  $\mu\text{M}$  um  $26,2 \pm 5,5 \%$  bzw. um  $61,1 \pm 44,8 \%$  (Ergebnisse nicht dargestellt).

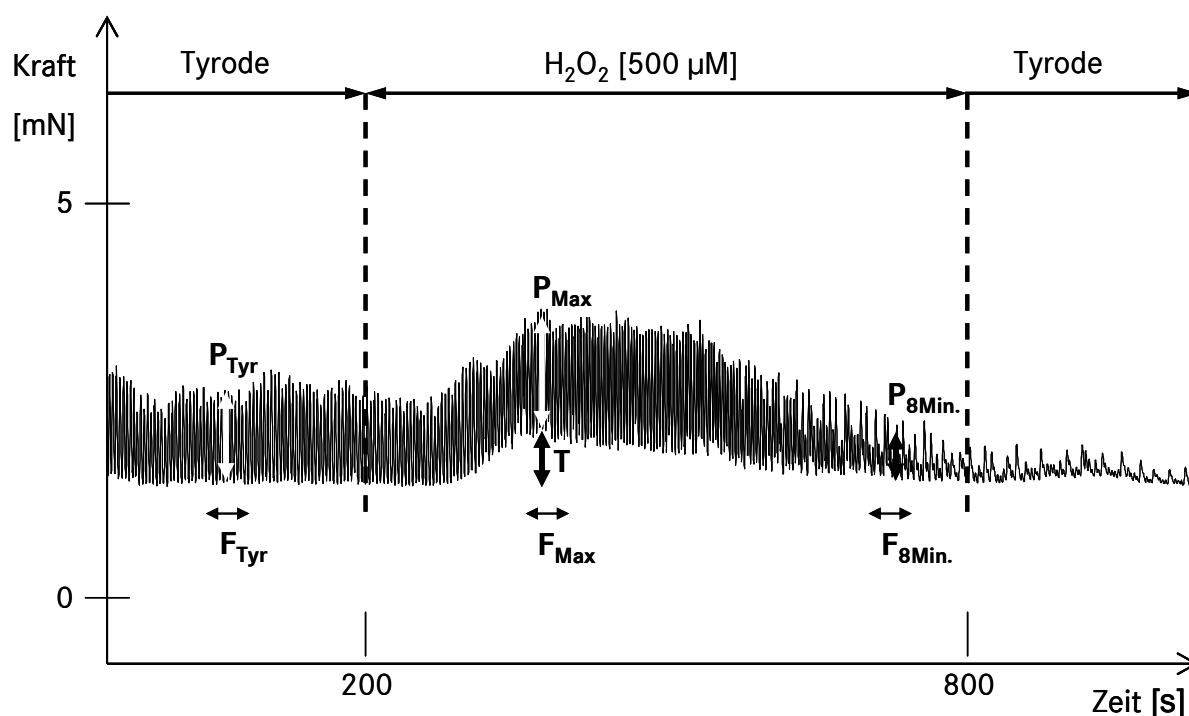


Abb. 26: GPx1(-/-)-Maus: Einfluss von  $\text{H}_2\text{O}_2$  auf die Spontanrhythmik. Ausgewertet wurden  $P_{\text{Max}}$  und  $F_{\text{Max}}$  während der maximalen tonischen Kontraktion T, sowie in der achten Minute nach Applikationsbeginn ( $P/F_{8\text{Min.}}$ ). Alle Werte wurden auf  $P_{\text{Tyr}}$  bzw.  $F_{\text{Tyr}}$  (=100%) bezogen.



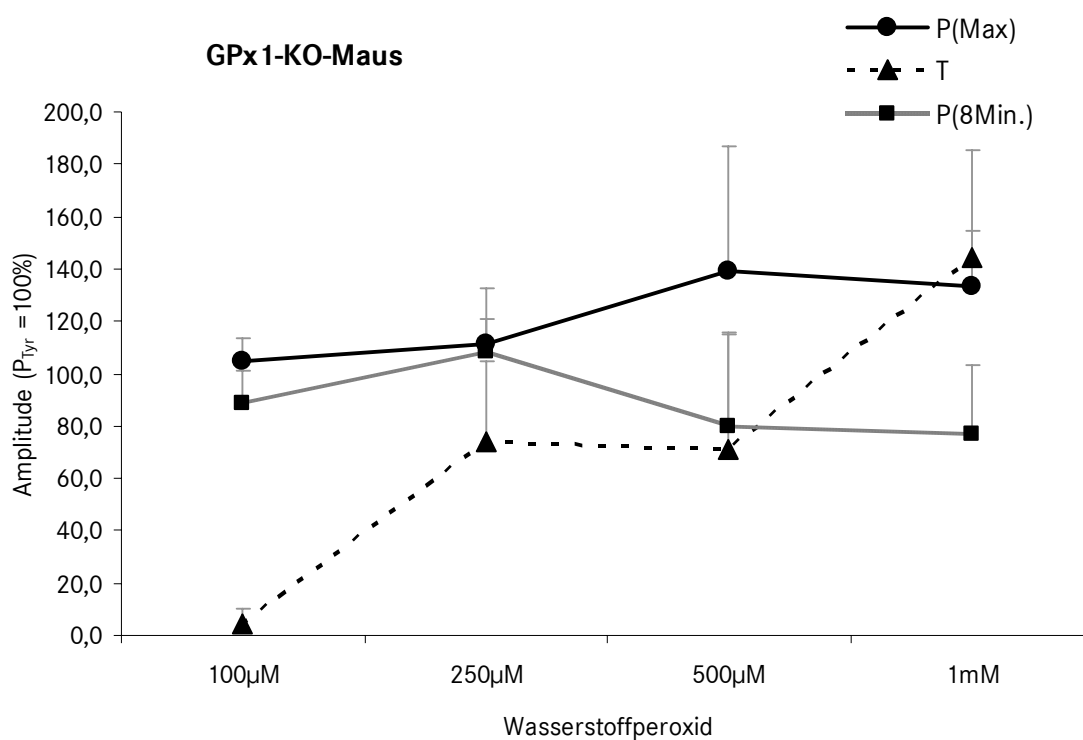


Abb. 27: GPx1-KO-Maus: Wirkung von  $\text{H}_2\text{O}_2$  auf tonische und phasische Kontraktionen T,  $P_{\text{Max}}$ ,  $P_{8\text{Min.}}$  (bezogen auf  $P_{\text{Tyr}}=100\%$ ). MW  $\pm$  SD, für [500  $\mu\text{M}$ ]  $n=13$ , für [100, 250, 1000  $\mu\text{M}$ ]  $n=3-4$ .

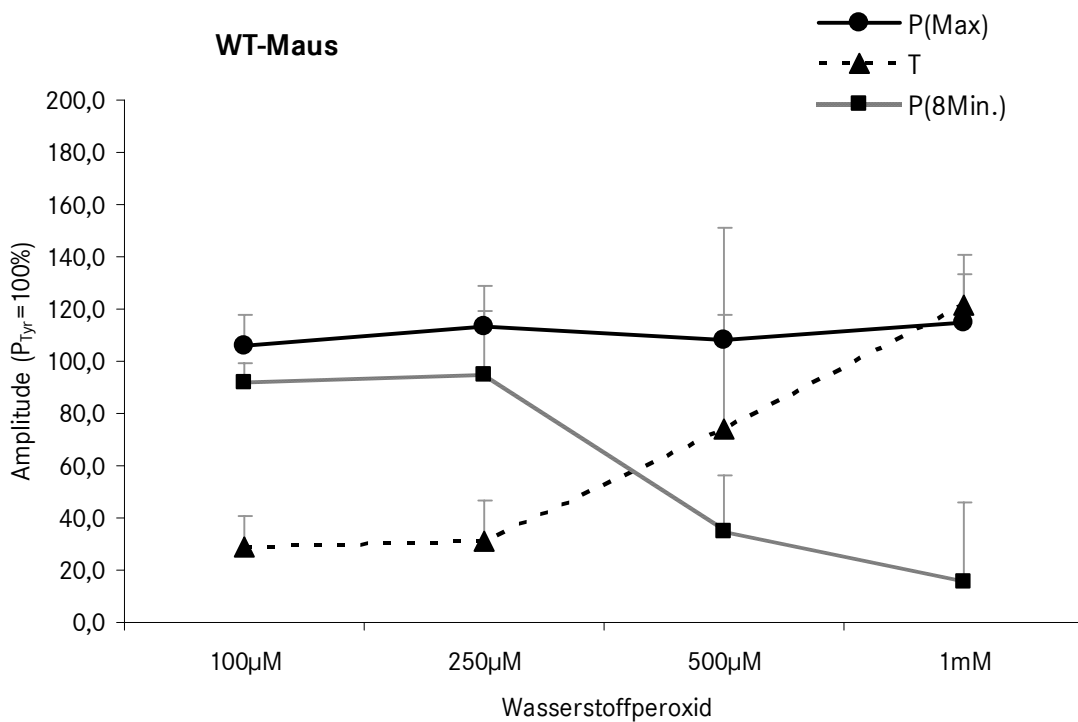


Abb. 28: WT-Maus: Wirkung von  $\text{H}_2\text{O}_2$  auf tonische und phasische Kontraktionen T,  $P_{\text{Max}}$ ,  $P_{8\text{Min.}}$  (bezogen auf  $P_{\text{Tyr}}=100\%$ ). MW  $\pm$  SD, für [500  $\mu\text{M}$ ]  $n=10$ , für [100, 250, 1000  $\mu\text{M}$ ]  $n=3-5$ .

### **tertiär-Butylhydroperoxid**

Die Applikation des organischen Peroxids *t*BHP führte in einer Konzentration von 500  $\mu$ M an Ileumpräparaten der GPx1(-/-)- und der WT-Maus zu ähnlichen Effekten wie  $H_2O_2$ : Bei beiden trat signifikant eine tonische Kontraktion auf,  $P_{Max}$  war währenddessen nur bei der GPx1-KO-Maus signifikant gegenüber  $P_{Tyr}$  vergrößert. Die Amplitude  $P_{8Min.}$  wurde dagegen nur bei der WT-Maus signifikant reduziert (Abb. 29). Die Frequenz wurde bei beiden Genotypen nicht beeinflusst.

Insgesamt zeigt der Vergleich der Ergebnisse, dass zwischen den KO- und den WT-Ileumpräparaten keine statistisch absicherbaren Unterschiede zu finden waren.

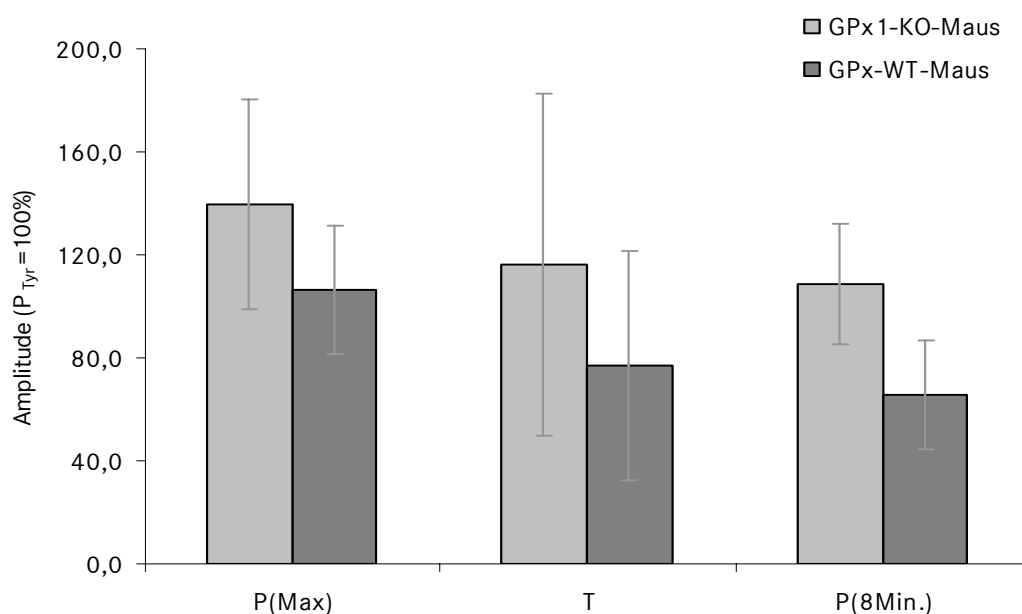


Abb. 29: Wirkung von *t*BHP [500  $\mu$ M] auf tonische und phasische Kontraktionen T,  $P_{Max}$ ,  $P_{8Min.}$  (bezogen auf  $P_{Tyr} = 100\%$ ). MW  $\pm$  SD, n = 6–10.

#### **4.2.1.2 Wirkung von STW 5 und Einzalextrakten auf die Peroxid-vermittelten Effekte**

Aufgrund der limitierten Verfügbarkeit an GPx1-KO-Tieren konnte an diesen Ileumpräparaten nur die Wirkung von STW 5 untersucht werden, daher wurde die Testung aller Einzelfractionen nur an Präparaten von WT-Mäusen vorgenommen.

Abb. 30 zeigt, dass die durch  $H_2O_2$ -hervorgerufene tonische Kontraktion [500  $\mu$ M] durch alle pflanzlichen Extrakte reduziert wurde. Unter Perfusion mit STW 5 sowie mit den stark wirksamen Extrakten aus Pfefferminz, Kamille, Süßholzwurzel, Angelikawurzel und Melisse trat T sogar in einigen Versuchen nicht mehr auf. Auffällig ist die breite Streuung aller Messergebnisse, insbesondere unter Perfusion von Kümmel-, Mariendistel- und Iberis amara-Extrakt, jedoch muss berücksichtigt werden, dass die alleinige Applikation von  $H_2O_2$  bereits zu einer vergleichsweise großen Streuung und damit zu einer hohen Standardabweichung führte.

Betrachtet man die Mittelwerte für T, ist ein synergistischer Effekt des Gesamtextrakts STW 5 anzunehmen, da bereits fünf der enthaltenen Einzalextrakte jeweils höhere Mittelwerte und damit deutlich geringere Wirksamkeit als STW 5 aufweisen. Das zum Vergleich getestete Bsc [ $10^{-5}$ M] reduzierte nur schwach die  $H_2O_2$ -induzierte tonische Kontraktion; die gemessenen Werte streuen auch hier sehr stark.

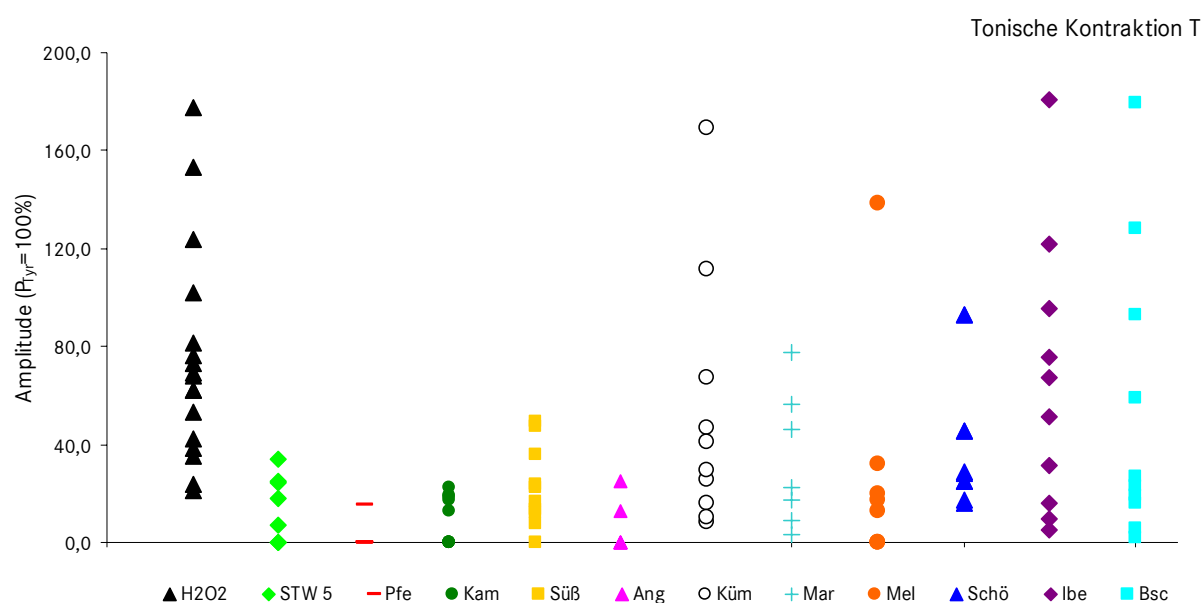


Abb. 30: WT-Maus: Einfluss von STW 5 und seinen Einzelnextrakten auf die  $H_2O_2$ -induzierte tonische Kontraktion T [500  $\mu M$ ]. Alle Messwerte (m) wurden jeweils bezogen auf  $P_{Tyr}$  (=100 %). Für  $H_2O_2$   $n = 10$  ( $m = 17$ ), für die Extrakte  $n = 3-6$  ( $m = 6-12$ ).

Die Amplitude  $P_{Max}$  und die Frequenz  $F_{Max}$  wurden durch die Extrakte aus Pfefferminz, Kamille und Angelikawurzel signifikant gegenüber alleiniger  $H_2O_2$ -Applikation verringert. STW 5 und die übrigen Extrakte, sowie das zum Vergleich untersuchte Bsc zeigten keine charakteristische Wirkung auf die  $H_2O_2$ -vermittelte Reaktion (Abb. 31). Bei einigen Messungen mit STW 5, sowie Extrakten aus Pfefferminz, Angelikawurzel und Melisse waren  $P_{8Min.}$  und  $F_{8Min.}$  nicht auswertbar, da keine spontane Kontraktilität mehr auftrat. Die Vorbehandlung mit Kamillen-, Süßholzwurzel-, Kümmel-, Mariendistel- und Iberis amara-Extrakt reduzierte  $P_{8Min.}$  und  $F_{8Min.}$  ebenfalls, jedoch sind die Streuungen wie in Abb. 32 erkennbar größer.

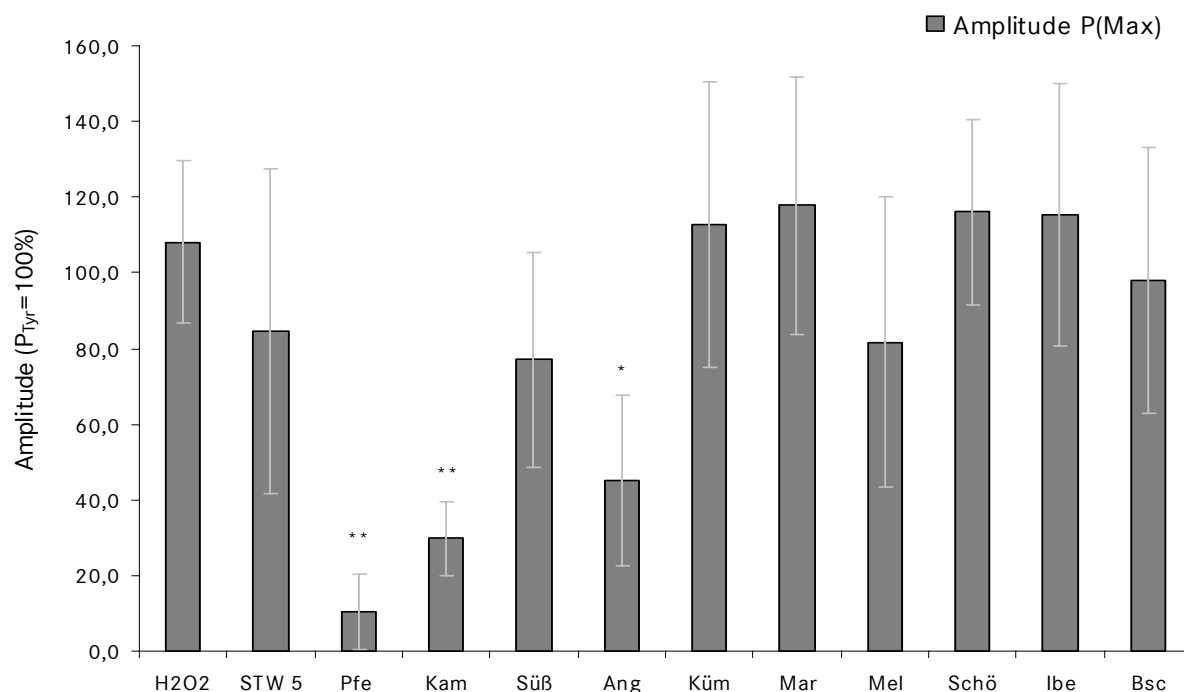


Abb. 31: WT-Maus: Einfluss von STW 5 und seinen Einzalextrakten auf die  $\text{H}_2\text{O}_2$ -induzierte Amplitude  $P_{\text{Max}}$  [500  $\mu\text{M}$ ]. Alle Messwerte (m) wurden jeweils bezogen auf  $P_{\text{Tyr}}$  (=100%). MW  $\pm$  SD, für  $\text{H}_2\text{O}_2$  n = 10 (m = 17), für Extrakte n = 3-6 (m = 6-12), \*p < 0,05, \*\*p < 0,01.

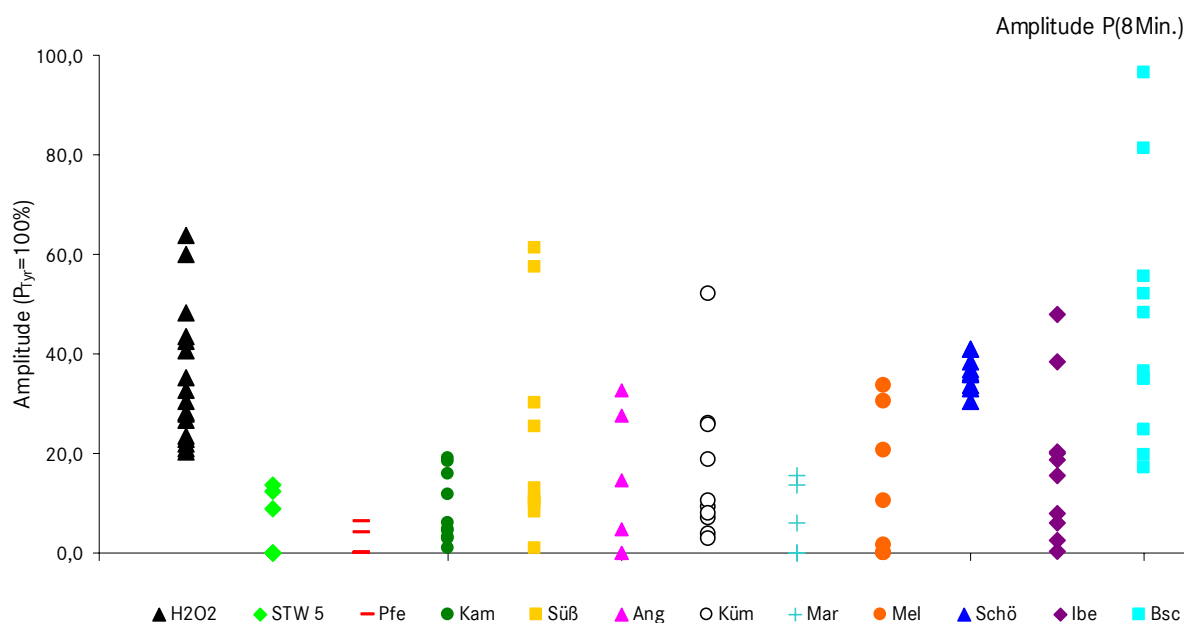


Abb. 32: WT-Maus: Einfluss von STW 5 und seinen Einzalextrakten auf die  $\text{H}_2\text{O}_2$ -induzierte Amplitude  $P_{8\text{Min}}$ . [500  $\mu\text{M}$ ]. Alle Messwerte (m) wurden jeweils bezogen auf  $P_{\text{Tyr}}$  (=100%). Für  $\text{H}_2\text{O}_2$  n = 10 (m = 17), für die Extrakte n = 3-6 (m = 6-12).

Bei den Versuchen mit Präparaten der GPx1-KO-Mäuse zeigte sich ebenso, dass STW 5 [10  $\mu$ l/ml] die H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-induzierte Kontraktion [500  $\mu$ M] inhibieren konnte (Abb. 33). Dabei wurden P<sub>Max</sub> und T gegenüber der alleinigen H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Applikation signifikant vermindert. F<sub>Max</sub> und F<sub>8Min.</sub> wurden nur tendenziell reduziert.

Vergleicht man die Wirkung von STW 5 auf die H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-induzierten Reaktionen der GPx-KO-Maus mit denen der WT-Maus, konnte festgestellt werden, dass sich diese Ergebnisse nur in Bezug auf P<sub>8Min.</sub> signifikant voneinander unterscheiden. Während P<sub>8Min.</sub> bei der GPx1-defizienten Maus noch  $0,43 \pm 0,24$  mN betrug, erreichte P<sub>8Min.</sub> bei der WT-Maus nur  $0,12 \pm 0,10$  mN.

Da jedoch bezüglich P<sub>8Min.</sub> bereits ein signifikanter Unterschied zwischen beiden Genotypen nach alleiniger H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Applikation vorlag, sind auch die signifikanten Unterschiede in den Versuchen mit vorangegangener STW 5-Perfusion erklärbar.

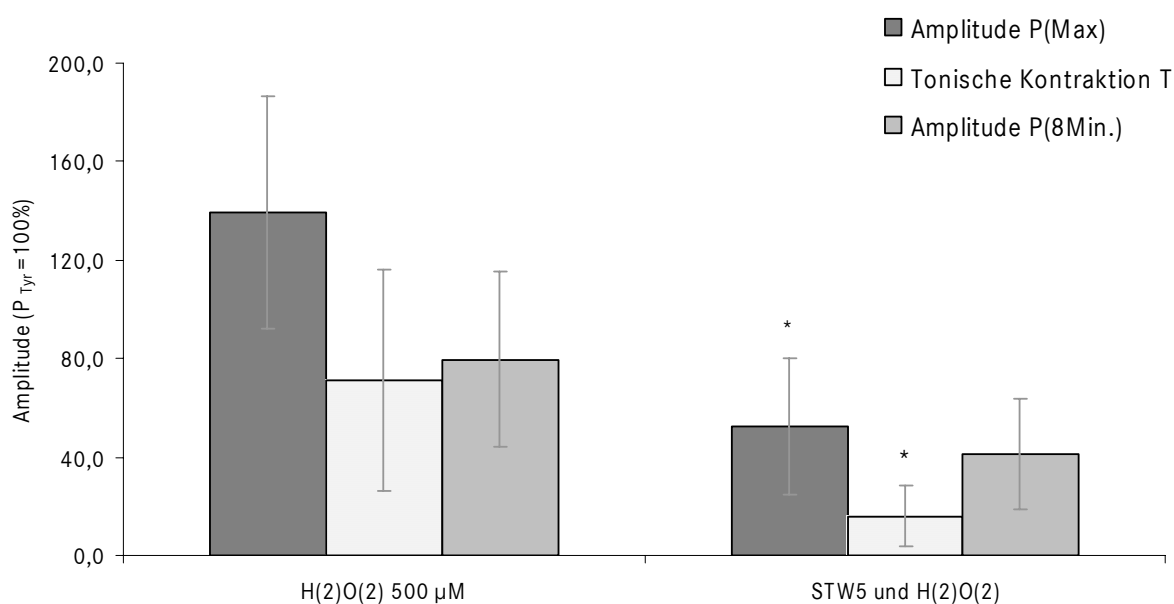


Abb. 33: GPx1-KO-Maus: Einfluss von STW 5 auf die H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-induzierten Effekte (\*p < 0,05). Alle Messwerte wurden auf P<sub>Tyr</sub> (=100%) bezogen. MW  $\pm$  SD, für H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> n = 13, für H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> und STW 5 n = 7.

## 4.2.2 Einfluss von STW 5 auf die Radikalproduktion bei oxidativem Stress

Die Messung der Radikalbildung erfolgte mittels Luminol-vermittelter Chemilumineszenz. Für die Ileumpräparate der GPx1(-/-)- und der WT-Maus war die basale Radikalbildung sehr gering (0,01 RLU) und praktisch nicht von Geräteleerwert zu unterscheiden.

### 4.2.2.1 Einfluss von STW 5 auf die H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-induzierte Radikalbildung

Die Ergebnisse zeigen, dass sowohl in den GPx1-KO- (Tab. 8) als auch in den WT-Präparaten (Tab. 9) H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> dosisabhängig die Radikalproduktion steigert. Ab  $5 \cdot 10^{-4}$  M war dabei die Radikalbildung in den GPx1-defizienten Tieren signifikant gegenüber der der WT-Tiere erhöht.

Der Einfluss von STW 5 auf die vermehrte Radikalbildung wurde zunächst untersucht, indem STW 5 während der H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-induzierten Radikalfreisetzung appliziert wurde. Der Pflanzenextrakt führte in diesem Fall bei beiden Genotypen zu einer starken Abnahme an RLU auf ca. 1 %.

Des Weiteren wurde untersucht, welche Wirkung STW 5 bei Applikation *vor* H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Zugabe [ $5 \cdot 10^{-4}$  M] auf die Radikalproduktion ausübt. Auch hier war deutlich erkennbar, dass die vorangegangene Applikation des Pflanzenextrakts auf das Ileumpräparat (der WT-Maus) zu einer signifikant verminderten Radikalbildung führte. So wurden gegenüber 220,9 RLU/g bei direkter H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Applikation nur 1,82 RLU/g nach STW 5-Vorbehandlung gefunden.

Auffällig bei den Versuchen war, dass die mit Darmproben und H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> gemessenen Werte in der Konzentration von  $10^{-3}$  M kleiner waren als der H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Leerwert (ohne Ileumpräparat). Dies lässt vermuten, dass die im Ileum vorhandene Katalase während der zehnmütigen Messung bereits einen Teil des H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> zu H<sub>2</sub>O und O<sub>2</sub> abbaut.

Aufgrund der breiten Streuung der Messwerte wurden in den folgenden Tabellen neben den Mittelwerten auch noch die Minima und Maxima angegeben. Bei allen Messungen wurde vom Ergebnis bereits der „Leerwert“ der Tyrode-Luminol-Lösung abgezogen.

<b>H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Konzentration</b>	<b>H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Leerwert</b> (ohne Darm) [RLU]	<b>H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Zugabe</b> [RLU]	[RLU/g]	<b>STW 5-Zugabe</b> [RLU]	[RLU/g]
<b>10<sup>-5</sup> M</b>	0,0074 (0,0-0,013)	0,022 (0,005-0,07)	2,08 (0,27-6,4)	0,003 (0,0-0,012)	0,244 (0,0-0,81)
<b>5 * 10<sup>-4</sup> M</b>	0,555 (0,09-0,98)	4,90 (0,87-18,2)	339,2 (172,6-751,1)	0,015 (0,002-0,03)	1,30 (0,18-2,7)
<b>10<sup>-3</sup> M</b>	374,1 (289,3-423,5)	13,72 (1,12-75,1)	1683,6 (54,0-9153,9)	0,026 (0,005-0,1)	2,04 (0,46-8,6)

Tab. 8: H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-stimulierte Radikalbildung in Ileum-Präparaten der **GPx1-KO-Maus** und Hemmung durch STW 5 [10µl/ml]. Angegeben sind die Mittelwerte sowie die Minimal- und Maximalwerte in RLU bzw. RLU/g Gewebe. n = 5-10 (m=12-17).

<b>H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Konzentration</b>	<b>H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Leerwert</b> (ohne Darm) [RLU]	<b>H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Zugabe</b> [RLU]	[RLU/g]	<b>STW 5-Zugabe</b> [RLU]	[RLU/g]
<b>10<sup>-5</sup> M</b>	0,0074 (0,0-0,013)	0,038 (0,006-0,1)	2,81 (0,3-6,97)	0,002 (0,0-0,004)	0,168 (0,0-0,37)
<b>5 * 10<sup>-4</sup> M</b>	0,555 (0,09-0,98)	3,41 (0,67-13,9)	220,9 (63,9-778,1)	0,012 (0,0-0,03)	0,873 (0,0-2,0)
<b>10<sup>-3</sup> M</b>	374,1 (289,3-423,5)	6,24 (1,6-13,8)	472,7 (92,4-1085,6)	0,031 (0,007-0,1)	2,83 (0,44-12,8)

Tab. 9: H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-stimulierte Radikalbildung in Ileum-Präparaten der **WT-Maus** und Hemmung durch STW 5 [10µl/ml]. Angegeben sind die Mittelwerte sowie die Minimal- und Maximalwerte in RLU bzw. RLU/g Gewebe. n = 5-11 (m=12-34).



<b>H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Konzentration</b>	<b>H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Leerwert</b>	<b>STW 5-Zugabe</b>	<b>H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Zugabe</b>		
	(ohne Darm) [RLU]	[RLU]	[RLU/g]	<b>5 * 10<sup>-4</sup> M</b> [RLU]	[RLU/g]
<b>0,5 * 10<sup>-3</sup> M</b>	0,555	0,005	0,338	0,03	1,82
	(0,09-0,98)	(0,0-0,009)	(0,0-0,7)	(0,016-0,05)	(1,18-2,65)

Tab. 10: H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-stimulierte Radikalbildung in Ileum-Präparaten der **WT-Maus** nach vorangegangener STW 5-Applikation [10µl/ml]. Angegeben sind die Mittelwerte sowie die Minimal- und Maximalwerte in RLU bzw. RLU/g Gewebe. n = 3 (m=6).

#### 4.2.2.2 Einfluss von STW 5 auf die tBHP-induzierte Radikalbildung

Auch bei Applikation von tBHP wurde die Radikalproduktion in den Ileumpräparaten dosisabhängig gesteigert. Dabei zeigten die Darmproben der GPx1(-/-)-Mäuse (Tab. 11) nahezu doppelt so hohe RLU-Werte wie die der WT-Tiere (Tab. 12).

STW 5 [10µl/ml] konnte die Radikalbildung bei beiden Genotypen erneut signifikant reduzieren.

Vergleicht man die beiden mit tBHP bzw. H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> durchgeführten Versuchsreihen, so fällt auf, dass mit H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> sowohl in der Spontanreaktion (ohne Darm) als auch mit Darm ca. 100fach größere Chemilumineszenzwerte gemessen wurden.

<b>tBHP-Konzentration</b>	<b>tBHP-Leerwert</b> (ohne Darm) [RLU]	<b>tBHP-Zugabe</b> [RLU]	[RLU/g]	<b>STW 5-Zugabe</b> [RLU]	[RLU/g]
<b>10<sup>-5</sup> M</b>	0,002 (0,001-0,004)	0,023 (0,007-0,06)	1,70 (0,42-4,6)	0,002 (0,0-0,003)	0,138 (0,0-0,294)
<b>5 * 10<sup>-4</sup> M</b>	0,004 (0,001-0,008)	0,056 (0,03-0,09)	4,29 (2,2-9,4)	0,012 (0,004-0,024)	0,778 (0,32-1,39)
<b>10<sup>-3</sup> M</b>	0,008 (0,004-0,012)	0,196 (0,03-0,59)	17,95 (1,5-76,9)	0,015 (0,008-0,023)	1,19 (0,66-1,72)

Tab. 11: tBHP-stimulierte Radikalbildung in Ileum-Präparaten der **GPx1-KO-Maus** und Hemmung durch STW 5 [10µl/ml]. Angegeben sind die Mittelwerte sowie die Minimal- und Maximalwerte in RLU bzw. RLU/g Gewebe. n = 3-6 (m=5-8).

<b>tBHP-Konzentration</b>	<b>tBHP-Leerwert</b> (ohne Darm) [RLU]	<b>tBHP-Zugabe</b> [RLU]	[RLU/g]	<b>STW 5-Zugabe</b> [RLU]	[RLU/g]
<b>10<sup>-5</sup> M</b>	0,002 (0,001-0,004)	0,006 (0,001-0,02)	0,43 (0,07-1,15)	0,004 (0,001-0,007)	0,29 (0,07-0,5)
<b>5 * 10<sup>-4</sup> M</b>	0,004 (0,001-0,008)	0,031 (0,012-0,07)	1,91 (0,7-5,04)	0,006 (0,0-0,02)	0,36 (0,0-0,99)
<b>10<sup>-3</sup> M</b>	0,008 (0,004-0,012)	0,046 (0,007-0,08)	3,56 (0,55-5,87)	0,004 (0,0-0,012)	0,34 (0,0-0,98)

Tab. 12: tBHP-stimulierte Radikalbildung in Ileum-Präparaten der **WT-Maus** und Hemmung durch STW 5 [10µl/ml]. Angegeben sind die Mittelwerte sowie die Minimal- und Maximalwerte in RLU bzw. RLU/g Gewebe. n = 4 (m=8-14).

## 4.3 Untersuchungen an humanen Ileum-Präparaten

### 4.3.1 Einfluss von STW 5 auf die spontane Kontraktilität

In diesen ersten orientierenden Versuchen konnte in humanen Ileumpräparaten im Gegensatz zu den Gewebeproben der Mäuse keine stabile konstante Peristaltik gezeigt werden. Nur bei fünf von insgesamt acht erhaltenen Proben (bzw. bei 18 von insgesamt 26 untersuchten Präparaten) trat vorzugsweise am zweiten Messtag nach der Gewebeentnahme eine spontane Peristaltik auf, wobei  $P_{Tyr}$  mit durchschnittlich  $1,3 \pm 0,8$  mN und  $F_{Tyr}$  mit  $4,2 \pm 2,0$  min<sup>-1</sup> sehr gering waren.

STW 5 [10 µl/ml] wurde bei auftretender Spontanrhythmik appliziert und führte zu einer signifikanten Relaxation der basalen Grundspannung von  $-2,8 \pm 1,5$  mN, gefunden an 15 der 18 Präparate. Auch Amplitude und Frequenz wurden gehemmt:  $P_{8Min.}$  auf  $0,43 \pm 0,5$  mN und  $F_{8Min.}$  auf  $1,3 \pm 2,0$  min<sup>-1</sup>.

### 4.3.2 Einfluss von STW 5 auf stimulierte Kontraktionen

#### 4.3.2.1 Stimulation mit Acetylcholin und Wirkung von STW 5

Perfusion der Ileumpräparate mit Acetylcholin [ $10^{-5}$ M] führte zu einer signifikanten tonischen Kontraktion, wobei eine maximale Kraftzunahme  $T_{Max}$  von  $14,8 \pm 8,9$  mN (in 6 Proben bzw. 23 Präparaten) gemessen werden konnte (Abb. 34). Acht Minuten nach Beginn der ACh-Applikation war noch ein gesteigerter Tonus von  $4,2 \pm 2,6$  mN ( $T_{8Min.}$ ) messbar.

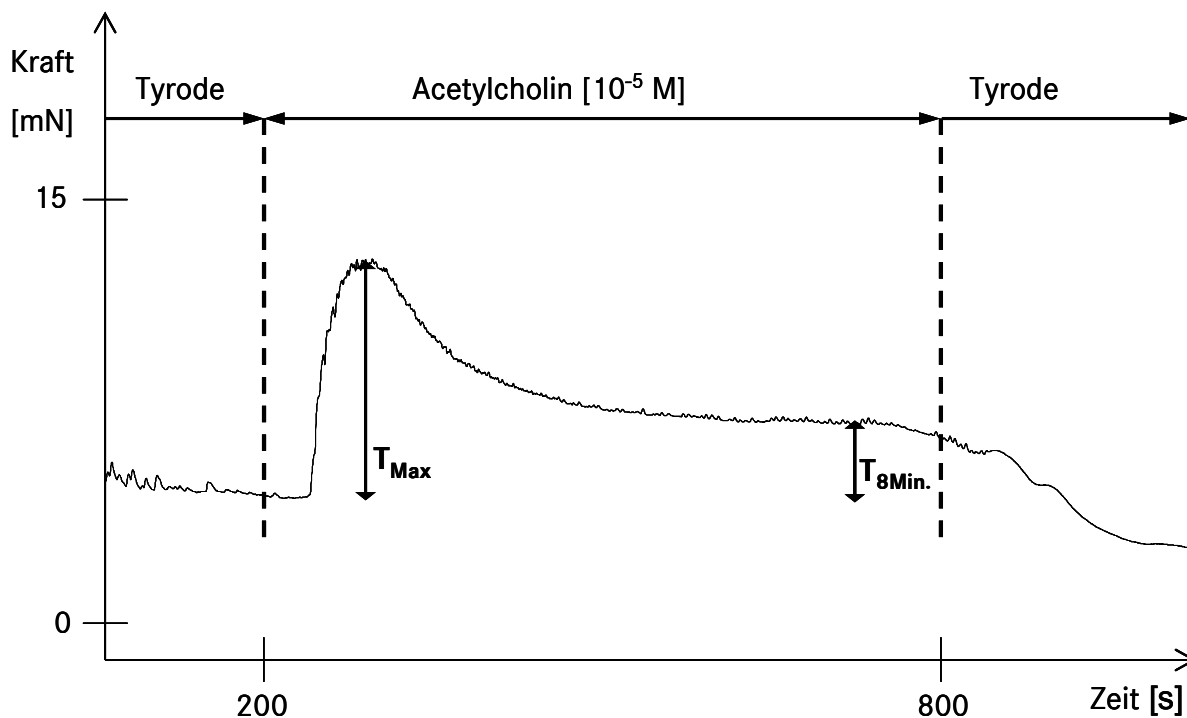


Abb. 34: Wirkung von ACh an einem humanen Ileumpräparat (Beispiel einer Originalregistrierung). Ausgewertet wurde die durch ACh induzierte tonische Kontraktion  $T_{Max}$  sowie  $T_{8Min.}$ .

Untersuchungen zur Wirkung von STW 5 auf die ACh-induzierten Kontraktionen ergaben, dass eine Vorbehandlung des humanen Ileums durch Perfusion mit STW 5 [ $10 \mu\text{l/ml}$ ] vor ACh-Applikation [ $10^{-5}$ M] zu keiner Veränderung der ACh-Reaktion gegenüber der alleinigen Zugabe führte. Weder  $T_{Max}$  noch  $T_{8Min.}$  konnten beeinflusst werden.

#### 4.3.2.2 Stimulation mit Histamin und Wirkung von STW 5

Die Perfusion der humanen Ileumpräparate mit Histamin [ $10^{-5}$ M] führte zu einer signifikanten transienten Kontraktion  $T_{Max}$  von  $13,5 \pm 9,4$  mN, gefunden in 5 Proben bzw. 14 Präparaten. Bei acht der untersuchten Präparate konnte acht Minuten nach Beginn der Histamin-Perfusion kein erhöhter Wert gegenüber dem basalen Tonus gemessen werden (Abb. 35).

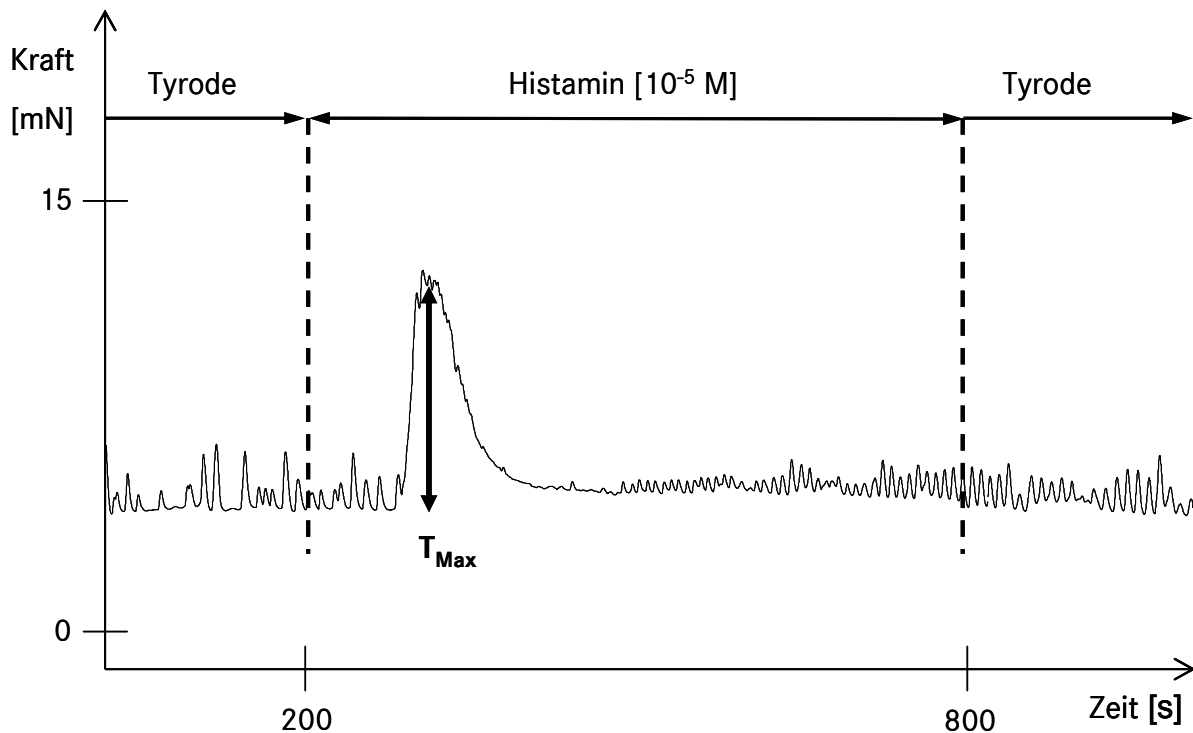


Abb. 35: Wirkung von Histamin an einem humanen Ileumpräparat (Beispiel einer Originalregistrierung). Ausgewertet wurde die durch Histamin induzierte maximale tonische Kontraktion  $T_{Max}$ .

Eine Vorbehandlung mit STW 5 [ $10 \mu\text{l/ml}$ ] vor Histamin-Applikation konnte nur an zwei verschiedenen Darmpräparaten getestet werden, so dass hier keine allgemeingültige Aussage getroffen werden kann. In diesen Versuchen reduzierte die vorangegangene STW 5-Perfusion  $T_{Max}$  jedoch um 15,3 bzw. 17,0 %.

### 4.3.3 Einfluss von STW 5 auf die Radikalproduktion

Humane Ileumpräparate standen ebenfalls für Chemilumineszenz-Messungen zur Verfügung. Die basale Radikalbildung war in diesen gegenüber den Maus-Präparaten (0,01 RLU) weniger konstant und durchschnittlich erhöht (6,84 RLU). Untersucht wurde, analog dem Maus-Modell, die Wirkung von STW 5 [10µl/ml] auf die H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-induzierte Radikalbildung [10<sup>-5</sup>M, 10<sup>-3</sup>M].

Wie man in Tab. 13 erkennen kann, wurde die Radikalbildung im humanen Gewebe durch H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Applikation stark erhöht. Zugabe von H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> [10<sup>-5</sup>M] führte zu 380,8 RLU pro Gramm Ileum, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> [10<sup>-3</sup>M] sogar zu durchschnittlich 3266,2 RLU/g. Demgegenüber war die Radikalbildung deutlich geringer im Ileum der WT-Maus, für H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> [10<sup>-5</sup>M] 2,81 RLU/g und für H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> [10<sup>-3</sup>M] 472,7 RLU/g.

STW 5 konnte die Radikalbildung in den humanen Darmpräparaten signifikant hemmen.

H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> -Konzentration	H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> -Leerwert	H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> -Zugabe		STW 5-Zugabe	
	(ohne Darm) [RLU]	[RLU]	[RLU/g]	[RLU]	[RLU/g]
10 <sup>-5</sup> M	0,0074	7,34	380,8	0,068	4,9
	(0,0-0,013)	(0,3-36,6)	(21,6-1796,9)	(0,04-0,11)	(3,1-5,9)
10 <sup>-3</sup> M	374,1	90,7	3266,2	0,39	22,7
	(289,3-423,5)	(6,3-437,4)	(441,2-7388,8)	(0,02-1,81)	(1,2-83,4)

**Tab. 13:** H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-stimulierte Radikalbildung in humanen Ileum-Präparaten und Hemmung durch STW 5 [10µl/ml]. Angegeben sind die Mittelwerte sowie die Minimal- und Maximalwerte in RLU bzw. RLU/g Gewebe. n = 6-7 (m=19-27).

## 5 Diskussion

### 5.1 Wahl des Untersuchungsmodells

Die multifaktorielle Erkrankung Reizdarmsyndrom hat eine hohe Prävalenz in der Bevölkerung und steht pathophysiologisch in engem Zusammenhang mit Störungen der Motilität und Kontraktilität des Darms. Definitionsgemäß handelt es sich einerseits um eine chronische Erkrankung, weswegen die Compliance in der Therapie mit Phytopharmaka (oder alternativen Therapien) besonders hoch ist. Andererseits wird betont, dass die Symptome durch funktionelle Störungen ohne Organbefund verursacht werden sollen. Daher ist die Entwicklung von tierexperimentellen in vivo-Modellen bisher nicht realisiert. Um dennoch Aussagen zur Wirkung von etablierten Phytopharmaka, die bei RDS eingesetzt werden, machen zu können, verwendeten wir vor allem Ileumpräparate von Standardmäusen und untersuchten Effekte auf die spontane Peristaltik, speziell auf die Amplitude und Frequenz der spontanen Kontraktionen. Zusätzlich wurden Effekte auf durch verschiedene Signalstoffe induzierte Modulationen der spontanen Kontraktilität betrachtet.

Vor dem Hintergrund, dass inflammatorische Reaktionen und damit oxidativer Stress in der Darmwand möglicherweise zur Pathogenese des RDS beitragen, wurden des Weiteren Ileumpräparate aus Mäusen mit ausgeschaltetem Gen für die Glutathionperoxidase1 verwendet. Bei diesen wurde eine gestörte Peroxidengiftung und damit erhöhter oxidativer Stress erwartet.

Letztlich sollten in orientierenden Versuchen an menschlichen Ileumpräparaten, soweit möglich, die am Mäuse-Ileum erhobenen Befunde überprüft werden.

## 5.2 Wirkungen der Phytotherapeutika und Homöopathika auf die spontane Peristaltik

Im Rahmen dieser Arbeit wurde das pflanzliche Fertigarzneimittel Iberogast<sup>®</sup> (STW 5), einschließlich der neun darin enthaltenen Einzelextrakte, sowie verschiedene, bei Verdauungsstörungen indizierte Homöopathika auf ihre Wirkung am Ileum untersucht.

In Messungen der Kontraktilität am Ileum von Standard-Mäusen konnte *in vitro* gezeigt werden, dass die untersuchten pflanzlichen Extrakte, dosiert in 2, 5 und 10 µl/ml, auf unterschiedliche Art die spontan auftretende Peristaltik beeinflussen. Dabei war die Wirkung auf die Amplitude allgemein stärker ausgeprägt als auf die Frequenz.

Die Extrakte aus Pfefferminzblättern, Kamillenblüten und Angelikawurzel zeigten dosisabhängig die stärksten inhibierenden Effekte auf die Amplitude, gefolgt von Süßholzwurzel, Mariendistel Früchten und Melissenblättern. Die Extrakte aus Kümmelfrüchten, Schöllkraut und Iberis amara reduzierten die Amplitude ebenfalls dosisabhängig, wenngleich die Wirkungen nur schwach ausgeprägt waren.

Die Frequenz wurde erst ab einer Extraktkonzentration von 5 µl/ml signifikant beeinflusst, für 2 µl/ml wurden keine signifikanten Effekte gefunden. Während Pfefferminz und Kamille in den Konzentrationen 5 und 10 µl/ml die Frequenz signifikant reduzierten, zeigten Angelikawurzel, Kümmel und Schöllkraut nur in der höheren Dosierung inhibierende Effekte. Für Schöllkraut und Iberis amara [5 µl/ml] wurde eine signifikante Zunahme der Frequenz beobachtet.

Der Gesamtextrakt STW 5 zeigte sowohl auf die Amplitude als auch auf die Frequenz, verglichen mit den Einzelextrakten, eine starke signifikante inhibierende Wirkung. Synergistische Effekte sind anzunehmen, da in den untersuchten Konzentrationen nur zwei der neun Einzelextrakte stärker wirksam waren als STW 5: Pfefferminz und Kamille zeigten eine größere Reduzierung der spontanen Kontraktilität, für die übrigen Extrakte wurden schwächere Effekte beobachtet. Berücksichtigt man darüber hinaus, dass die jeweilige Einzelextrakt-Konzentration im Gesamtextrakt STW 5 ca. 10-fach geringer ist im Vergleich zu den in dieser Arbeit eingesetzten Konzentrationen [10 µl/ml], kann von überadditiven Effekten ausgegangen werden.

Die Spasmolytika Butylscopolamin (Bsc) und Papaverin (Pap) wurden zum Vergleich auf ihre Wirkung auf die Kontraktilität des Ileums untersucht. Bsc blockiert als



kompetitiver Antagonist muskarinerge Cholinrezeptoren, wohingegen Pap über Hemmung der cAMP-spaltenden Phosphodiesterase direkt relaxierend auf die glatte Muskulatur wirkt. In den Kontraktionsmessungen wurde für Bsc [ $10^{-5}$ M] nur ein schwacher Effekt auf die Amplitude gefunden, vergleichbar mit der Wirkung von Kümmel und Iberis amara [5  $\mu$ l/ml], eine Wirkung auf die Frequenz konnte nicht beobachtet werden. Für Pap [ $10^{-5}$  M] konnte eine mittlere Wirksamkeit mit Inhibierung der Amplitude und Frequenz gezeigt werden.

Vergleicht man diese Effekte mit denen der Extrakte auf Amplitude und Frequenz, kann man annehmen, dass die Extrakte die spontanen Kontraktionen möglicherweise eher, ähnlich wie Papaverin, über einen durch intrazelluläre Signalkaskaden erhöhten Gehalt an cAMP und cGMP und damit einen gehemmten Calciumeinstrom relaxieren.

Die hier gefundenen quantitativ unterschiedlichen Wirkungen der Einzextrakte spiegeln sich auch in der bekannten Wirkung einzelner Inhaltsstoffe wieder. So wurde beispielsweise für isoliertes Menthol (aus Pfe) eine Blockade spannungsabhängiger  $Ca^{2+}$ -Kanäle beschrieben, die am Meerschweinchen-Ileum zu einer Relaxation der glatten Muskulatur führte [Hawthorn et al., 1988]. Für die Isoformen des Monoterpens Pinen, welches in Pfefferminz und Angelikawurzel vorkommt, wurden spasmolytische Effekte am Ileum der Ratte nachgewiesen [Sadraei et al., 2001]. Des Weiteren wurde eine relaxierende Wirkung für das Coumarin Osthol (in Angelikawurzel enthalten) beschrieben, die Teng et al. [1994] auf eine unspezifische Hemmung der cAMP- und cGMP-Phosphodiesterasen zurückführen konnte.

Auch für einzelne Flavonoide, wie Apigenin und dessen Glykoside oder Quercetin, enthalten in Kamille und Pfefferminz, sowie für Hydroxyzimtsäuren, wie u.a. die Kaffeesäure (in Pfe, Ang und Kam), konnten spasmolytische Wirkungen gezeigt werden [Trute et al., 1997].

Insbesondere die stark wirksamen Extrakte wie Pfefferminz, Kamille und Angelikawurzel enthalten in sehr großer Anzahl verschiedene Ätherische Öle (Mono- und Sesquiterpene), Flavonoide sowie Polyphenolsäuren mit motilitätsmodulierender Wirkung [Wegener and Wagner 2006], so dass sich deren Wirksamkeit auch aus der Summe der enthaltenen Inhaltsstoffe erklären lässt.

Bereits in früheren Studien wurde der Einfluss von STW 5 und seinen Einzelnextrakten auf die gastrointestinale Motilität untersucht. Heinle et al. [2006] konnten in Versuchen an isolierten Ileumpräparaten von Meerschweinchen differenzierte Effekte zeigen. Schöllkraut führte dabei zu einer signifikanten Steigerung der Kontraktionskraft der spontanen Peristaltik, hingegen wurde diese insbesondere durch Pfefferminz, Melisse und Iberis amara signifikant reduziert.

Ammon et al. [2006] beobachteten, ebenfalls am Meerschweinchen-Ileum, eine spasmolytische Wirkung für STW 5, darüber hinaus konnten sie für Iberis amara einen tonisierenden Effekt am relaxierten Darmmuskel nachweisen.

Offensichtlich gibt es also Spezies-spezifische Unterschiede, die bei der Bewertung der unterschiedlichen Ergebnisse berücksichtigt werden müssen.

Aus der Überlegung nach synergistischen Wirkungsbeziehungen gingen weitere Forschungspräparate hervor, die in den Kontraktionsmessungen untersucht wurden. Die Kombinationspräparate STW5Komb6 (Pfe, Kam, Süß, Küm, Mel, Ibe) und STW5Komb4 (Pfe, Kam, Süß, Ibe) enthalten die genannten Extrakte in veränderter Zusammensetzung gegenüber STW 5. So fehlen in STW5Komb6 die schwach motilitätshemmenden Extrakte Schöllkraut und Mariendistel, dafür wurde der Anteil an Pfefferminz und Kamille verdoppelt bzw. verandert halbfacht. STW5Komb6 inhibierte daher erwartungsgemäß Amplitude und Frequenz stärker.

Für STW5Komb4 wurde wie erwartet eine noch stärkere inhibitorische Wirksamkeit gefunden, die zum einen auf das Fehlen der gering wirksamen Extrakte aus Kümmel und Melisse und zum anderen auf die sechsmal höhere Konzentration an Pfefferminzextrakt (gegenüber STW 5) zurückzuführen ist.

Anders sahen die Ergebnisse für STW5-Ibe aus. Dieses Präparat unterscheidet sich von STW 5 nur durch einen Mangel an Iberis amara-Extrakt, die übrigen Extrakte liegen in unveränderter Konzentration vor. STW5-Ibe zeigte eine deutlich schwächer hemmende Wirkung auf die spontane Motilität als STW 5. Dieses Ergebnis war unerwartet, da für die alleinige Applikation von Iberis amara-Extrakt [5 und 10 µl/ml] nur eine sehr schwache bzw. in vergleichbarer Konzentration wie in STW 5 [2 µl/ml] keine motilitätshemmende Wirkung gefunden wurde. Daher kann man vermuten, dass

der Mangel an Iberis amara im Gesamtextrakt zu deutlich verminderten Wechselwirkungen zwischen den Einzelextrakten führt. Die Aufklärung dieser Synergie-mechanismen bedarf weiterer Untersuchungen.

Anhand zusätzlicher Extrakte sollte die Rolle der Alkaloide im Schöllkraut näher charakterisiert werden. Dafür standen neben dem nativen Schöllkrautextrakt Schö auf 10 % (Schö10) und auf 2 % Alkaloidgehalt (Schö2) abgereicherte Extraktvarianten zur Verfügung, sowie die durch Festphasenextraktion abgetrennte Alkaloidfraktion SchöAlk.

Schö reduzierte die Kontraktionsamplitude signifikant, während Schö10 und Schö2 auf diese tendenziell weniger Einfluss nahmen. Die Alkaloidfraktion führte, bei Applikation in der Konzentration wie in Schö, zu einer Steigerung der Amplitude und einer Reduzierung der Frequenz. Diese Ergebnisse stehen im Gegensatz zu der beschriebenen Wirkung für Schöllkraut-Alkaloide am Meerschweinchen-Ileum, die insbesondere für Chelidonin, Protopin und Berberin spasmolytische Effekte an der glatten gastrointestinalen Muskulatur in den Vordergrund stellt [Hiller et al., 1998].

In einem weiteren Versuch wurden Schö2 und SchöAlk derart kombiniert, dass der Gesamtalkaloidgehalt dem des nativen Extrakts entsprach. Aber auch hier konnte eine tendenzielle Erhöhung der Amplitude und damit eine gegenläufige Wirkung zu Schö gefunden werden.

Eine mögliche Ursache für die Differenzen der Alkaloidwirkung kann sich aus der Fraktionierung ergeben haben. Möglicherweise wurden bei der Festphasenextraktion neben den Alkaloiden auch andere polare Inhaltsstoffe wie bspw. verschiedene Pflanzensäuren abgetrennt, die die Wirkung beeinflussen. Anhand der Analyse der von der Firma Steigerwald zur Verfügung gestellten HPLC-Fingerprints von Schö2 zeigte sich, dass zumindest ein geringer Teil polarer Substanzen ebenfalls extrahiert wurde.

In diesen Versuchen wird deutlich, dass die Beurteilung der Wirksamkeit des Phytopharmakons STW5 nicht allein abhängig gemacht werden kann von der Addition der einzeln nachgewiesenen Wirkungen der Komponenten. Komplexere Mechanismen scheinen schon *in vitro* eine Rolle zu spielen, so dass für eine *in vivo*-Applikation ebenfalls noch unbekannte Wechselwirkungen angenommen werden können.

Homöopathische Lösungen standen als Urtinkturen zur Verfügung, nur Lachesis lag in der Potenz D4 vor. Für die Kontraktilitätsmessungen wurden alle Tinkturen in Tyrode-Lösung 1:100 verdünnt, Chamomilla und Magnesium chlorat. wurden auch in der Verdünnung 1:1000 verwendet, wobei keine Dilutionen nach klassischer homöopathischer Lehre erstellt wurden.

Für Asa foetida, Lachesis und Magnesium chlorat. konnte eine starke inhibierende Wirkung, insbesondere auf die Amplitude der spontanen Motilität, ermittelt werden, gefolgt von Chamomilla, Colocynthis und Lycopodium. Ignatia beeinflusste die Peristaltik nur sehr schwach.

Asa foetida enthält unter anderem Phenolsäuren (und deren Ester) sowie ätherische Öle, wie  $\alpha$ -Pinen und Phellandren. Für diese Inhaltsstoffe konnten Sadraei et al. [2001] eine relaxierende Wirkung am Ileum der Ratte zeigen. Die Lachesis-induzierten Effekte gehen möglicherweise auf die neurotoxischen und zytotoxischen Eigenschaften des Schlangengifts, und damit verbunden auf Wechselwirkungen an Ionenkanälen und auf veränderte Membranpotentiale zurück.

Für die Betrachtung der Magnesium-chloratum-vermittelten Effekte muss die bereits vorhandene Konzentration an Magnesium in der Tyrode-Lösung berücksichtigt werden. Diese betrug 1,2 mM und erhöhte sich in den Versuchen durch die weitere Magnesium-Applikation auf 1,7 mM bzw. auf 6,2 mM. Es wurde deutlich, dass schon eine geringe Erhöhung des  $Mg^{2+}$ -Gehalts zu einer persistenten Reduzierung der Amplitude um ca. 8 %, in der Konzentration von 6,2 mM sogar um ca. 55 % führte.

Es ist anzunehmen, dass Calcium-antagonistische Effekte Ursache der durch Magnesium reduzierten Motilität darstellen.

Die Wirkung von Chamomilla, Colocynthis und Lycopodium beruht auf Inhaltsstoffen mit motilitätsmodulierender Wirkung, bspw. verschiedener Flavonoide (Cham, Lyco) und Phenolsäuren (Colo) [Trute et al., 1997].

Insgesamt konnte ein Nachweis der gastrointestinalen Wirksamkeit der Urtinkturen gezeigt werden, inwieweit diese jedoch zur therapeutischen Wirkung beitragen, kann aus diesen Experimenten nicht geklärt werden.

### **5.3 Wirkungen der Phytotherapeutika auf induzierte Kontraktionen**

Die intestinale Motilität wird durch myogene, reflektorische und zentrale Mechanismen beeinflusst. Dabei spielen sowohl exzitatorische als auch inhibitorische Neurotransmitter und Neuropeptide eine wichtige Rolle.

Daher wurden in dieser Arbeit einerseits die Wirkungen von Acetylcholin, Prostaglandin  $F_{2\alpha}$ , Substanz P und Neotensin auf die Motilität des Ileums registriert, andererseits wurde untersucht, inwieweit diese durch die pflanzlichen Extrakte beeinflusst werden können.

#### **5.3.1 Stimulation mit Acetylcholin und Wirkung von STW 5 und seinen Einzelextrakten**

Acetylcholin ist ein Neurotransmitter an den Endigungen der sympathischen und parasympathischen präganglionären Fasern, der postganglionären Synapse des Parasympathikus und an der motorischen Endplatte. Auch die Erregungsübertragung im enterischen Nervensystem erfolgt an zahlreichen Synapsen durch ACh. Dabei wird durch Bindung an G-Protein-gekoppelte muskarinerge Rezeptoren des Subtyps M3 die  $IP_3$ /DAG-Signalkaskade aktiviert. Es folgt ein Anstieg der intrazellulären  $Ca^{2+}$ -Konzentration, wobei die gastrointestinale Motilität, d.h. Tonus und Frequenz, gesteigert wird.

In den hier vorgestellten Untersuchungen am Ileum der Maus rief ACh dosisabhängig tonische Kontraktionen hervor, sowie eine signifikante Reduzierung der spontanen Kontraktionen der phasischen Rhythmik. Die Effekte der Phytopharmaka auf die Acetylcholin-vermittelte Wirkung wurden anhand von zwei experimentellen Protokollen untersucht.

In der ersten Untersuchungsreihe wurde ACh gleichzeitig mit jeweils einem Pflanzenextrakt appliziert. Dies führte bei Pfefferminz, Kamille, Angelikawurzel, Mariendistel und dem zum Vergleich untersuchten Muskarinrezeptor-Antagonist Butylscopolamin zu einer signifikanten Hemmung der ACh-induzierten tonischen Kontraktion, die übrigen Extrakte sowie STW 5 inhibierten diese nur tendenziell. Die durch ACh reduzierten, spontanen Kontraktionen wurden bei gleichzeitiger Applikation

mit Süßholzwurzel, Mariendistel, Kümmel und Kamille nochmals inhibiert, während sie durch Iberis amara und Bsc gegenüber alleiniger ACh-Reaktion vergrößert wurden. Interessanterweise konnte für die jeweilige ACh-Extrakt-Applikation gegenüber der alleinigen Extrakt-Applikation eine schwächere Inhibierung der spontanen Peristaltik beobachtet werden. Hier spielen möglicherweise auch Wechselwirkungen zwischen ACh und Inhaltsstoffen der Extrakte eine Rolle.

In einer zweiten Messreihe wurde überprüft, ob eine Vorinkubation der Ileumpräparate mit den Extrakten zu differenzierten Ergebnissen gegenüber der gleichzeitigen Extrakt-Acetylcholin-Applikation führt. STW 5 zeigte aufgrund der Vorinkubation eine inhibierende Wirkung auf die ACh-induzierte tonische Kontraktion, Pfefferminz und Mariendistel hemmten diese ebenfalls signifikant, wie bereits im ersten Protokoll. Die Amplitude der phasischen Spontanrhythmik wurde aufgrund der vorangegangenen Extraktperfusion allgemein stärker reduziert, signifikante Effekte waren nun für STW 5, Kam und Mar zu beobachten. Das zum Vergleich untersuchte Bsc inhibierte erneut die ACh-induzierte tonische Kontraktion, zeigte aber keine signifikante Wirkung auf die spontane Peristaltik.

Zusammenfassend konnten wir erkennen, dass eine Vorinkubation der Ileumpräparate mit dem jeweiligen Pflanzenextrakt möglicherweise bessere Rückschlüsse über den Einfluss der Extrakte auf die stimulierte Kontraktion im Ileum zulässt. Ob dies allein durch eine verbesserte Erreichbarkeit der Wirkungsorte durch die Diffusion erzielt wird, oder dadurch, dass die Inhaltsstoffe der Extrakte schon in metabotrope Reaktionen des Ileums eingreifen und dadurch bspw. Rezeptoren blockieren, könnte durch weitere Untersuchungen geklärt werden.

Deutlich wird dieser Effekt auch im Vergleich der Ergebnisse für Butylscopolaminbromid: Als kompetitiver Antagonist an muskarinergen Rezeptoren war die inhibierende Wirkung des Bsc auf den ACh-induzierten Tonus stärker bei vorangegangener Bsc-Applikation gegenüber der gleichzeitigen. In dieser Messreihe zeigte Bsc auch eine allen Pflanzenextrakten überlegene Wirkung auf den Tonus, wobei für STW 5, Pfefferminz und Mariendistel dennoch signifikante Effekte gefunden wurden, so dass hier ebenso eine anticholinerge Wirkung zu erwarten ist.

Spezifische anticholinerge Wirkungen wurden von Simmen et al. [2006] in Versuchen am Intestinum der Ratte *in vitro* gefunden: Sie zeigten für einzelne Inhaltsstoffe,

insbesondere für Cucurbitacine und Glykoside des Kämpferols, wie in *Iberis amara* vorkommend, für Osthol und weitere Hydroxy- und Furanocumarine, wie in Angelikawurzel vorhanden, für N-Malonyltryptophan aus der Mariendistel, sowie für Chelidonsäure und Chelidonin im Schöllkraut hohe Bindungsaffinitäten an muskarinergen M<sub>3</sub>-Rezeptoren.

In Versuchen am Meerschweinchen-Ileum fanden Ammon et al. insbesondere für STW 5, Pfe, Kam und Süß eine inhibierende Wirkung auf die ACh-induzierte Kontraktion, für *Iberis amara* dagegen eher einen agonistischen Effekt [Ammon et al., 2006]. Geringe Abstufungen in der Wirksamkeit der einzelnen Extrakte sind vermutlich auf das unterschiedliche Modell zurückzuführen, so konnte für *Iberis amara* auch am nicht-stimulierten Meerschweinchendarm ein tonisierender Effekt gefunden werden, während wir am nicht-stimulierten Mäusedarm eine spasmolytische Wirkung beobachteten.

### **5.3.2 Stimulation mit Prostaglandin F<sub>2α</sub> und Wirkung von STW 5 und seinen Einzelextrakten**

Prostaglandin F<sub>2α</sub> entsteht auf dem Cyclooxygenase-abhängigen Weg durch Reduktion der zyklischen Endoperoxide Prostaglandin G<sub>2</sub> und H<sub>2</sub> und wird im peristaltischen Geschehen vermehrt freigesetzt, beispielsweise aufgrund einer Aktivierung von Neurotransmittern (Acetylcholin), durch Vagusstimulation und durch mechanische Reize im Darm. Im Ileum stimulieren die Prostaglandine der F-Serie über Bindung an G-Protein-gekoppelte FP-Rezeptoren sowohl die Kontraktilität der longitudinalen als auch der zirkulären Muskelschichten und fördern dadurch die intestinale Transitzeit bzw. die Peristaltik. Jedoch konnte auch in inflammatorischen Prozessen, wie der ulcerativen Colitis, eine gesteigerte PG-Freisetzung nachgewiesen werden [Burakoff et al., 1990].

In unseren Versuchen induzierte die PGF<sub>2α</sub>-Applikation eine signifikante tonische, transient auftretende Kontraktion, verbunden mit einer erhöhten Amplitude der spontanen Peristaltik. Die pflanzlichen Extrakte hemmten insbesondere den Tonus, signifikant war dies bei vorangegangener Perfusion mit Kamille, Angelikawurzel, Pfefferminz, Süßholzwurzel und Mariendistel, sowie mit dem Gesamtextrakt STW 5 und dem zum Vergleich eingesetzten Bsc zu beobachten. Die peristaltischen

Amplituden wurden durch Extrakte aus Pfe, Ang, Süß, Kam und Mar zwar signifikant gegenüber der alleinigen  $\text{PGF}_{2\alpha}$ -Applikation gehemmt, traten aber dennoch gegenüber der alleinigen Extraktperfusion vergrößert auf. Diese Effekte konnten tendenziell auch für STW 5 und Bsc beobachtet werden.

Frantzides et al. [1992] konnten in Untersuchungen am Dünndarm des Hundes feststellen, dass die  $\text{PGF}_{2\alpha}$ -induzierte Kontraktion durch Verapamil, jedoch nicht durch Atropin, Hexamethonium oder Tetrodotoxin inhibierbar war. Daher wird für die exzitatorische  $\text{PGF}_{2\alpha}$ -Wirkung an der glatten Muskulatur ein Calcium-abhängiger, aber neuronal-unabhängiger Mechanismus vermutet [Snetkov et al., 2006].

In mehreren Untersuchungen wurden für Menthol (in Pfefferminz) [Hawthorn et al., 1988; Hills and Aaronson 1991] und Apigenin (in Kamille) [Ko et al., 1991] antagonistische Effekte an Calcium-abhängigen Kanälen beschrieben. Für das in Angelikawurzel enthaltene Osthol konnten Teng et al. [1994] eine Hemmung der  $\text{PGF}_{2\alpha}$ -induzierten Kontraktion der glatten Muskulatur der Meerschweinchen-Trachea zeigen. Diesen Effekt führten sie auf eine Inhibierung der cAMP- und cGMP-Phosphodiesterase zurück.

Diese Befunde geben eine Erklärungsmöglichkeit für die signifikante Reduzierung des  $\text{PGF}_{2\alpha}$ -induzierten Tonus der Ileumpräparate mit Extrakten aus Kamille, Pfefferminz und Angelikawurzel. Für die schwach wirksamen Extrakte aus Kümmel, Melisse und Iberis amara wurden keine Literaturangaben bezüglich einer Wirkung an Calciumkanälen bzw. einer direkten Interaktion mit  $\text{PGF}_{2\alpha}$  gefunden.

### **5.3.3 Stimulation mit Substanz P und Wirkung von STW 5**

Substanz P und Neurotensin sind Neuropeptide, deren Zielzellen u.a. die glatte Muskulatur des Dünndarms sind. Neuropeptide sind allgemein mit klassischen Neurotransmittern, wie z.B. ACh und Noradrenalin, oder auch mit anderen Neuropeptiden in peripheren Nervenfasern kolokalisiert und zeigen im Zusammenspiel mit diesen neuromodulatorische und neuroregulatorische Eigenschaften [Bennett et al., 1992].

Substanz P wird im Intestinaltrakt von Neuronen des Plexus myentericus und Plexus submucosus gebildet und nach vagaler Stimulation freigesetzt. Einerseits greift SP in der intestinalen Peristaltik an den glatten Muskelzellen an, wodurch über G-Protein-



gekoppelte-Neurokinin-Rezeptoren und Aktivierung der  $IP_3$ -Signalkaskade Calcium aus intrazellulären Speichern freigesetzt wird. Andererseits wirkt SP entweder direkt oder indirekt über Stimulation cholinerg Neurone wie ACh im enterischen Nervensystem [Holzer and Lippe 1984]. Daneben spielt SP auch pathophysiologisch eine Rolle im Schmerzgeschehen, bei Entzündungsprozessen, Darminfektionen und immunologischen Störungen [Herbert and Holzer 2002a; Mayer et al., 1988; Schneider et al., 2001]. So wurde in entzündetem Darmgewebe eine erhöhte Neurokinin1-Rezeptordichte und eine vermehrte SP-Konzentration gefunden, wodurch eine gesteigerte Kontraktilität anzunehmen ist [Depoortere et al., 1999; Herbert and Holzer 2002b].

SP führte am Ileum der Maus *in vitro* zu einer transienten tonischen Kontraktion, verbunden mit einer vergrößerten Amplitude der spontanen Kontraktilität. Da mit steigender Konzentration an Substanz P nur noch eine schwache Zunahme des Tonus beobachtet werden konnte, war möglicherweise in einer Konzentration von 10 nM Sättigungsverhalten erreicht.

Um die direkte Wirkung von STW 5 auf die SP-induzierte Reaktion zu ermitteln, wurden die Darmpräparate vor SP-Applikation mit STW 5 perfundiert. In den Ergebnissen wurde deutlich, dass STW 5 zwar die Amplitude signifikant inhibierte, jedoch keinen Einfluss auf den SP-induzierten Tonus ausübte. Durch SP in einer Konzentration von [100 nM] wurde dieser sogar gegenüber alleiniger SP-Applikation erhöht. Demgegenüber reduzierte Bsc die tonische Kontraktion etwa um die Hälfte, zeigte aber keine signifikanten Effekte auf die peristaltische Amplitude. Da, wie oben beschrieben, SP zu einer Aktivierung kolokalisierter Neurotransmitter und -peptide führt, erscheint es möglich, dass Bsc auf diese antagonistisch und somit inhibierend auf den Tonus wirkt. Für STW 5 kann hingegen eher eine Interaktion mit den Neurokinin-Rezeptoren als möglicher Wirkmechanismus angenommen werden, da sich die Ergebnisse deutlich von den mit Bsc gemessenen unterscheiden und eine signifikante Reduzierung der Amplitude der spontanen Kontraktionen im Vordergrund stand. Für eine differenziertere Analyse sind weitere Messungen mit den in STW 5 enthaltenen Einzel-extrakten bzw. mit vorkommenden Inhaltsstoffen notwendig.

### 5.3.4 Stimulation mit Neurotensin und Wirkung von STW 5

Neurotensin wird insbesondere in den N-Zellen des Ileums und des Kolons gebildet. Dort zeigt NT über spezifische Neurotensin-Rezeptoren vermittelte Effekte auf die motorische peristaltische und sekretorische Aktivität, gleichzeitig fungiert es als Intestinalhormon mit endokrinen und neuroendokrinen Funktionen [Brown and Miller 1982; Kitabgi and Freychet 1978; Nguyen et al., 1997]. NT rief in Versuchen an longitudinalen Muskelpräparaten des Meerschweinchen- und des Ratten-Ileums, wenn die Gewebeproben spontane peristaltische Aktivität zeigten, eine transient auftretende Relaxation hervor, gefolgt von einer Kontraktion des Präparates. Diese ist möglicherweise auf eine erhöhte NT-vermittelte ACh-Freisetzung aus dem Plexus myentericus zurückzuführen [Goedert et al., 1984; Kitabgi and Freychet 1978; Teitelbaum et al., 1984].

Am Ileum der Maus bewirkte die NT-Applikation, ab einer Konzentration von 10 nM, ebenfalls eine transiente Relaxation des Präparates, gleichzeitig verbunden mit einer vorübergehenden signifikanten Reduzierung der Amplitude der Spontanrhythmik. Dabei konnte eine Dosisabhängigkeit beobachtet werden: mit steigender NT-Konzentration nahm die Relaxation zu und die Amplitude währenddessen ab.

Eine Vorinkubation der Präparate mit STW 5 inhibierte die NT-induzierte Relaxation und führte zu einer persistent verminderten Amplitude der phasischen Kontraktionen. Das zum Vergleich applizierte Bsc führte zu keiner signifikanten Veränderung gegenüber der alleinigen NT-Applikation.

Huidobro-Toro und Zhu [1984] vermuten, dass im Ileum zwei Untereinheiten des Neurotensin-Rezeptors vorkommen: Einerseits ein inhibitorischer Subtyp, der an den glatten Muskelzellen auf postsynaptischer Seite lokalisiert ist, und die Relaxation vermittelt, andererseits eine exzitatorische Untereinheit, die größtenteils im Plexus myentericus vorzukommen scheint, und eine Wirkung über Freisetzung verschiedener Neurotransmitter und -peptide hervorruft. Kullak et al. [1987] erklären den relaxierenden Effekt des NT detaillierter mit einer Wechselbeziehung zwischen NT und Calcium und stellen dazu die These auf, dass aufgrund eines NT-induzierten Calciuminflux calciumabhängige Kaliumkanäle aktiviert würden, die zu einer Nachhyperpolarisation und damit zu einer stark verringerten zytosolischen Calcium-

Konzentration führen. Dies scheint sich durch die Untersuchungen von Kitabgi und Vincent [1981] zu bestätigen: Das neurotoxische Peptid Apamin konnte am Kaninchen-Ileum die NT-stimulierte Relaxation durch Blockade der calciumabhängigen Kaliumkanäle inhibieren.

STW 5 konnte am Ileum der Maus die Relaxation hemmen. Aufgrund des dargestellten Sachverhalts wird vermutet, dass dies auf muskulärer Ebene geschieht. Offen bleibt dabei, ob Inhaltsstoffe in STW 5 direkt an Neurotensin-Rezeptoren angreifen, oder ob die Wirkung ausschließlich durch die Blockade calciumabhängiger Kanäle, wie bereits in Kap. 5.3.2 für Inhaltsstoffe aus Pfefferminz, Kamille und Angelikawurzel beschrieben, vermittelt wird.

## 5.4 Wirkungen der Phytotherapeutika auf oxidativen Stress und Darmperistaltik

### 5.4.1 Oxidativer Stress und reaktive Sauerstoffspezies

Man kann davon ausgehen, dass oxidativer Stress und Entzündungsreaktionen, verbunden mit erhöhter Aktivität reaktiver Sauerstoffspezies, eine wichtige Rolle in der Pathogenese des Reizdarmsyndroms spielen. In verschiedenen Tiermodellen der intestinalen Entzündung wurde gezeigt, dass inflammatorische Prozesse und Aktivierung des enterischen Immunsystems (mit Freisetzung proinflammatorischer Mediatoren) schon in frühen Stadien zu signifikanten, aber unspezifischen Veränderungen der Darmmotilität führen können [Akiho et al., 2005; Appleyard et al., 2002; Barbara et al., 2002; Collins et al., 1999; Hathaway et al., 2000; Percy et al., 1993; Spiller and Campbell 2006; Tornblom et al., 2005].

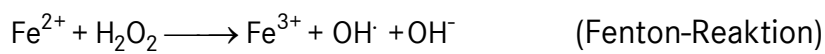
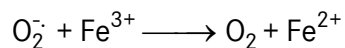
Für die Therapie des RDS scheint es daher besonders sinnvoll, Arzneimittel mit zusätzlich radikalabfangender Wirkung wie z.B. Phytopharmaka einzusetzen [Germann et al., 2006; Schempp et al., 2006].

Im Folgenden werden zunächst Grundlagen des oxidativen Stresses, dann die Wirkung des pflanzlichen Extrakts STW 5 auf die Peroxid-stimulierte ROS-Bildung im Ileum erörtert. Anschließend werden die Effekte von STW 5 und seinen Einzelextrakten auf die Peroxid-induzierte Kontraktilität diskutiert.

Zu den reaktiven Sauerstoffspezies gehören einerseits Sauerstoff-Verbindungen mit jeweils einem ungepaarten Elektron (z.B.  $\text{OH}^\bullet$ ,  $\text{O}_2^{\bullet-}$ ) andererseits Moleküle wie bspw. die in dieser Arbeit verwendeten Peroxide Wasserstoffperoxid und *tertiär*-Butylhydroperoxid, die als unvollständige Reduktionsstufen ebenfalls ein sehr hohes oxidatives Potential in der Zelle zeigen. Allgemein entstehen ROS endogen in verschiedenen Zellkompartimenten, u.a. in der Atmungskette, in der NADPH-Oxidase-Reaktion, im Arachidonsäuremetabolismus, bei Cytochrom P450-katalysierten Reaktionen und bei Autooxidationen von Thiolen und anderen reduzierten Verbindungen.

$\text{H}_2\text{O}_2$  ist als physiologischer Metabolit zu betrachten und wird durch spezifische, peroxisomal lokalisierte Oxidasen in zahlreichen Stoffwechselprozessen gebildet

[Southorn and Powis 1988] und ist in der Lage, Zellmembranen zu durchdringen [Halliwell and Gutteridge 1985]. Die Toxizität von  $\text{H}_2\text{O}_2$  ist auf Oxidation von Sulfhydryl-Gruppen sowie auf die Bildung des hochreaktiven Hydroxylradikals durch Oxidation von reduzierten Eisen-Ionen während der Fenton-Reaktion zurückzuführen [Kwan and Voelker 2003]. Hydroxylradikale reagieren mit sehr kurzer Halbwertszeit mit nahezu allen zellulären Molekülen (Lipide, Proteine, Nukleinsäuren) und vermitteln toxische Wirkungen [Halliwell 2006].



Die Entgiftung von  $\text{H}_2\text{O}_2$  wird endogen durch antioxidative Enzyme wie die Katalase und die Glutathionperoxidasen katalysiert. Während die Katalase nur  $\text{H}_2\text{O}_2$  durch Disproportionierung zu Wasser und Sauerstoff umsetzt, katalysieren die Glutathionperoxidasen sowohl die Glutathion-abhängige Reduktion von  $\text{H}_2\text{O}_2$  als auch von organischen Peroxiden, wie von exogen appliziertem *tertiär*-Butylhydroperoxid. Bei unzureichender Entgiftung kann *t*BHP Zellschäden vermitteln, wobei als Mechanismen eine Aktivierung der Lipidperoxidation, Glutathiondepletion, Hemmung der ATP-Synthese sowie DNA-Strangbrüche diskutiert werden [Clementi et al., 1998; Guidarelli et al., 1998; Latour et al., 1995].

Unter der Annahme, dass die Peroxidentgiftung wie erwähnt besonders bei *t*BHP von der Aktivität der Glutathionperoxidase abhängt, wurden auch Ileumpräparate aus Glutathionperoxidase1(-/-)-Tieren untersucht. Die GPx sind Selenoproteine und wichtiger Bestandteil der enzymatischen antioxidativen Abwehr. Mit einem reaktiven Zentrum aus Selenocystein, Tryptophan und Glutamin katalysieren sie die Reduktion der Peroxide, bei welcher Selen oxidiert wird, und wirken dadurch schützend vor oxidativen Zellschäden. Die Messungen der spezifischen Aktivität der GPx in GPx1-KO- und WT-Tieren konnte deutlich den Unterschied zwischen den Genotypen zeigen: So war die spezifische Aktivität der GPx in Ileum- und Leber-Präparaten auf ein Drittel, sowie in den Erythrozyten der KO-Maus auf zwei Drittel erniedrigt, ein veränderter Peroxidstoffwechsel war also in den Präparaten dieser Tiere zu erwarten.

### 5.4.2 Wirkung von STW 5 auf die Peroxid-stimulierte ROS-Bildung

Mittels Luminol-verstärkter Chemilumineszenz wurde sowohl die basale als auch die durch  $\text{H}_2\text{O}_2$ - und *t*BHP-stimulierte Radikalproduktion in Ileumpräparaten der GPx1-KO- und der WT-Maus gemessen.

Die Ergebnisse in dieser Arbeit zeigen, dass unstimuliert nahezu keine basale Radikalbildung in den Darmpräparaten der Mäuse auftrat, jedoch konnte sowohl die Applikation von  $\text{H}_2\text{O}_2$  als auch von *t*BHP diese stimulieren und daher oxidativen Stress verstärken.

Auffällig waren Unterschiede bezüglich der eingesetzten Peroxide:  $\text{H}_2\text{O}_2$  setzte im Vergleich zu *t*BHP ca. die hundertfache Menge an Radikalen frei. Möglicherweise lässt sich dieser Effekt begründen durch die Reaktion von  $\text{H}_2\text{O}_2$  mit Übergangsmetallen, wodurch zudem hochreaktive Spezies wie das Hydroxylradikal gebildet werden, die ihrerseits eine weitere Radikalbildung initiieren (Fenton-Reaktion, siehe oben). Aber auch das geringere Molekulargewicht von  $\text{H}_2\text{O}_2$  und die daraus resultierende erhöhte Diffusionsgeschwindigkeit können Gründe für die verstärkte Radikalbildung gegenüber *t*BHP sein [Heinle 1988].

Für die beiden Genotypen wurde ein signifikanter Unterschied registriert: In den Präparaten der GPx1-KO-Mäuse wurden ca. doppelt so viele Radikale gebildet wie in den WT-Präparaten. Bei beiden Spezies war eine Dosisabhängigkeit erkennbar, mit steigender Konzentration der Peroxide stieg die freigesetzte Radikalmenge.

STW 5 konnte die  $\text{H}_2\text{O}_2$ - bzw. die *t*BHP-induzierte Radikalbildung in allen Versuchen der GPx1-KO- und der WT-Ileumpräparate signifikant reduzieren. Dies war sowohl bei einer Applikation von STW 5 während als auch vor Peroxidstimulation zu beobachten. So wurde bei Vorinkubation der Ileumpräparate mit STW 5 weniger als ein Prozent der Radikalmenge im Vergleich zu alleiniger  $\text{H}_2\text{O}_2$ -Applikation gebildet.

Für STW 5 und die enthaltenen Extrakte konnten radikalfangende Wirkungen darüber hinaus sowohl in rein chemischen Testsystemen (AAPH-Reaktion, Xanthin/Xanthinoxidase-Reaktion) als auch in zellulären Modellen (u.a. in Leukozyten) gefunden werden [Germann 2005]. Dabei wurden starke antioxidative Eigenschaften insbesondere für die Extrakte aus Pfefferminz, Kamille und Angelikawurzel beobachtet, die wiederum auf die Wirkung der jeweils enthaltenen Inhaltsstoffe zurückzuführen sind.

Derivate der Hydroxyzimtsäure, sowie allgemein die Phenolcarbonsäuren zeigen eine hohe antioxidative Wirksamkeit, die Kaffeesäure, die Rosmarinsäure und die Ferulasäure wurden hervorgehoben [Andreasen et al., 2001; Raneva et al., 2001]. Die Flavonoide Apigenin, Quercetin, Luteolin, Kämpferol, Glabridin, Silymarin sowie deren Aglyka kommen in Kamille, Iberis amara, Süßholzwurzel, Mariendistel und Pfefferminz vor und zeigen ebenfalls sehr gute radikalfangende Eigenschaften [Bors et al., 1994; Germann et al., 2006; Glasser et al., 2002]. Darüber hinaus sind vor allem Mono- und Sesquiterpene in Kamille (Matricarin, Myrcen), Angelikawurzel (Pinen, Terpinen, Caryophyllen), Kümmel (Caryophyllen) und Melisse (Linalool), sowie Coumarine (Umbelliferon, Osthol) in Angelikawurzel für die antioxidative Wirkung der Extrakte und damit auch für STW 5 verantwortlich [McKay and Blumberg 2006; Wegener and Wagner 2006].

### 5.4.3 Wirkung von STW 5 und seinen Einzelextrakten auf die Peroxid-stimulierte Kontraktilität

Aus dem bisher geschilderten Sachverhalt ergibt sich die Frage, welchen Einfluss die Peroxide  $H_2O_2$  und *t*BHP auf die Motilität des Ileums der GPx1(-/-)- und der WT-Maus nehmen und inwieweit die pflanzlichen Extrakte die induzierten Kontraktionen beeinflussen können.

Die Hydroperoxide greifen auf der Ebene der glatten Muskelzellen in verschiedene physiologische Mechanismen ein, wodurch eine Dysfunktion des peristaltischen Geschehens mit sowohl gesteigerter als auch verminderter Kontraktilität erwartet werden kann. Dabei scheinen insbesondere Veränderungen der Calcium-Homöostase in glatten Muskelzellen eine große Rolle zu spielen: In Untersuchungen zum Einfluss von reaktiven Sauerstoffspezies auf die intrazelluläre  $Ca^{2+}$ -Konzentration wurde gezeigt, dass Peroxide den  $Ca^{2+}$ -Transport aus der Zelle durch Hemmung der Plasmamembran- $Ca^{2+}$ -ATPase (PMCA) verhindern können [Lehotsky et al., 2002; Lounsbury et al., 2000].  $H_2O_2$  führt ebenso zur Hydrolyse des Membranlipids Phosphatidyl-Inositol-4,5-Bisphosphat, wodurch weitere Signalkaskaden aktiviert werden, die eine erhöhte intrazelluläre  $Ca^{2+}$ -Konzentration zur Folge haben [Shasby et al., 1988]. Lehotsky et al. [2002] stellen darüber hinaus dar, dass oxidativ wirkende Substanzen auch eine  $Ca^{2+}$ -Wiederaufnahme in intrazelluläre Speicher über Hemmung der sarko-endoplasmatischen-Retikulum- $Ca^{2+}$ -ATPase (SERCA) inhibieren können.

Cao et al. [2004] nehmen einen direkten Bezug zur Motilität, indem sie in Untersuchungen an humanen Kolonpräparaten zeigten, dass die Peristaltik durch eine  $H_2O_2$ -vermittelte Hemmung der Neurokinin A-induzierten  $Ca^{2+}$ -Freisetzung aus intrazellulären  $Ca^{2+}$ -Speichern reduziert sein kann.

Zusammenhänge zwischen oxidativem Stress und einer veränderten Motilität des Intestinums der Ratte beschreiben Van der Vliet et al. [1989] mit einem möglicherweise direkten Angriff der Peroxide an spannungsabhängigen  $Ca^{2+}$ -Kanälen, wobei die Wirkung der Hydroperoxide auch mit der Konzentration der Katalase in den verschiedenen Kompartimenten korreliert. In Kontraktionsmessungen am Meerschweinchen-Ileum und am Kaninchen-Jejunum fanden Peluso et al. [2002] durch Applikation von 2,2-Azobis(2-amidinopropan)dihydrochlorid nach Thermolyse Peroxylradikale, die



sowohl die spontane Kontraktilität inhibierten, als auch die muskarinerge ACh-vermittelte tonische Kontraktion der Präparate senken konnten.

In dieser Arbeit führte die Applikation von  $H_2O_2$  [100, 250, 500 und 1000  $\mu M$ ] an den Ileumpräparaten der GPx1(-/-)- und der WT-Maus mit steigender Konzentration zu einer verstärkten tonischen Kontraktion. Die Amplitude und die Frequenz der spontanen Kontraktilität wurden bei beiden Genotypen zuerst tendenziell transient erhöht, um im weiteren Verlauf der  $H_2O_2$ -Perfusion zu sinken. Dabei waren nur geringe signifikante Unterschiede der beiden Genotypen zu beobachten: Bei Applikation von  $H_2O_2$  in der Konzentration 100  $\mu M$  wurde bei der WT-Maus bereits ein Tonus registriert, während dieser bei der GPx1-KO-Maus erst ab  $H_2O_2$  [250  $\mu M$ ] auftrat. Bei  $H_2O_2$ -Konzentrationen von 500 und 1000  $\mu M$  wurden die Amplitude und die Frequenz der Spontanperistaltik bei der GPx1-KO-Maus signifikant schwächer reduziert gegenüber dem Wildtyp.

Die Applikation von *tertiär*-Butylhydroperoxid, in einer Konzentration von 500  $\mu M$ , führte an den Ileumpräparaten der GPx1(-/-)- und der WT-Maus zu vergleichbaren Ergebnissen wie durch  $H_2O_2$ : Eine tonische Kontraktion, verbunden mit einer zunächst leicht erhöhten und im weiteren Perfusionsverlauf sinkenden Amplitude. Signifikante Unterschiede traten dabei nicht auf, tendenziell wurden jedoch bei der GPx1-KO-Maus ein vergrößerter Tonus und eine erhöhte Amplitude gegenüber der WT-Maus gefunden.

Auffällig ist, dass die Peroxide  $H_2O_2$  und *t*BHP in den Chemilumineszenzmessungen zwar große Unterschiede in der Radikalbildung zeigten, jedoch in den Kontraktionsmessungen trotz unterschiedlichem Metabolismus ein sehr ähnliches Ergebnis hervorriefen. Daran kann man erkennen, dass die motilitätsmodulierenden Effekte der Hydroperoxide nicht abhängig sind von der Gesamtmenge der gebildeten Radikale. Die Zunahme der tonischen Kontraktionskraft scheint eher in möglicherweise Calcium-agonistischen Effekten begründet zu sein.

Die in den Chemilumineszenz-Messungen dargestellten Unterschiede zwischen Ileumpräparaten der GPx1(-/-)- und der WT-Maus, die eine vermehrte Bildung von ROS in den GPx1-KO-Tieren nach Peroxidstimulation vorweisen konnten, spiegeln sich ebenso nicht in den Befunden der Kontraktionsmessungen wieder. Demzufolge wurde

aufgrund des „Knock Outs“ der Glutathionperoxidase 1 eine auf die Peroxide verstärkte Reaktion bei den GPx1-KO-Mäusen erwartet. Da dies weder für  $H_2O_2$  noch für *t*BHP am Ileum zu beobachten war, kann auf der einen Seite angenommen werden, dass die Reduktion der Hydroperoxide bei den KO-Tieren verstärkt durch andere Enzyme katalysiert wird. So spielt neben der Katalase auch die Glutathionperoxidase 2, die im Gastrointestinaltrakt neben der GPx1 auftritt, eine wichtige Rolle als Antioxidans [Brigelius-Flohe et al., 2001; Esworthy et al., 2005]. In der intestinalen Mukosa zeigte die GPx2 eine hohe antiinflammatorische Aktivität [Esworthy et al., 2001]. Auf der anderen Seite wird deutlich, dass oxidativer Stress zwar eine verstärkte Kontraktion hervorruft, dass diese in ihrer Intensität jedoch nicht abhängig von der Gesamtmenge der gebildeten Radikale zu sein scheint. Inwieweit einzelne Radikal-spezies Einfluss nehmen, muss in weiteren Untersuchungen geklärt werden.

Die Wirkung von STW 5 auf die  $H_2O_2$ -induzierte Kontraktilität wurde sowohl an der GPx1-KO-Maus als auch an der WT-Maus untersucht. Bei beiden Genotypen konnte STW 5 die tonische Kontraktion signifikant und die durchschnittliche Amplitude der Spontankontraktionen tendenziell reduzieren. Ein signifikanter Unterschied wurde zwar für  $P_{8Min.}$  ermittelt, jedoch war dieser Effekt bereits bei alleiniger  $H_2O_2$ -Applikation zwischen den Genotypen aufgetreten, so dass man nicht auf STW 5-spezifische Unterschiede schließen kann.

Die Effekte der Einzelnextrakte wurden nur an WT-Tieren gemessen, da die GPx1-KO-Tiere nur in limitierter Anzahl zur Verfügung standen. Alle pflanzlichen Extrakte reduzierten die tonische Kontraktionskraft; Pfefferminz, Kamille, Süßholzwurzel, Angelikawurzel und Melisse hemmten sie in einigen Versuchen sogar vollständig. Auffällig war die breite Streuung der Messergebnisse, die insbesondere bei den schwach wirkenden Extrakten Kümmel, Mariendistel und Iberis amara sowie dem zum Vergleich untersuchten Bsc zu beobachten war. Jedoch auch die alleinige Applikation von  $H_2O_2$  führte zu streuenden Messergebnissen bzw. zu einer großen Standardabweichung. Die Amplitude wurde durch Pfe, Kam und Ang bereits während der tonischen Kontraktion signifikant reduziert, durch Süß, Küm, Mar, Mel und Ibe sank sie erst im weiteren Perfusionsverlauf. Schöllkraut und Bsc nahmen keinen Einfluss auf die  $H_2O_2$ -induzierten Spontankontraktionen.

Für STW 5 wurde ein synergistischer Effekt der Hemmung der tonischen Kontraktion beobachtet. Im Vergleich der Mittelwerte fiel auf, dass fünf der neun enthaltenen Einzelextrakte eine schwächere Wirkung als STW 5 zeigten. Hierbei ist zusätzlich zu berücksichtigen, dass die Extrakte im Gesamtextrakt STW 5 niedriger dosiert sind gegenüber den Konzentrationen in den Versuchen dieser Arbeit. Beispielsweise konnten für Süßholzwurzel und Melisse, appliziert jeweils in den Konzentrationen 10 µl/ml, zwar auch inhibierende Effekte der H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-induzierten tonischen Kontraktionen gezeigt werden, jedoch sind diese Extrakte bei Anwendung von STW 5 nur jeweils anteilig in einer Konzentration von 1 µl/ml enthalten. Untersuchungen der Einzelextrakte mit adäquaten Konzentrationen zu STW 5 führten in allen Versuchen zu einer quantitativ deutlich geringeren Wirkung der Einzelextrakte. Supraadditive Wechselbeziehungen unter den Extrakten tragen offensichtlich zur Gesamtwirkung von STW 5 bei.

## 5.5 Wirkungen der Phytotherapeutika in humanen Ileum-Präparaten

Orientierende Versuche zur Messung der Kontraktilität und der Radikalbildung wurden in humanen Ileumpräparaten, die im Rahmen von Operationen in der Universitätsklinik Tübingen für histopathologische Untersuchungen entfernt worden waren, durchgeführt. Phasische Kontraktionen, die bei 18 von insgesamt 26 untersuchten Präparaten auftraten, wurden durch STW 5 in ihrer Kraft und Frequenz reduziert. Im Vergleich zu den Ileumpräparaten der Mäuse konnte durch Applikation von STW 5 auch eine signifikante Relaxation der basalen Grundspannung registriert werden. Eine STW 5-vermittelte Hemmung des basalen Tonus wurde bisher nur an Präparaten des Magens (Fundus und Corpus) beschrieben. Hier fanden Hohenester und Schemann an humanen Proben nach Applikation von STW 5, sowie an Meerschweinchen-Präparaten auch durch Angelikawurzel- und Kamillenblütenextrakt eine vermutlich myogen vermittelte Relaxation [Hohenester et al., 2004; Schemann et al., 2006].

Die Stimulation mit Acetylcholin führte in allen Versuchen am humanen Ileum zu einer signifikanten tonischen Kontraktion. Auffällig war, dass STW 5 an humanen Präparaten im Gegensatz zu den Versuchen an Mäusen und Meerschweinchen keine hemmende Wirkung auf die ACh-induzierte Kontraktion zeigte [Ammon et al., 2006; Hagelauer et al., 2006]. Jedoch ist zu berücksichtigen, dass aufgrund der limitierten Verfügbarkeit der humanen Proben nur eine kleine Stichprobenzahl untersucht werden konnte (sechs Präparate von drei Proben), so dass zur besseren Absicherung weitere Untersuchungen zu empfehlen sind.

Histamin wirkt als Gewebshormon, Neurotransmitter und Entzündungsmediator und wird von Enterochromaffin-ähnlichen Zellen, Mastzellen und histaminergen Neuronen gebildet, gespeichert und freigesetzt [Rangachari 1992]. Im Darm induziert Histamin über H1-Rezeptoren eine gesteigerte Motilität durch Stimulation glatter Muskelzellen, sowie über H3-Rezeptoren eine erhöhte Aktivität des ENS durch Regulation der prä-synaptischen Transmitterfreisetzung [Bertaccini et al., 1991]. In den in dieser Arbeit vorgestellten Versuchen konnte nach Histamin-Applikation eine transiente tonische Kontraktion beobachtet werden, die von STW 5 tendenziell reduziert wurde. Für eine statistische Absicherung war die Stichprobenzahl jedoch zu gering. In Versuchen am

Meerschweinchen-Ileum konnten Heinle et al. zeigen, dass der hemmende Effekt von STW 5 auf die Histamin-induzierte Kontraktion insbesondere durch die Extrakte aus Angelikawurzel, Kamillenblüten und Pfefferminzblättern hervorgerufen wird [Heinle et al., 2006].

Neben den Kontraktionsmessungen wurde die Wirkung von STW 5 auf die  $H_2O_2$ -induzierte Radikalproduktion gemessen. Dabei war zunächst auffällig, dass die basale Radikalproduktion in den humanen Ileumpräparaten (ohne Peroxid) gegenüber den Maus-Proben im Durchschnitt ca. um den Faktor 100 erhöht und sehr variabel war. Sowohl Schwankungen zwischen den unterschiedlichen Patientenproben, als auch zwischen den verschiedenen Präparaten eines Patienten konnten beobachtet werden. Diese ergaben sich möglicherweise durch unterschiedliche inflammatorische Konstitutionen der Ileumpräparate und je nach Aktivierung immunaktiver Zellen. Anschließend führte die Applikation von  $H_2O_2$  dosisabhängig zu einem starken Anstieg der Radikalbildung. STW 5 konnte diese signifikant in etwa um den Faktor 100 hemmen und zeigte damit auch in humanen Proben eine hohe antioxidative Wirkung.

Die präsentierten Versuche an humanen Ileumpräparaten sollten nur einer ersten Orientierung dienen. Dabei wurde deutlich, dass STW 5 die phasische Kontraktilität reduzieren kann. Eine inhibitorische Wirkung des pflanzlichen Extrakts auf Neurotransmitter- und Entzündungsmediator-stimulierte Kontraktionen ist anzunehmen, muss aber in weiteren Versuchen geprüft werden. Für STW 5 konnten am humanen Ileum ebenso sehr gute radikalfangende Eigenschaften gezeigt werden.

## 5.6 Therapie mittels Phytotherapeutika beim Reizdarmsyndrom

In der vorliegenden Arbeit konnten für die verwendeten Phytopharmaka unterschiedliche Effekte auf die Ileumfunktion nachgewiesen werden. Als dominanter Befund ist sicher der motilitätsreduzierende d.h. evtl. spasmolytische Effekt zu nennen, der sowohl bei spontaner Peristaltik als auch bei Stimulation der Darmwand durch die Agonisten Acetylcholin, Prostaglandin  $F_{2\alpha}$  oder Substanz P gefunden wurde. Bemerkenswert ist aber auch, dass die Hemmung der Darmtätigkeit durch Neutensin durch STW 5 abgeschwächt wurde, so dass unter bestimmten Bedingungen auch eine tonisierende Wirkung durch die Phytopharmaka erzielt werden könnte. Wie hier dargestellt wurde, weist humanes Ileum eine hohe Radikalproduktion auf und da viele Befunde für eine Beteiligung einer Entzündungsreaktion beim Reizdarmsyndrom sprechen, ist die radikalabfangende Wirkung der Phytotherapeutika ebenfalls von größter Bedeutung. Gleichzeitig wurde auch die durch oxidativen Stress ausgelöste tonische Kontraktion in der Darmwand gehemmt, so dass es interessant wäre der Frage nachzugehen, ob beide Wirkungen kausal zusammenhängen. Unabhängig von der Lösung dieser Frage ergibt sich für STW 5 und seine Komponenten ein breites Wirkungsspektrum, das in der Therapie des Reizdarmsyndroms sinnvoll zum Tragen kommen könnte.

## 6 Zusammenfassung

Das Reizdarmsyndrom ist eine der häufigsten Erkrankungen des Gastrointestinaltrakts und durch vielfältige Symptome unterschiedlicher Pathogenese gekennzeichnet. Dabei steht eine gestörte Motilität, die zum einen durch Störungen des enterischen Nervensystems, zum anderen auf reflektorischem Weg durch eine erhöhte Sensibilität, aber auch durch inflammatorische Prozesse hervorgerufen sein kann, im Vordergrund.

In der Therapie des Reizdarmsyndroms werden häufig Phytotherapeutika eingesetzt, so dass in der vorliegenden Arbeit die Wirkungen von Iberogast<sup>®</sup> (STW 5) und seinen neun Einzextrakten auf die spontane endogene Peristaltik und auf die durch verschiedene Neurotransmitter modulierte Kontraktilität untersucht wurden. Zusätzlich wurde der Frage nachgegangen, inwieweit Homöopathika, die bei gastrointestinalen Beschwerden Anwendung finden, Wirkungen auf den Darm erzielen. Dabei wurden jedoch Regeln der Homöopathie nicht beachtet.

Für diese *in vitro* Untersuchungen wurden im Organbad phasische und induzierte tonische Kontraktionen longitudinaler Ileumpräparate der Maus gemessen und nach Amplitude, Frequenz und Tonus ausgewertet.

Für STW 5 und alle Extrakte wurden in Messungen der spontanen Kontraktilität dosisabhängig inhibierende Effekte auf die Amplitude und Frequenz gefunden, wobei Pfefferminz, Kamille und Angelikawurzel die stärksten, Schöllkraut und Iberis amara die schwächsten Wirkungen zeigten. Da nur Pfefferminz und Kamille stärker wirksam waren als STW 5, sind additive bzw. synergistische Effekte zwischen den einzelnen Extrakten anzunehmen. Die Untersuchung des Forschungspräparats STW5-Ibe, welches sich von STW 5 nur durch einen Mangel an Iberis amara unterscheidet, scheint dies zu bestätigen, da die motilitätshemmende Wirkung deutlich schwächer im Vergleich zu STW 5 ausfiel. Erklärungen für die den Synergien zugrunde liegenden Mechanismen bedürfen weiterer Studien.

Die homöopathischen Tinkturen aus *Asa foetida*, *Lachesis* und *Magnesium chlorat* reduzierten die Amplitude der spontanen Motilität signifikant, gefolgt von *Chamomilla*, *Colocynthis* und *Lycopodium*. Für *Ignatia* wurde kein Effekt gefunden.

Damit zeigen sowohl die Phytotherapeutika als auch die meisten der untersuchten

Homöopathika, dass sie prinzipiell in der Lage sind, die gastrointestinale Motilität zu beeinflussen, was generell auf beschriebene Wirkungen der Inhaltsstoffe zurückgeführt werden kann.

Aus der Überlegung, dass die Darmmotilität über myogene und neuronal über reflektorische und zentrale Mechanismen moduliert wird, sollte im Weiteren der Frage nachgegangen werden, inwieweit STW 5 und die Einzelextrakte auf Neurotransmitter-stimulierte Kontraktilität Einfluss nehmen. Als Neurotransmitter bzw. -Modulatoren wurden verwendet: Acetylcholin, Prostaglandin  $F_{2\alpha}$ , Substanz P und Neurotensin.

Die Applikation von Acetylcholin am Maus-Ileum rief dosisabhängig tonische Kontraktionen, verbunden mit einer verminderten Spontanperistaltik hervor. Bei gleichzeitiger Applikation von Acetylcholin und Extrakt konnten Pfefferminz, Kamille, Angelikawurzel und Mariendistel sowie das zum Vergleich eingesetzte Butylscopolamin den Tonus signifikant hemmen. In einem zweiten Messprotokoll wurden die Ileumpräparate bereits vor ACh-Stimulation mit den Extrakten vorbehandelt. Nun zeigte auch STW 5 einen inhibierenden Effekt auf die tonische Kontraktion. Die phasische Spontanrhythmik wurde in diesem Modell stärker vermindert. Ob dies auf eine verbesserte Erreichbarkeit möglicher Wirkungsorte durch Diffusion oder auf Eingreifen pflanzlicher Inhaltsstoffe in metabotrope Reaktionen zurückzuführen ist, bleibt offen.

Prostaglandin  $F_{2\alpha}$  fördert im Ileum die Motilität durch gesteigerte Kontraktilität der longitudinalen und zirkulären Muskelschichten, gleichzeitig spielt Prostaglandin  $F_{2\alpha}$  auch pathogenetisch eine Rolle im Inflammationsgeschehen. Die Applikation am Ileum induzierte eine signifikante tonische Kontraktion mit verstärkter phasischer Rhythmik. Die Extrakte, insbesondere Kamille, Angelikawurzel, Pfefferminz, Süßholzwurzel und Mariendistel, reduzierten diese Stimulation, wobei ein Synergie-Effekt bezüglich der Tonus-hemmenden Wirkung anzunehmen ist. Ein möglicher Mechanismus der stark wirksamen Extrakte können  $Ca^{2+}$ -antagonistische Effekte und eine Hemmung der cAMP- und cGMP-Phosphodiesterasen sein.

Substanz P nimmt sowohl direkt über Aktivierung von Neurokinin-Rezeptoren als auch indirekt über die Stimulation cholinergischer Neurone Einfluss auf das peristaltische Geschehen. Dies zeigte sich in den in dieser Arbeit gefundenen Ergebnissen durch eine tonische Kontraktion mit vergrößerter phasischer Spontanrhythmik. STW 5 inhibierte die Amplitude, nicht aber den induzierten Tonus, dagegen reduzierte das



zum Vergleich untersuchte Butylscopolaminbromid nur die tonische Komponente. Dies führte zur Annahme, dass der Tonus möglicherweise bevorzugt über eine Freisetzung kolokalisierter Neurotransmitter vermittelt wird, deren Wirkung Butylscopolaminbromid inhibieren konnte. Dagegen wird für STW 5 eher eine Interaktion auf Rezeptorebene vermutet.

Die Applikation des Neuromodulators Neurotensin bewirkte eine transiente Relaxation der Ileumpräparate, verbunden mit einer vorübergehenden signifikanten Reduzierung der phasischen Amplitude. STW 5 inhibierte die Neurotensin-induzierte Relaxation und führte zu einer persistent verminderten Amplitude der phasischen Kontraktionen. Diese Wirkung beruht möglicherweise auf einer Hemmung calciumabhängiger Kaliumkanäle, die bei Aktivierung eine Nachhyperpolarisation und damit eine sinkende  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration auslösen.

Obwohl definitionsgemäß das Reizdarmsyndrom als funktionelle Störung ohne Organbefund erklärt wird, spricht vieles dafür, dass oxidativer Stress und inflammatorische Prozesse zur Pathogenese des Reizdarmsyndroms beitragen. In Untersuchungen am Ileum von Glutathionperoxidase1(-/-)-Mäusen sollten daher Zusammenhänge zwischen oxidativem Stress, der Peroxidentgiftung und der Wirkung der pflanzlichen Extrakte untersucht werden. Dafür wurde einerseits in Messungen der Luminol-verstärkten Chemilumineszenz die Wirkung von STW 5 auf die  $\text{H}_2\text{O}_2$ - und die *tertiär*-Butylhydroperoxid-stimulierte Radikalproduktion gemessen, andererseits wurden die Effekte der Extrakte auf die Peroxid-stimulierte Kontraktilität untersucht.

STW 5 konnte die  $\text{H}_2\text{O}_2$ - bzw. die *t*BHP-induzierte Radikalbildung signifikant reduzieren, wobei in den GPx1-KO-Präparaten aufgrund verminderter Peroxidentgiftung ca. doppelt so viele Radikale im Vergleich mit den WT-Proben gebildet wurden. In den Kontraktionsmessungen zeigte  $\text{H}_2\text{O}_2$ - bzw. *t*BHP-Applikation bei den beiden Genotypen ähnliche Dosis-Wirkungs-Beziehungen, während unter  $\text{H}_2\text{O}_2$ -Stimulation eine ca. 100mal höhere Radikalproduktion auftrat als bei *t*BHP. Oxidativer Stress bewirkt demnach zwar eine verstärkte Kontraktion, jedoch scheint die Intensität der gestörten Motilität nicht abhängig zu sein von der Gesamtmenge der induzierten Radikale. Der bei beiden Peroxiden gemeinsame, kontraktionsfördernde Signalweg muss durch weitere Untersuchungen erforscht werden.

Die pflanzlichen Extrakte, besonders Pfefferminz, Kamille und Angelikawurzel, reduzierten die durch die Peroxide hervorgerufene tonische Kontraktion sowie die phasische Spontanrhythmik. Bei Anwendung von STW 5 konnten synergistische Effekte der Extrakte erneut beobachtet werden, wobei diese erwartet wurden, da bereits überadditive Wirkungen sowohl für die antioxidative Kapazität als auch für die Hemmung der Motilität gefunden wurden.

An humanen Ileumpräparaten wurden, soweit möglich, erste orientierende Versuche durchgeführt, die darlegten, dass STW 5 die phasische Kontraktilität reduzieren kann. Darüber hinaus wurde in Chemilumineszenzmessungen deutlich, dass humanes Ileum, wahrscheinlich abhängig von lokalen Entzündungsreaktionen, als sehr aktive Quelle für freie Radikale angesehen werden muss, und dass STW 5 in der Lage ist, diese Radikale abzufangen.

Zusammenfassend konnte gezeigt werden, dass die untersuchten Phytotherapeutika einerseits modulierend auf die endogene bzw. auf die Neurotransmitter-beeinflusste Darmmotilität wirken und andererseits zu einer signifikanten Hemmung von in der Darmwand produzierten freien Radikalen führen. Dieses Wirkungsspektrum könnte durchaus auch einer pharmakologischen Therapie des Reizdarmsyndroms mittels STW 5 zugrunde liegen.

## 7 Literaturverzeichnis

Akiho H, Deng Y, Blennerhassett P, Kanbayashi H, Collins SM: Mechanisms underlying the maintenance of muscle hypercontractility in a model of postinfective gut dysfunction. *Gastroenterology* 2005;129:131-141.

Ammon HP, Kelber O, Okpanyi SN: Spasmolytic and tonic effect of Iberogast (STW 5) in intestinal smooth muscle. *Phytomedicine* 2006;13 Suppl 5:67-74.

Andreasen MF, Landbo AK, Christensen LP, Hansen A, Meyer AS: Antioxidant effects of phenolic rye (*Secale cereale* L.) extracts, monomeric hydroxycinnamates, and ferulic acid dehydromers on human low-density lipoproteins. *J Agric Food Chem* 2001;49:4090-4096.

Appleyard CB, Alvarez A, Percy WH: Temporal changes in colonic vascular architecture and inflammatory mediator levels in animal models of colitis. *Dig Dis Sci* 2002;47:2007-2014.

Barbara G, De Giorgio R, Stanghellini V, Cremon C, Corinaldesi R: A role for inflammation in irritable bowel syndrome? *Gut* 2002;51 Suppl 1:41-44.

Bennett A, Stamford IF, Sanger GJ, Bloom SR: The effects of various peptides on human isolated gut muscle. *J Pharm Pharmacol* 1992;44:960-967.

Bertaccini G, Coruzzi G, Adami M, Pozzoli C, Gambarelli E: Histamine H3 receptors: an overview. *Ital J Gastroenterol* 1991;23:378-385.

Boericke, W: *Handbuch der homöopathischen Materia medica*, Haug, 2004.

Bors W, Michel C, Saran M: Flavonoid antioxidants: rate constants for reactions with oxygen radicals. *Methods Enzymol* 1994;234:420-429.

Bradley A: Mining the mouse genome. *Nature* 2002;420:512-514.

Brigelius-Flohe R, Muller C, Menard J, Florian S, Schmehl K, Winkler K: Functions of Gl-GPx: lessons from selenium-dependent expression and intracellular localization. *Biofactors* 2001;14:101-106.

Brown DR, Miller RJ: Neurotensin. *Br Med Bull* 1982;38:239-245.

Burakoff R, Nastos E, Won S: Effects of PGF2 alpha and of indomethacin on rabbit small and large intestinal motility in vivo. *Am J Physiol* 1990;258:G231-G237.

Cao W, Vrees MD, Kirber MT, Fiocchi C, Pricolo VE: Hydrogen peroxide contributes to motor dysfunction in ulcerative colitis. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2004;286:G833-G843.

- Chadwick VS, Chen W, Shu D, Paulus B, Bethwaite P, Tie A, Wilson I: Activation of the mucosal immune system in irritable bowel syndrome. *Gastroenterology* 2002;122:1778-1783.
- Chapple IL: Reactive oxygen species and antioxidants in inflammatory diseases. *J Clin Periodontol* 1997;24:287-296.
- Clementi E, Guidarelli A, Cantoni O: The inositol 1,4,5-trisphosphate-generating agonist ATP enhances DNA cleavage induced by tert-butylhydroperoxide. *Exp Cell Res* 1998;239:175-178.
- Collins SM, Barbara G, Vallance B: Stress, inflammation and the irritable bowel syndrome. *Can J Gastroenterol* 1999;13 Suppl A:47A-49A.
- Depoortere I, van Assche G, Thijs T, Geboes K, Peeters TL: Differential changes in ACh-, motilin-, substance P-, and K(+)-induced contractility in rabbit colitis. *Am J Physiol* 1999;277:G61-G68.
- Di Virgilio F: New pathways for reactive oxygen species generation in inflammation and potential novel pharmacological targets. *Curr Pharm Des* 2004;10:1647-1652.
- Drossman DA, Dumitrascu DL: Rome III: New standard for functional gastrointestinal disorders. *J Gastrointest Liver Dis* 2006;15:237-241.
- Esworthy RS, Aranda R, Martin MG, Doroshov JH, Binder SW, Chu FF: Mice with combined disruption of Gpx1 and Gpx2 genes have colitis. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2001;281:G848-G855.
- Esworthy RS, Yang L, Frankel PH, Chu FF: Epithelium-specific glutathione peroxidase, Gpx2, is involved in the prevention of intestinal inflammation in selenium-deficient mice. *J Nutr* 2005;135:740-745.
- Flentjar NJ, Crack PJ, Boyd R, Malin M, De Haan JB, Hertzog P, Kola I, Iannello R: Mice lacking glutathione peroxidase-1 activity show increased TUNEL staining and an accelerated inflammatory response in brain following a cold-induced injury. *Exp Neurol* 2002;177:9-20.
- Forgione MA, Weiss N, Heydrick S, Cap A, Klings ES, Bierl C, Eberhardt RT, Farber HW, Loscalzo J: Cellular glutathione peroxidase deficiency and endothelial dysfunction. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2002;282:H1255-H1261.
- Frantzides CT, Lianos EA, Wittmann D, Greenwood B, Edmiston CE: Prostaglandins and modulation of small bowel myoelectric activity. *Am J Physiol* 1992;262:G488-G497.
- Fukudo S, Nomura T, Muranaka M, Taguchi F: Brain-gut response to stress and cholinergic stimulation in irritable bowel syndrome. A preliminary study. *J Clin Gastroenterol* 1993;17:133-141.

Gebhart GF: Pathobiology of visceral pain: molecular mechanisms and therapeutic implications IV. Visceral afferent contributions to the pathobiology of visceral pain. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2000;278:G834-G838.

Germann, I: Charakterisierung der radikalfangenden Eigenschaften pflanzlicher Entzündungshemmer. 21.6.2005. Dissertation der Fakultät für Chemie und Pharmazie der Universität Tübingen.

Germann I, Hagelauer D, Kelber O, Vinson B, Laufer S, Weiser D, Heinle H: Antioxidative properties of the gastrointestinal phytopharmaceutical remedy STW 5 (Iberogast((R))). *Phytomedicine* 2006;13 Suppl 1:45-50.

Gharzouli K, Holzer P: Inhibition of guinea pig intestinal peristalsis by the flavonoids quercetin, naringenin, apigenin and genistein. *Pharmacology* 2004;70:5-14.

Glasser G, Graefe EU, Struck F, Veit M, Gebhardt R: Comparison of antioxidative capacities and inhibitory effects on cholesterol biosynthesis of quercetin and potential metabolites. *Phytomedicine* 2002;9:33-40.

Goedert M, Hunter JC, Ninkovic M: Evidence for neurotensin as a non-adrenergic, non-cholinergic neurotransmitter in guinea pig ileum. *Nature* 1984;311:59-62.

Guidarelli A, Clementi E, Sciorati C, Cantoni O: The mechanism of the nitric oxide-mediated enhancement of tert-butylhydroperoxide-induced DNA single strand breakage. *Br J Pharmacol* 1998;125:1074-1080.

Hagelauer D, Zhang D, Kelber O, Weiser D and Heinle H: Neurotransmitter-induced effects on motility of ileum from mouse and guinea pig: inhibition by plant extracts. *Acta Physiologica* 186[Suppl. 1], No. 13129. 2006.

Halliwell B: Oxidative stress and neurodegeneration: where are we now? *J Neurochem* 2006;97:1634-1658.

Halliwell B, Gutteridge JM: The importance of free radicals and catalytic metal ions in human diseases. *Mol Aspects Med* 1985;8:89-193.

Hammad HM, Abdalla SS: Pharmacological effects of selected flavonoids on rat isolated ileum: structure-activity relationship. *Gen Pharmacol* 1997;28:767-771.

Hansen MB: The enteric nervous system III: a target for pharmacological treatment. *Pharmacol Toxicol* 2003;93:1-13.

Hathaway CA, Percy WH, Williams JL: Effects of free radicals and leukocytes on increases in blood-brain barrier permeability during colitis. *Dig Dis Sci* 2000;45:967-975.

Hauser W, Lempa M: [Irritable bowel syndrome]. *Schmerz* 2004;18:130-135.

Hawthorn M, Ferrante J, Luchowski E, Rutledge A, Wei XY, Triggle DJ: The actions of peppermint oil and menthol on calcium channel dependent processes in intestinal, neuronal and cardiac preparations. *Aliment Pharmacol Ther* 1988;2:101-118.

Heinle H: Influence of Oxidative Stress on Metabolic and Contractile Functions of Arterial Smooth Muscle. In: *Oxygen Sensing In Tissues* 1988;151-164.

Heinle H, Hagelauer D, Pascht U, Kelber O, Weiser D: Intestinal spasmolytic effects of STW 5 (Iberogast) and its components. *Phytomedicine* 2006;13 Suppl 5:75-79.

Herbert MK, Holzer P: [Neurogenic inflammation. II. pathophysiology and clinical implications]. *Anesthesiol Intensivmed Notfallmed Schmerzther* 2002a;37:386-394.

Herbert MK, Holzer P: [Why are substance P(NK1)-receptor antagonists ineffective in pain treatment?]. *Anaesthesist* 2002b;51:308-319.

Hiller KO, Ghorbani M, Schilcher H: Antispasmodic and relaxant activity of chelidonine, protopine, coptisine, and Chelidonium majus extracts on isolated guinea-pig ileum. *Planta Med* 1998;64:758-760.

Hills JM, Aaronson PI: The mechanism of action of peppermint oil on gastrointestinal smooth muscle. An analysis using patch clamp electrophysiology and isolated tissue pharmacology in rabbit and guinea pig. *Gastroenterology* 1991;101:55-65.

Ho YS, Magnenat JL, Bronson RT, Cao J, Gargano M, Sugawara M, Funk CD: Mice deficient in cellular glutathione peroxidase develop normally and show no increased sensitivity to hyperoxia. *J Biol Chem* 1997;272:16644-16651.

Hohenester B, Ruhl A, Kelber O, Schemann M: The herbal preparation STW5 (Iberogast) has potent and region-specific effects on gastric motility. *Neurogastroenterol Motil* 2004;16:765-773.

Holzer P, Lippe IT: Substance P can contract the longitudinal muscle of the guinea-pig small intestine by releasing intracellular calcium. *Br J Pharmacol* 1984;82:259-267.

Huidobro-Toro JP, Zhu YX: Neurotensin receptors on the ileum of the guinea-pig: evidence for the coexistence of inhibitory and excitatory receptors. *Eur J Pharmacol* 1984;102:237-250.

Katz JA, Itoh J, Fiocchi C: Pathogenesis of inflammatory bowel disease. *Curr Opin Gastroenterol* 1999;15:291-297.

Khayyal MT, Seif-El-Nasr M, El Ghazaly MA, Okpanyi SN, Kelber O, Weiser D: Mechanisms involved in the gastro-protective effect of STW 5 (Iberogast) and its components against ulcers and rebound acidity. *Phytomedicine* 2006;13 Suppl 5:56-66.

Kitabgi P, Freychet P: Effects of neurotensin on isolated intestinal smooth muscles. *Eur J Pharmacol* 1978;50:349-357.

Kitabgi P, Vincent JP: Neurotensin is a potent inhibitor of guinea-pig colon contractile activity. *Eur J Pharmacol* 1981;74:311-318.

Ko FN, Huang TF, Teng CM: Vasodilatory action mechanisms of apigenin isolated from *Apium graveolens* in rat thoracic aorta. *Biochim Biophys Acta* 1991;1115:69-74.

Kohen R, Nyska A: Oxidation of biological systems: oxidative stress phenomena, antioxidants, redox reactions, and methods for their quantification. *Toxicol Pathol* 2002;30:620-650.

Kullak A, Donoso MV, Huidobro-Toro JP: Extracellular calcium dependence of the neurotensin-induced relaxation of intestinal smooth muscles: studies with calcium channel blockers and BAY K-8644. *Eur J Pharmacol* 1987;135:297-305.

Kwan WP, Voelker BM: Rates of hydroxyl radical generation and organic compound oxidation in mineral-catalyzed Fenton-like systems. *Environ Sci Technol* 2003;37:1150-1158.

Latour I, Demoulin JB, Buc-Calderon P: Oxidative DNA damage by t-butyl hydroperoxide causes DNA single strand breaks which is not linked to cell lysis. A mechanistic study in freshly isolated rat hepatocytes. *FEBS Lett* 1995;373:299-302.

Laufer S: Role of eicosanoids in structural degradation in osteoarthritis. *Curr Opin Rheumatol* 2003;15:623-627.

Lehotsky J, Kaplan P, Matejovicova M, Murin R, Racay P, Raeymaekers L: Ion transport systems as targets of free radicals during ischemia reperfusion injury. *Gen Physiol Biophys* 2002;21:31-37.

Longstreth GF, Thompson WG, Chey WD, Houghton LA, Mearin F, Spiller RC: Functional bowel disorders. *Gastroenterology* 2006;130:1480-1491.

Lounsbury KM, Hu Q, Ziegelstein RC: Calcium signaling and oxidant stress in the vasculature. *Free Radic Biol Med* 2000;28:1362-1369.

Macherey-Nagel. Genomic DNA Extraction Protocol. 02. 2003. Macherey-Nagel, Corbett Robotics.

Mayer EA, Derbyshire S, Naliboff BD: Cerebral activation in irritable bowel syndrome. *Gastroenterology* 2000;119:1418-1420.

Mayer EA, Gebhart GF: Basic and clinical aspects of visceral hyperalgesia. *Gastroenterology* 1994;107:271-293.

- Mayer EA, Raybould H, Koelbel C: Neuropeptides, inflammation, and motility. *Dig Dis Sci* 1988;33:71S-77S.
- McKay DL, Blumberg JB: A review of the bioactivity and potential health benefits of chamomile tea (*Matricaria recutita* L.). *Phytother Res* 2006;20:519-530.
- Mertz H, Naliboff B, Munakata J, Niazi N, Mayer EA: Altered rectal perception is a biological marker of patients with irritable bowel syndrome. *Gastroenterology* 1995;109:40-52.
- Muller MH, Liu CY, Glatzle J, Weiser D, Kelber O, Enck P, Grundy D, Kreis ME: STW 5 (Iberogast) reduces afferent sensitivity in the rat small intestine. *Phytomedicine* 2006;13 Suppl 5:100-106.
- Musial F: [Psychophysiology of visceral pain]. *Schmerz* 2002;16:452-459.
- Musial F, Enck P: Reizdarmsyndrom; in Caspary WF, Stein J (eds): *Darmkrankheiten - Klinik, Diagnostik und Therapie*. Berlin Heidelberg, Springer-Verlag, 1996, pp 525-530.
- Nahde T, Murad D: Pfefferminze im neuen Gewand. *Z Phytotherapie* 2004;25:
- Nguyen L, Neugebauer W, Gobeil F, Pheng LH, Nsa AS, Regoli D: Pharmacological heterogeneity of neurotensin receptors: an in vitro study. *Can J Physiol Pharmacol* 1997;75:547-551.
- Peluso I, Campolongo P, Valeri P, Romanelli L, Palmery M: Intestinal motility disorder induced by free radicals: a new model mimicking oxidative stress in gut. *Pharmacol Res* 2002;46:533-538.
- Percy WH, Burton MB, Rose K, Donovan V, Burakoff R: In vitro changes in the properties of rabbit colonic muscularis mucosae in colitis. *Gastroenterology* 1993;104:369-376.
- Raneva V, Shimasaki H, Ishida Y, Ueta N, Niki E: Antioxidative activity of 3,4-dihydroxyphenylacetic acid and caffeic acid in rat plasma. *Lipids* 2001;36:1111-1116.
- Rangachari PK: Histamine: mercurial messenger in the gut. *Am J Physiol* 1992;262:G1-13.
- Reichling J, Saller R: [Iberis amara L. (bitter candytuft)—profile of a medicinal plant]. *Forsch Komplementarmed Klass Naturheilkd* 2002;9 Suppl 1:21-33.
- Rogers J, Henry MM, Misiewicz JJ: Increased segmental activity and intraluminal pressures in the sigmoid colon of patients with the irritable bowel syndrome. *Gut* 1989;30:634-641.



- Sadraei H, Asghari GR, Hajhashemi V, Kolagar A, Ebrahimi M: Spasmolytic activity of essential oil and various extracts of *Ferula gummosa* Boiss. on ileum contractions. *Phytomedicine* 2001;8:370-376.
- Saller R, Pfister-Hotz G, Iten F, Melzer J, Reichling J: [Iberogast: a modern phytotherapeutic combined herbal drug for the treatment of functional disorders of the gastrointestinal tract (dyspepsia, irritable bowel syndrome)—from phytomedicine to "evidence based phytotherapy." A systematic review]. *Forsch Komplementarmed Klass Naturheilkd* 2002;9 Suppl 1:1-20.
- Schemann M, Michel K, Zeller F, Hohenester B, Ruhl A: Region-specific effects of STW 5 (Iberogast) and its components in gastric fundus, corpus and antrum. *Phytomedicine* 2006;13 Suppl 5:90-99.
- Schempp H, Weiser D, Kelber O, Elstner EF: Radical scavenging and anti-inflammatory properties of STW 5 (Iberogast) and its components. *Phytomedicine* 2006;13 Suppl 5:36-44.
- Schneider J, Jehle EC, Starlinger MJ, Neunlist M, Michel K, Hoppe S, Schemann M: Neurotransmitter coding of enteric neurones in the submucous plexus is changed in non-inflamed rectum of patients with Crohn's disease. *Neurogastroenterol Motil* 2001;13:255-264.
- Schreiber S, Raedler A, Stenson WF, MacDermott RP: The role of the mucosal immune system in inflammatory bowel disease. *Gastroenterol Clin North Am* 1992;21:451-502.
- Shasby DM, Yorek M, Shasby SS: Exogenous oxidants initiate hydrolysis of endothelial cell inositol phospholipids. *Blood* 1988;72:491-499.
- Silverman DH, Munakata JA, Ennes H, Mandelkern MA, Hoh CK, Mayer EA: Regional cerebral activity in normal and pathological perception of visceral pain. *Gastroenterology* 1997;112:64-72.
- Simmen U, Kelber O, Okpanyi SN, Jaeggi R, Bueter B, Weiser D: Binding of STW 5 (Iberogast) and its components to intestinal 5-HT, muscarinic M3, and opioid receptors. *Phytomedicine* 2006;13 Suppl 5:51-55.
- Snetkov VA, Knock GA, Baxter L, Thomas GD, Ward JP, Aaronson PI: Mechanisms of the prostaglandin F<sub>2</sub>α-induced rise in [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> in rat intrapulmonary arteries. *J Physiol* 2006;571:147-163.
- Southorn PA, Powis G: Free radicals in medicine. II. Involvement in human disease. *Mayo Clin Proc* 1988;63:390-408.
- Spiller R, Campbell E: Post-infectious irritable bowel syndrome. *Curr Opin Gastroenterol* 2006;22:13-17.

Spiller RC, Jenkins D, Thornley JP, Hebden JM, Wright T, Skinner M, Neal KR: Increased rectal mucosal enteroendocrine cells, T lymphocytes, and increased gut permeability following acute Campylobacter enteritis and in post-dysenteric irritable bowel syndrome. *Gut* 2000;47:804-811.

Takara Biotechnology. Instruction for use of TaKaRa LA Taq Kit. 2005. Takara Bio Inc.

Talley NJ: Irritable bowel syndrome. *Intern Med J* 2006;36:724-728.

Teitelbaum DH, O'Dorisio TM, Perkins WE, Gaginella TS: Somatostatin modulation of peptide-induced acetylcholine release in guinea pig ileum. *Am J Physiol* 1984;246:G509-G514.

Teng CM, Lin CH, Ko FN, Wu TS, Huang TF: The relaxant action of osthole isolated from *Angelica pubescens* in guinea-pig trachea. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* 1994b;349:202-208.

Teng CM, Lin CH, Ko FN, Wu TS, Huang TF: The relaxant action of osthole isolated from *Angelica pubescens* in guinea-pig trachea. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* 1994a;349:202-208.

Thompson CA: Novartis suspends tegaserod sales at FDA's request. *Am J Health Syst Pharm* 2007;64:1020.

Tornblom H, Abrahamsson H, Barbara G, Hellstrom PM, Lindberg G, Nyhlin H, Ohlsson B, Simren M, Sjolund K, Sjoval H, Schmidt PT, Ohman L: Inflammation as a cause of functional bowel disorders. *Scand J Gastroenterol* 2005;40:1140-1148.

Tornblom H, Holmvall P, Svenungsson B, Lindberg G: Gastrointestinal symptoms after infectious diarrhea: a five-year follow-up in a Swedish cohort of adults. *Clin Gastroenterol Hepatol* 2007;5:461-464.

Trute A, Gross J, Mutschler E, Nahrstedt A: In vitro antispasmodic compounds of the dry extract obtained from *Hedera helix*. *Planta Med* 1997;63:125-129.

van der Vliet A, Tuinstra TJ, Bast A: Modulation of oxidative stress in the gastrointestinal tract and effect on rat intestinal motility. *Biochem Pharmacol* 1989;38:2807-2818.

Wagner H: Multitarget therapy—the future of treatment for more than just functional dyspepsia. *Phytomedicine* 2006;13 Suppl 5:122-129.

Waterston RH, Lindblad-Toh K, Birney E, Rogers J et al.: Initial sequencing and comparative analysis of the mouse genome. *Nature* 2002;420:520-562.

Wegener T, Wagner H: The active components and the pharmacological multi-target principle of STW 5 (Iberogast). *Phytomedicine* 2006;13 Suppl 5:20-35.

## Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich ganz herzlich bei allen bedanken, die mich während meiner Doktorarbeit unterstützt und zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben.

Mein besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr. Helmut Heinle für die Überlassung des interessanten Themas, für die ausgezeichnete Betreuung bei den Versuchsdurchführungen, für die Möglichkeit der Teilnahme an Kongressen und für die hervorragende stete Unterstützung beim Erstellen dieser Dissertation.

Herrn Prof. Dr. Stefan Laufer danke ich für die Übernahme des Referates und die angenehme Betreuung der Arbeit in der Fakultät für Chemie und Pharmazie.

Der Firma Steigerwald GmbH, insbesondere Herrn Dr. Dieter Weiser und Herrn Dr. Olaf Kelber, danke ich für die Unterstützung und die gute Zusammenarbeit, das Bereitstellen der untersuchten Extrakt-Proben und die Möglichkeit der Teilnahme an Kongressen.

Bei Herrn Prof. Dr. Karl Lackner und Herrn PD Dr. Michael Torzewski des Institutes für Klinische Chemie und Laboratoriumsmedizin der Universität Mainz möchte ich mich bedanken für die Bereitstellung der Glutathionperoxidase1(-/-)-Mäuse.

Ferner danke ich Herrn PD Dr. Gerhard Maier des Instituts für Allgemeine, Viszeral- und Transplantationschirurgie der Universität Tübingen für die Bereitstellung des OP-Materials.

Der Alfred Teufel-Stiftung danke ich für ihre finanzielle Unterstützung.

Ein besonderer Dank gilt Dayong Zhang für die tolle außergewöhnliche Zusammenarbeit im Labor und darüber hinaus.

Ganz herzlich möchte ich mich auch bei allen meinen Kollegen und Kolleginnen für die angenehme und schöne Zeit im Labor bedanken: Dan Turcanu, Annette Hartwich, Dr. Felor Amraei-Davijani, Dr. Ines Germann, Uschi Pascht, Katrin Wald, Steffi, Frederike, Johanna, Viktoria, Nina, Carolin, Diana und Christina.

Herrn Dr. Horst Apfel danke sehr ich für seine freundliche Hilfsbereitschaft und sein Interesse am Fortgang meiner Arbeit.

Ferner bedanke ich mich bei allen Mitarbeitern des Physiologischen Instituts für Ihre freundliche stete Hilfsbereitschaft.

Frau Elisabeth Fischer und meinen Kolleginnen in der City Apotheke Stuttgart danke ich für die nette Zusammenarbeit und ihr Interesse am Fortgang meiner Arbeit.

Bei Frau Barbara Meffert bedanke ich mich ebenso für die angenehme und unkomplizierte Zusammenarbeit an der Schule für Logopädie.

Mein ganz besonderer Dank gilt meinem Freund Andreas Domke, meinen Eltern und meinen Brüdern für Ihre liebe, rückhaltlose Unterstützung in jeder Hinsicht.

## **Meine akademischen Lehrer**

Dr. Bremecker

PD Dr. Gillmann

Prof. Dr. Haake

Prof. Dr. Häberlein

Prof. Dr. Hanefeld

PD Dr. Hilp

Prof. Dr. Imming

Prof. Dr. Kissel

Prof. Dr. Klebe

Prof. Dr. Klumpp

Prof. Dr. Dr. Krieglstein

Prof. Dr. Kuschinsky

Dr. Lohöfer

Prof. Dr. Matern

Prof. Dr. Matusch

PD Dr. Opper

Prof. Dr. Petersen

Prof. Dr. Radsak

Prof. Dr. Schlitzer

Prof. Dr. Seitz

Prof. Dr. Sickmüller



# Lebenslauf

## Persönliche Daten

Name	Daniela Hagelauer
Geburtstag	15.11.1977
Geburtsort	Würzburg

## Ausbildung

1984 – 1988	Overberg Grundschule, Siershahn
1988 – 1997	Mons-Tabor-Gymnasium, Montabaur
Okt. 1998 – Okt. 2002	Studium der Pharmazie an der Philipps-Universität, Marburg
Nov. 2002 – April 2003	1. Praktikumshalbjahr in der Süd Apotheke, Frankfurt
Mai 2003 – Okt. 2003	2. Praktikumshalbjahr in der Hirsch Apotheke, Frankfurt
05.12.2003	Approbation als Apothekerin

## Berufliche Tätigkeit

Dez. 2003 - März 2004	Viktoria Apotheke, Frankfurt
März 2004 - Juni 2004	Schloß Apotheke, Montabaur
Juli 2004 - Juli 2007	City Apotheke, Stuttgart
Okt. 2004 -	Lehrtätigkeit an der Schule für Logopädie an der Universität Tübingen
Juli 2004 -	Beginn der Dissertation mit dem Titel „In vitro Untersuchungen zur Wirkung von Phytopharmaka auf die Kontraktilität des Mäuse-Ileums: Mögliche Bedeutung für die Therapie des Reizdarmsyndroms“ unter der Anleitung von Herrn Prof. Dr. H. Heinle im Physiologischen Institut der Eberhard-Karls-Universität, Tübingen