

Aus dem Institut für Physiologie der Universität Tübingen

Abteilung Physiologie II

Direktorin: Professor Dr. O. Garaschuk

**Oxidativer Stress und Mastzellen:  
Ansatzmöglichkeiten bei der Phytotherapie des  
Reizdarmsyndroms?**

Inaugural-Dissertation  
zur Erlangung des Doktorgrades  
der Zahnheilkunde

der Medizinischen Fakultät  
der Eberhard Karls Universität  
zu Tübingen

**vorgelegt von  
DONYA JANDAGHI  
aus Robat Karim (Teheran/Iran)**

**2011**

Dekan: Professor Dr. I. B. Autenrieth

1. Berichterstatter: Professor Dr. H. Heinle

2. Berichterstatter: Professor Dr. P. Enck

**Meinen Eltern in grenzenloser Dankbarkeit gewidmet**

## Inhaltsverzeichnis

<b>1</b>	<b>Einleitung und Fragestellung</b>	<b>1</b>
<b>1.1</b>	<b>Reizdarmsyndrom</b>	<b>1</b>
1.1.1	Definition, Symptome und Therapie	1
1.1.2	Ätiologie	2
1.1.3	Pathophysiologische Grundlagen	3
<b>1.2</b>	<b>Ileum der Maus als Modell für pharmakologische Studien</b>	<b>4</b>
1.2.1	Anatomie und Physiologie des Ileums	4
1.2.2	Immunologische Aspekte	5
1.2.3	Vorkommen, Einteilung und Funktion von Mastzellen	6
1.2.4	Interaktionen zwischen Nervensystem und Mastzellen	7
1.2.5	Mastzellaktivierung beim Reizdarmsyndrom	7
<b>1.3</b>	<b>Oxidativer Stress</b>	<b>8</b>
1.3.1	Bildung und Bedeutung reaktiver Sauerstoffspezies	8
1.3.2	Entgiftungsmechanismen für ROS	9
1.3.3	Oxidativer Stress und seine Bedeutung in der Pathophysiologie	11
<b>1.4</b>	<b>Therapie mittels Phytopharmaka</b>	<b>12</b>
1.4.1	STW 5	12
1.4.2	Einzelextrakte aus STW 5 und ihre Wirkungen auf GIT	13
<b>1.5</b>	<b>Fragestellung</b>	<b>14</b>
<b>2</b>	<b>Materialien</b>	<b>15</b>
<b>2.1</b>	<b>Geräte</b>	<b>15</b>
<b>2.2</b>	<b>Chemikalien</b>	<b>15</b>
<b>2.3</b>	<b>Lösungen</b>	<b>16</b>
<b>2.4</b>	<b>STW 5</b>	<b>18</b>
2.4.1	Extrakte aus STW 5	18
<b>2.5</b>	<b>Biologisches Material</b>	<b>19</b>
2.5.1	Isolierte Mastzellen	19
2.5.2	Präparate aus Mäuseileum	20

<b>3</b>	<b>Methoden</b>	<b>21</b>
3.1	Radikalbildung durch Zymosan und H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	21
3.2	Radikalbildung durch Darmpräparate	23
3.3	Radikalbildung durch isolierte Mastzellen	25
3.4	Statistik	28
<b>4</b>	<b>Ergebnisse</b>	<b>29</b>
4.1	Einfluss von STW 5 und seinen Komponenten auf die Zymosan-H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> - Reaktion	29
4.2	Einfluss von STW 5 und seinen Komponenten auf Histamin induzierte Radikalbildung von Darmpräparaten	36
4.3	Einfluss von STW 5 und seinen Komponenten auf die Zymosan-stimulierte Radikalbildung von isolierten Mastzellen	37
4.4	Untersuchung zur pharmakologischen Synergien zwischen den Einzelextrakten in STW 5	44
4.4.1	Untersuchung mittels der Zymosan- H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> - Reaktion	44
4.4.2	Untersuchung mittels des Darmmodells	44
4.4.3	Untersuchung mittels des Mastzellenmodells	45
<b>5</b>	<b>Diskussion</b>	<b>47</b>
5.1	STW 5 und seine Komponenten als Antioxidantien	47
5.1.1	Antioxidative Effekte in chemischen radikalbildenden Systemen	47
5.1.2	Antioxidative Effekte in zellulären Systemen	49
5.1.2.1	Antioxidative Effekte im Darmmodell	49
5.1.2.2	Antioxidative Effekte mit Mastzellen	50
5.1.2.3	Antioxidative Effekte in weiteren zellulären Systemen	51
5.1.3	Synergieeffekte zwischen den Einzelextrakten von STW 5	52
5.2	Oxidativer Stress und Mastzellen in der Pathogenese des RDS- können die antioxidativen Eigenschaften zur therapeutischen Wirkung von STW 5 beitragen?	54

<b>6</b>	<b>Zusammenfassung</b>	<b>56</b>
<b>7</b>	<b>Literaturverzeichnis</b>	<b>58</b>
<b>8</b>	<b>Danksagung</b>	<b>70</b>
<b>9</b>	<b>Lebenslauf</b>	Fehler! Textmarke nicht definiert.

## Abkürzungsverzeichnis

ANG	Angelikawurzel
CL	Chemilumineszenz
D	Darmpräparat
GALT	Darm-assoziierte-lymphatische Gewebe
GIT	Gastrointestinaltrakt
GSH	Gluthathion
HIS	Histamin
IBE	Iberis amara
IgA	Immunglobulin A
KAM	Kamille
KÜM	Kümmel
MZ	Mastzellen
MAR	Mariendistel
MEL	Melisse
MW	Mittelwert
PFE	Pfefferminz
RDS	Reizdarmsyndrom
RLU	relative Lightunits
ROS	Reaktive Sauerstoffspezies
SCHÖL	Schöllkraut
SD	Standardabweichung
SÜSS	Süßholzwurzel
WT	Wildtyp
ZYM	Zymosan

# **1 Einleitung und Fragestellung**

## **1.1 Reizdarmsyndrom**

### **1.1.1 Definition, Symptome und Therapie**

Das Reizdarmsyndrom (RDS) ist eine heterogene funktionelle, auf Dünn- und Dickdarm bezogene Darmerkrankung. Sie betrifft vor allem junge Menschen unter 45 Jahren und kommt bei Frauen doppelt so häufig vor wie bei Männer (Kolfenbach 2007).

Das RDS kann in vier Untergruppen klassifiziert werden, dazu gehören Diarrhö-Obstipations-, Schmerz- und Blähtyp. Die Sicherung der Diagnose stützt sich auf eine typische Symptomenkonstellation mit rezidivierenden krampfartigen Schmerzen im Unterbauch, Meteorismus, Schleimabgang, Obstipation und/oder Diarrhö. Zu den Begleitsymptomen zählen unter anderem Dyspepsie, Sodbrennen, Übelkeit/ Erbrechen, Distensionsgefühl im Darm und Nahrungsunverträglichkeit (Hotz et al. 2000).

Ausgehend von der aktuelle ROM III-Kriterien der American Gastroenterological Association kann eine positive Diagnose des RDS erteilt werden, wenn der Patient die Symptome länger als sechs Monate verfolgen konnte und diese für mindestens drei Tage pro Monat über einen definierten Zeitraum von wenigstens drei Monaten vorhanden sind (Drossman & Dumitrascu 2006). Mit Hilfe einer Einteilung der Stuhlqualität können verschiedene Subtypen differenziert werden (Longstreth et al. 2006).

Die Behandlung des RDS stützt sich auf drei Säulen: Ärztliche Führung und Ernährungsberatung, medikamentöse Therapie sowie eine psychosomatische Grundversorgung und Psychotherapie. Bei einer medikamentösen Behandlung werden zum Beispiel bei Obstipation-dominanten RDS Abfuhrmittel und bei Diarrhö-dominanten RDS Abfuhr hemmende Wirkstoffe verabreicht. Die Wirksamkeit verschiedener andere Ansätze, wie Pfefferminzöl, Ballaststoffe oder krampflösende Medikamente belegt eine neue Meta-Untersuchung bekannter Studien (Ford et al. 2008). Wasserlösliche Ballaststoffe wie z.B. Flohsamenschalen haben sich als empfehlenswert herausgestellt (Bijkerk et al.



2009). Auch pflanzliche Wirkstoffe wie Pfefferminzöl oder hochkonzentrierter Extrakt aus Melissenblättern haben sich bei Reizdarm etabliert (Ford et al. 2008). Ebenso konnte durch ein Antibiotikum (Rifaximin) eine signifikante Verbesserung der Reizdarmsymptomatik erzielt werden (Pimentel et al. 2007), da bei etwa ein Drittel der Reizdarmpatienten ein gastrointestinaler Infekt (postinfektiöses RDS) als Ursache der Erkrankung betrachtet wird (Kassinen et al. 2007). Einen hohen Stellenwert hat auch das Phytotherapeutikum STW 5, das sich in einer placebokontrollierten Doppelblindstudie bei 103 RDS-Patienten als wirksam erwiesen hat (Madisch et al. 2004a, 2004b). Anhand der Wirkweise von STW 5 lässt sich zeigen, dass bei pflanzlichen Arzneimitteln das Ganze mehr sein kann als die Summe seiner Teile (Allescher et al. 2009).

### **1.1.2 Ätiologie**

Die Ätiologie des RDS ist bisweilen unklar. Vermutete Mechanismen sind eine genetische Prädisposition, chronische Entzündung, Infektionen, Stress und psychosomatische Probleme. Oft kann ein Ungleichgewicht lokaler Mediatoren, Hormone und Zellen zum Beispiel für Allergien (Mastzellen MZ, IgE) und für Entzündungen (Histamin, Bradykinin) sowie für Neurotransmittern (vor allem des Serotonins) festgestellt werden (Wang et al. 2007). Desweiteren kann eine viszerale Hypersensibilität zu einer zentralen Störung der Schmerzverarbeitung im Gehirn und dadurch zu einer gestörten neuronalen Interaktion zwischen cerebraler, spinaler und enterischer Ebene führen (Barbara et al. 2002).

### 1.1.3 Pathophysiologische Grundlagen

Die Pathogenese ist multifaktoriell und bis dato noch nicht eindeutig geklärt. Es handelt sich offensichtlich um eine komplexe Interaktion physiologischer, psychologischer und sozialer Faktoren (Wächtershäuser & Stein 2008). Als gesichert gilt das Vorliegen einer viszeralen Überempfindlichkeit aufgrund einer zentralen und/ oder peripheren Fehlregulation (Faure et al. 2007). Darüber hinaus ist das Risiko, ein RDS zu entwickeln, nach einer infektiösen Gastroenteritis 5-10fach erhöht (Halvorson et al. 2006, Spiller & Campbell 2006). Vermutlich persistiert eine leichte Entzündung, die zu Störungen der mukosalen Funktion und Struktur führt (Camilleri 2006). So wurden bei Patienten mit RDS neben Veränderungen in der Darmflora auch erhöhte Konzentrationen von Serotonin-bildenden Zellen sowie von Mastzellen (MZ) und Entzündungsmediatoren in der Mukosa festgestellt (Spiller & Campbell 2006).

Bei vielen Erkrankungen des Gastrointestinaltraktes wie zum Beispiel beim RDS spielen Entzündungen eine große Rolle. Da einerseits reaktive O<sub>2</sub>-Spezies (ROS) vermutlich signifikant an den Krankheitsbildern beteiligt sind, andererseits Phytotherapeutika einen hohen Stellenwert bei diesen chronischen Erkrankungen haben, sollte daher geklärt werden, inwieweit radikalfangende Eigenschaften zum Beispiel bei der Präparation Iberogast<sup>®</sup> (STW 5), zumindest als Teilwirkung beobachtet werden können.

Da das Reizdarmsyndrom als Erkrankung den gesamten Dünn- und Dickdarm betreffen kann, wählten wir für unsere Versuche Präparate des terminalen Ileums, dessen Anatomie und Physiologie in den nächsten Kapiteln näher beschrieben werden.

## **1.2 Ileum der Maus als Modell für pharmakologische Studien**

### **1.2.1 Anatomie und Physiologie 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 Schleimhaut (Mukosa) besteht aus einem vielfach aufgefalteten Zylinderepithel. Dieses wird zum überwiegenden Teil von den Saumzellen (Enterozyten) gebildet und ist verantwortlich für die Resorption aus dem Darm. Zudem existieren in der Mukosa noch vereinzelt Becherzellen, die Schleim produzieren. Die Mukosa besitzt eine sehr dünne Eigenmuskelschicht (Lamina muscularis mucosae), die Bewegungen der Schleimhaut möglich macht und somit den Kontakt zwischen Speisebrei und Mukosa intensiviert.

Die Submukosa ist eine bindegewebige Verschiebeschicht zwischen Schleimhaut (Mukosa) und Muskelschicht (Muskularis). In der Submukosa befindet sich ein Teil des Nervensystems des Dünndarms (Meissner- Plexus), welcher die Schleimhaut innerviert.

Die Muskelschicht besteht aus glatter Muskulatur und ist in Form einer inneren Ring- und einer äußeren Längsmuskelschicht angelegt. Zwischen den beiden Muskelschichten befindet sich ein weiteres Nervengeflecht, welches ebenfalls zum enterischen Nervensystem gehört (Auerbach- Plexus). Dieses innerviert beide Schichten der Muskulatur.

Die Serosa ist das Blatt des Bauchfells, welches die Eingeweide überzieht.

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

### 1.2.2 Immunologische Aspekte

Der Darm ist das Zentrum der Immunabwehr. Etwa 70 bis 80 Prozent aller Immunzellen sind im Darm lokalisiert (Gustav et al. 2006).

Da immunologische Faktoren die Entstehung von RDS fördern, (es wurde zum Beispiel unter anderem eine erhöhte Anzahl an MZ in der Mukosa des Ileums und Kolons nachgewiesen (Wetson 1993)) und auch einen negativen Einfluss auf den Verlauf der Erkrankung nehmen, indem sie den Entzündungsprozess durch Überreaktionen des mukosalen Immunsystems verstärken (Friedt 2008)-sollen hier in erster Linie die mukosalen Abwehrmechanismen angesprochen werden.

Die an den immunologischen Mechanismen beteiligten Schleimhäute verfügen über ein für die Bekämpfung pathogener Antigene spezialisiertes Immunsystem mit speziellen strukturellen und funktionellen Eigenschaften (GALT = Darm-assoziierte-lymphatische Gewebe). Das GALT besteht aus einem Netzwerk mit integrierten nicht-lymphatischen und lymphatischen Geweben, Entzündungszellen und Effektormolekülen. Bei den nicht-lymphatischen Gewebezellen ist die Darmepithelzelle (microfold-zells, M-Zellen) die wichtigste. Aufgrund ihres Aufbaus und ihrer Funktion sind unter den lymphatischen Geweben des GALT's neben den mesenterialen Lymphknoten die Peyerschen Plaques und die Lymphfollikel von besonderer Bedeutung.

Weiterhin wichtig sind die Entzündungszellpopulationen: Sie beinhalten CD4<sup>+</sup>-T-Helferzellgruppen, die intraepithelialen zytotoxischen CD8<sup>+</sup>-T-Zellen, die Immunglobulin A (IgA) produzierenden B-Zellen, die Monozyten/ Makrophagen, Mastzellen und zudem die antigenpräsentierenden dendritischen Zellen. Von Bedeutung bei den Effektormolekülen sind die pro- und antiinflammatorischen Zytokine und ebenso IgA. Immunzellen finden sich innerhalb des Epithels, der Lamina propria, den Lymphfollikel-ähnlichen Strukturen der Submukosa, den Peyerschen Plaques sowie den Lymphfollikeln des Dickdarms (Kleinschmidt 2007).

Da der Einfluss von MZ beim RDS zunehmend an Bedeutung gewinnt (Bilge et al. 2005; Guilarte et al. 2007; Farhadi et al. 2007; Piche et al. 2008; Farmer & Aziz 2008; Spiller & Garsed 2009; Kiank et al. 2010) werden im nächsten Abschnitt Vorkommen, Einteilung und Funktion der MZ beschrieben.

### **1.2.3 Vorkommen, Einteilung und Funktion von Mastzellen**

Vor über 100 Jahren entdeckte Paul Ehrlich die MZ (Ehrlich 1879). Histochemisch lassen sich MZ aufgrund der Metachromasie ihrer Granula durch kationische Färbelösungen wie Kresylecht-Violett oder Toluidin-Blau darstellen (Penissi et al. 2003). In ihren Granula enthalten MZ eine ganze Reihe präformierter Mediatoren wie Histamin, Heparin und Proteasen, die infolge einer Mastzellaktivierung freigesetzt werden (Robbie- Ryan & Brown 2002).

MZ kommen ubiquitär im Bindegewebe und in den Schleimhäuten vor, besonders an inneren und äußeren Grenzflächen, z.B. Haut, Atmungs- und Gastrointestinaltrakt (Molderings 2010). Sie sind besonders zahlreich in der Nähe von kleinen Blut- und Lymphgefäßen und von Nervenendigungen. Daher, und aufgrund der enormen Anzahl pharmakologisch potenter Mediatoren, die zum Teil chemotaktische, vasoaktive (z.B. Leukotriene, PAF) oder proinflammatorische sowie Wachstum stimulierende (z.B. Interleukine, VEGF) Eigenschaften besitzen, ist die Beteiligung von MZ an zahlreichen pathologischen und physiologischen Abläufen im Körper anzunehmen.

Bei der Maus werden zwei unterschiedliche MZ Phänotypen beschrieben, die Bindegewebsmastzellen (Connective Tissue Type Mast Cell, CTMC) und Mukosamastzellen (Mucosal Type Mast Cell, MMC) (Enerbäck 1966a, 1966b). Die Unterscheidung wird aufgrund der Art der Lokalisation, Morphologie, Färbeeigenschaft, Granulainhalt und der Aktivierung und Aktivierungshemmung durch verschiedene Substanzen durchgeführt (Noli & Miolo 2001; Malaviya & Abraham 1998).

Zu den klassischen immunologischen Funktionen der Mastzellen zählt ihre Beteiligung an der allergischen Sofortreaktion und an Immunglobulin E vermittelten allergischen Reaktionen (Molderings 2010). MZ übernehmen eine wichtige Rolle in der angeborenen Immunität gegen Bakterien (Echternacher et al. 1996; Malaviya et al. 1996) und der erworbenen Immunität gegen Parasiten (Ruitenbergh & Elgersma 1976).

Eine Mastzellaktivierung und ihre Granulafreisetzung führen im GIT zu einer verstärkten Peristaltik und zu einer erhöhten Flüssigkeitssekretion was letztlich unter anderem zum Erbrechen und Diarrhö führen kann.

#### **1.2.4 Interaktionen zwischen Nervensystem und Mastzellen**

Eine Interaktion zwischen MZ und Nerven wurde in den letzten Jahren in einigen Studien nachgewiesen (Bauer & Razin 2000; Barbara et al. 2007; Monk et al. 2007; Schäppi et al. 2008).

Zum einem wird gezeigt, dass zum Beispiel nach einer Gewebsverletzung afferente Nerven stimuliert werden und dadurch ihre Mediatoren freisetzen, um benachbarte Zellen zu beeinflussen (Gottwald et al. 1998), zum anderem, dass ein emotionaler Reiz einen Stimulus auslöst, der durch autonome Nerven an primäre afferente sensorische Nerven weitergeleitet wird. Diese geben den Reiz weiter, so dass es zu einer Freisetzung verschiedener Neurotransmitter aus den sensorischen Nervenendigungen kommt, die eine Mastzelldegranulation auslösen (Black & Garbutt 2002).

#### **1.2.5 Mastzellaktivierung beim Reizdarmsyndrom**

Experimentelle Untersuchungen zeigten, dass bei RDS Mastzellen und MZ-Nerven- Synapsen akkumulieren und dass diese Veränderungen mit der klinischen Symptomatik korrelieren (O'Sullivan et al. 2000; Collins & Barbara 2004; Wood 2006; Park et al. 2006; Wang et al. 2007; Bischoff 2009). In einer Studie wurden an 20 Patienten mit einem Diarrhö- dominanten RDS und an 14

gesunden Kontrollpersonen hinsichtlich einer Mastzellaktivität im Dünndarm Untersuchungen durchgeführt. Die Patienten mit einem Durchfall- dominanten RDS hatten eine signifikant höhere Stressbelastung und zu dem signifikant mehr Mastzellen im Jejunum (Guilarte et al. 2007).

Da auch Mastzellaktivierung zu oxidativem Stress beiträgt, soll im nächsten Kapitel kurz dessen pathophysiologische Bedeutung zusammengefasst werden.

## **1.3 Oxidativer Stress**

### **1.3.1 Bildung und Bedeutung reaktiver Sauerstoffspezies**

Oxidativer Stress ist ein Zustand, bei dem die Zellen exzessiv hohen Konzentrationen von molekularem Sauerstoff ( $O_2$ ) oder chemischen Derivaten von Sauerstoff, sogenannten reaktiven Sauerstoffspezies (ROS) ausgesetzt sind. Zahlreiche Basismechanismen des Zellstoffwechsels führen zur Produktion von ROS. Zu den reaktiven Sauerstoffspezies zählen radikalische Substanzen, wie das Hydroxylradikal ( $\cdot OH$ ), das Superoxidationradikal ( $\cdot O_2$ ) und Peroxylradikale ( $ROO\cdot$ ) und nicht radikalische Verbindungen wie Wasserstoffperoxid ( $H_2O_2$ ) oder die Hypochlorsäure ( $HOCl$ ). Freie, nicht an Proteine gebundene Übergangsmetalle wie Eisen oder Kupfer fördern zusätzlich die Generierung von ROS und können die Umwandlung von weniger toxisch wirkenden Radikalen (Superoxidradikale) in hochtoxische Hydroxylradikale begünstigen. Diese ROS können prinzipiell für alle Zellen toxisch wirken, endogene Moleküle wie Lipide, Proteine oder auch Nukleinsäuren oxidativ verändern und in Folge funktionell beeinträchtigen. Doch haben Sauerstoffradikale zum Teil auch nützliche Effekte und können im Organismus auch physiologische Funktionen haben. Zum Beispiel fungieren Sauerstoffradikale in biomechanischen Prozessen und intrazellulären Signalmechanismen als regulatorische Moleküle (Siems et al. 2005). Aktivierte phagozytäre Zellen (Monocyten, neutrophile und eosinophile Granulocyten

sowie die meisten Makrophagen- Typen) produzieren  $O_2^-$ - Radikale über NADPH- Oxidase im Rahmen der bakteriellen Abwehr („respiratory burst“). Eine andere wichtige Eigenschaft haben die freien Radikale wahrscheinlich bei der Apoptose, dem programmierten Zelltod, welche für die körpereigene Unterdrückung von Krebserkrankungen von großer Bedeutung ist (Siems et al. 2005; Irani 2000). Im Körper entstehen ROS einerseits endogen wie z.B. in der mitochondrialen Atmungskette oder in der NADPH-Oxidase-Reaktion und andererseits exogen durch Umwelteinflüsse wie zum Beispiel Chemikalien und Arzneimittel. Radikale werden auch bei inflammatorischen Erkrankungen im Körper vermehrt gebildet. Übersteigt die Bildung freier Radikale die antioxidative Kapazität des Organismus, kommt es zum oxidativen Stress (Kohen and Nyska 2002). Oxidativer Stress verursacht Zellschäden und wird als pathogenetischer Mechanismus vieler Erkrankungen angesehen (s. 1.1.3)

### **1.3.2 Entgiftungsmechanismen für ROS**

Der menschliche Organismus verfügt über ein komplexes Armamentarium zur Entgiftung der ROS, wobei alle aeroben Zellen verschiedene enzymatische und nicht enzymatische Schutzmechanismen benutzen. Es handelt sich um ein komplexes Abwehrsystem, in das eine Vielzahl von sog. Antioxidantien eingebunden sind (Chapple 1997; Halliwell 1994).

In diesem Zusammenhang spielt das Enzym Superoxiddismutase eine bedeutende Rolle, weil dieses Enzym die Umwandlung von Superoxidradikalen in das ungefährlichere Wasserstoffsuperoxid katalysiert. Dieses wird dann durch zwei weitere Enzyme, die Glutathionperoxidase und Katalase inaktiviert. Während Katalase direkt zu den Endprodukten  $O_2$  und  $H_2O$  führt, ist die Aktivität der Glutathionperoxidase von einer ausreichenden Konzentration des Co-Faktors Glutathion (GSH) abhängig. Um die gesamte Schutzreaktion erfolgreich in Richtung GSH- Peroxidase zu verschieben, sind weitere Antioxidantien oder Radikalfänger notwendig, die z.T. über die Nahrung aufgenommen werden



müssen. Zu ihnen gehört auch das Vitamin E, das den Abbau vielfach ungesättigter Fettsäuren in den Membranen durch ROS verhindern kann. Durch die Reaktion an den Membranen mit peroxidierten Fettsäuren wird Vitamin E selbst zu einem Radikal. Dieses kann aber wiederum durch Vitamin C,  $\beta$ -Karotin, Ubichinon oder andere Antioxidantien regeneriert werden.

Letztlich werden die oxidierten Antioxidantien über GSH reduziert und durch GSH-Reduktase und NADPH vollständig entgiftet.

Präventive Antioxidantien, wie Transferrin, Lactoferrin, Caeruloplasmin und Albumin, binden Übergangsmetallionen wie Kupfer ( $\text{Cu}^{2+}$ ) und Eisen ( $\text{Fe}^{2+}$ ). Diese stehen dann nicht mehr als Katalysatoren bei der wichtigen Haber-Weiss-Redox-Reaktion zur Verfügung (Leeuwenburgh & Heinecke 2001). Neben den Übergangselementen Eisen und Kupfer wird auch eine Beteiligung der Schwermetalle Cadmium und Quecksilber an der Genese ROS diskutiert (Ercal et al. 2001; Valko et al. 2005). Pflanzliche Antioxidantien sogenannte Polyphenole wie Flavonoide, Anthocyane, Proanthocyanidine, Catechine, Tannine und Cumarinderivate sowie polyfunktionelle organische Säuren gehören zu der großen Gruppe der sekundären Pflanzeninhaltsstoffe. Ihr Wirkungsspektrum ist sehr breit gefächert. Neben antikanzerogenen, antimikrobiellen, antiödematösen, antiphlogistischen und immunmodulierenden Wirkungen sind Polyphenole ausgeprägte Antioxidantien. Anthocyane und Proanthocyanidine gehören zu den stärksten Antioxidantien unter den Flavonoiden. Flavonoide schützen mehrfach ungesättigte Fettsäuren vor der Lipidperoxidation und sind gleichzeitig natürliche Vitaminverstärker. Sie können andere Antioxidantien wie Vitamin E und Vitamin C regenerieren und dadurch deren Wirksamkeit verstärken (Graf et al. 2005). Desweiteren wird angenommen, dass diese Komponenten über die Nahrung wichtige protektive Wirkungen im Organismus entfalten und zum Beispiel zu den positiven Effekten einer mediterranen Ernährung beitragen (Schaffer 2005).

Dennoch bieten die antioxidativ wirksamen Substanzen keinen ausreichenden Schutz, deshalb gibt es zusätzliche Reparaturenzyme, die zum Beispiel ROS-verursachte Protein- oder DNA-Schäden wieder reparieren können (Halliwell 1994). Die durch ROS induzierten Einzel- und Doppelstrangbrüche in der DNA

werden in einem zweiphasigen Prozess sehr schnell repariert. Dabei stehen nach neueren Erkenntnissen zwei Möglichkeiten zur Verfügung. Zu einem die long-patch- und zum anderen die short-patch- Reparatur. In beiden Fällen dient Poly(ADP- Ribose)- Polymerase 1 als Sensor. Dieses Enzym bindet an den Einzel- oder Doppelstrangbruch, wird aktiviert und synthetisiert nun negativ geladene ADP-Ribose-Polymere, die wiederum zu einer Wiederherstellung der Schadenstelle führen (Caldecott 2003).

### **1.3.3 Oxidativer Stress und seine Bedeutung in der Pathophysiologie**

Krankheiten, die mit oxidativem Stress in Verbindung gebracht werden, sind u. a. Atherosklerose (Kondo et al. 2009), Krebs (Siems et al. 2005), entzündliche Erkrankungen wie rheumatoide Arthritis (Halliwell et al. 1992), entzündliche Darmerkrankungen (Kruidenier et al. 2003), koronare Herzkrankheit, Myokardinfarkt, Apoplex, Grauer Star, Diabetes mellitus, neurodegenerative Erkrankungen wie Morbus Parkinson und Alzheimer-Demen (Tieu et al. 2003), z. B. Asthma bronchiale (Dworski 2000), Parodontitis (Battino et al. 2002), Alterungsprozesse sowie Reperfusionsschädigungen nach Ischämie (Pierce et al. 2004; Biesalski et al. 2002).

Die bei oxidativem Stress vermehrt vorhandenen ROS verursachen Gewebeschäden auf ganz unterschiedliche Weise: Proteine und DNA werden geschädigt, es kommt zur Lipidperoxidation, wichtige Enzyme werden oxidiert und proinflammatorische Zytokine werden vermehrt freigesetzt (Chapple 1997). Beachtet werden sollte, dass ROS zum einen kausal in der Pathogenese verschiedener Krankheiten eine Rolle spielen können, zum anderen bei vielen Erkrankungen sekundär auf Grund von Gewebeschädigung vermehrt gebildet werden (Halliwell et al. 1992).

## **1.4 Therapie mittels Phytopharmaka**

Folgend wird STW 5 und seine Einzelkomponenten, die in der vorliegenden Arbeit untersucht wurden, näher erläutert.

### **1.4.1 STW 5**

STW 5 ist eine fixe pflanzliche Arzneimittelkombination aus neun Einzelextrakten. Bei den Extrakten handelt es sich um Iberis amara als Frischpflanzenauszug (Iberis amara totalis) und 8 weitere Pflanzen als Drogenauszüge (Pfefferminzblättern, Kamillenblüten, Süßholzwurzel, Angelikawurzel, Kümmelfrüchten, Mariendistelfrüchten, Melissenblättern und Schöllkraut). Im nächsten Kapitel werden die Wirkungen der Einzelkomponenten auf den GIT dargestellt.

Die Inhaltsstoffe von STW5 vermindern die gastrointestinale Hypersensibilität (Lui et al. 2004; Müller et al. 2006), wirken spasmolytisch auf verkrampfte und tonisierend auf atonische Muskulatur (Ammon et al. 2006; Heinle et al. 2006). Zudem wurden eine stimulierende Wirkung bei verminderter Mucussekretion, eine hemmende Wirkung bei erhöhter Magensäuresekretion (Schnitker & Schöneberg 2000; Khayyal et al. 2001) sowie eine antiinflammatorische, antibakterielle (Saller et al. 2002; Allescher & Wagner 2007), karminative und antioxidative Wirkung gezeigt (Germann et al. 2006; Michael et al. 2006). Gerade bei funktionellen Beschwerden wie Reizmagen und RDS hat sich STW 5 als wirksam erwiesen (Madisch et al. 2004b; Allescher 2006; Holtmann et al. 2004; Saller et al. 2002). Des Weiteren wurde anhand experimenteller Untersuchungen an der Ratte eine ulcusprotektive Wirkung, die mit einer erhöhten Bildung des schleimhautschützenden Prostaglandin E2 und einer verminderten Produktion an Magensäure einhergeht (Khayyal et al. 2006).

### 1.4.2 Einzelexzakte aus STW 5 und ihre Wirkungen auf GIT

Tab: 1: Wirkungen der Einzelextrakte von STW 5 auf den GIT

Extrakt aus	Wirkung auf GIT
Pfefferminzblätter	spasmolytisch,antioxidativ,karminativ, antiphlogistisch
Kamilleblüten	antiphlogistisch,antioxidativ,spasmolytisch, karminativ, ulcusprotektiv
Süßholzwurzel	spasmolytisch, ulcusprotektiv, antioxidativ, antiphlogistisch
Angelikawurzel	spasmolytisch, karminativ,antiphlogistisch, fördert die Magensaftsekretion
Kümmelfrüchten	karminativ, spasmolytisch,antiphlogistisch, antioxidativ
Mariendistelfrüchten	antioxidativ, antidyspeptisch, cytoprotektiv in Leber und Magen
Melisseblätter	spasmolytisch, antioxidativ, beruhigend
Schöllkraut	spasmolytisch, cholekinetisch, choleretisch, antiphlogistisch
Iberis amara	prokinetisch, tonisierend an glatter relaxierter, intestinaler Muskulatur

(Germann et al. 2006; Heinle et al. 2006; Hohenester et al. 2004; Khayyal et al. 2006; Reichling & Saller 2002; Saller et al. 2002; Allescher & Wagner 2007)

## 1.5 Fragestellung

Da offensichtlich oxidativer Stress und Mastzellen bei entzündlichen Erkrankungen des Magen-Darm-Traktes wie z.B. beim Reizdarmsyndrom eine wichtige Rolle spielen und die Therapie mit pflanzlichen Extrakten wie STW 5 eine hohe Patientencompliance aufweist, sollten in der vorliegenden Dissertation folgende Aufgaben bearbeitet werden.

1. Charakterisierung der antioxidativen Eigenschaften von STW5 und seinen Einzelextrakten in einem zellfreien Testsystem bestehend aus opsonisiertem Zymosan und  $H_2O_2$ .
2. Charakterisierung der radikalabfangenden Eigenschaften von STW5 und seinen Einzelextrakten in einem Darmmodell, bei dem durch Stimulation mit Histamin oxidativer Stress induziert wird.
3. Charakterisierung der radikalabfangenden Eigenschaften von STW5 und seinen Einzelextrakten an isolierten Mastzellen, die durch opsonisiertes Zymosan zur Radikalproduktion stimuliert wurden.

## 2 Materialien

### 2.1 Geräte

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

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

Mikroskop Motic AE 20, UK- Tübingen

Multibiolumat LB 9505 C (6- Kanal), Berthold, Wildbad

Rotilabo- Block- Heater H250, Roth, Karlsruhe

Vortex- Genie , Bender- Hobein, Zürich, Schweiz

Waage AC 100, Mettler, Gießen

Waage BP 121 S, Sartorius, Göttingen

Waage Typ K7, Mettler

Zentrifuge Hettich EBA 3S, Hettich, Tuttlingen

### 2.2 Chemikalien

AAPH (2,2'-Azobis(2-amidinopropan)dihydrochlorid,  $C_8H_{18}N_6 \times 2 HCL$ ), Polyscience, Warrington, USA

Calciumchlorid-Dihydrat ( $CaCl_2 \times 2H_2O$ ), Roth, Karlsruhe

Dimethylsulfoxid (DMSO,  $C_2H_6OS$ ), Sigma, Steinheim

Ethanol absolut zur Analyse ( $C_2H_5OH$ ), Merck, Darmstadt

Etylendiamintetraessigsäure, Sigma, Steinheim

Glucose-Monohydrat ( $C_6H_{12}O_6 \times H_2O$ ), Roth, Karlsruhe

HEPES (2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure,  $C_8H_{18}N_2O_4S$ )  
Roth, Karlsruhe

Histamin- dihydrochloride, Sigma, Steinheim

Kaliumchlorid (KCl), Roth, Karlsruhe

Luminol, Merck, Darmstadt

Magnesiumsulfat- Heptahydrat ( $\text{MgSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$ ), Merck, Darmstadt

Natriumchlorid ( $\text{NaCl}$ ), Roth, Karlsruhe

Natriumdihydrogenphosphat-Monohydrat ( $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \times \text{H}_2\text{O}$ ), Merck, Darmstadt

Natriumhydroxid, (10M  $\text{NaOH}$ ), Merck, Darmstadt

Nordihydroguarsäure (NDGA, 1,4-Bis(3,4-dihydroxyphenyl)2,3-dimethylbutan,  $\text{C}_{18}\text{H}_{22}\text{O}_4$ ), Sigma, Deisenhofen

Trolox (6- Hydroxy-2,5,7,8-tetramethylchroman-2-carbonsäure,  $\text{C}_{14}\text{H}_{18}\text{O}_4$ ), Sigma, Deisenhofen

Wasserstoffperoxid 30 %, Universitätsapotheke, Tübingen

Zymosan A, Sigma, Deisenhofen

## 2.3 Lösungen

**Puffer:**

Normal-Tyrode pH 7,4 für 1 Liter		
NaCl	6,896 g	118 mM
KCl	0,373 g	5,0 mM
$\text{MgSO}_4 \times 7 \text{ H}_2\text{O}$	0,293 g	1,19 mM
$\text{NaH}_2\text{PO}_4 \times \text{H}_2\text{O}$	0,213 g	1,54 mM
$\text{CaCl}_2 \times 2 \text{ H}_2\text{O}$	0,368 g	2,5 mM
HEPES	2,383 g	10,0 mM
Glucose	1,0 g	5,0 mM
Die Lösung wurde mit $\text{NaOH}$ auf pH 7,4 eingestellt		

### Opsonisiertes Zymosan

Zur Opsonisierung wurden 200mg Zymosan A in 20 ml NaCl- Lösung (0,9%) suspendiert und über Nacht gerührt. Die Suspension wurde 10 min lang zentrifugiert, der Überstand entfernt. Zum Niederschlag wurden 5 ml frisches humanes Citratplasma gegeben, das Gemisch wurde 30 min bei 37°C inkubiert. Anschließend wurde die Suspension zentrifugiert, der Überstand verworfen. Der Niederschlag wurde mit NaCl- Lösung (0,9%) dreimal gewaschen, danach in 4 ml NaCl- Lösung (0,9%) resuspendiert und anschließend homogenisiert. Die Suspension wurde in Aliquots zu 200 µl bei -20°C aufbewahrt und am Messtag bei Raumtemperatur aufgetaut.

### Luminol- Lösung

20mg Luminol wurden in 10 ml DMSO im Dunkeln gelöst und in Aliquots zu 200 µl bei -20°C aufbewahrt.

### Histamin- Stammlösung

Es wurde eine 50 mM Histamin- Lösung (2,3mg/ 5ml) mit demineralisiertem Wasser hergestellt. Die weiteren Verdünnungen erfolgten ebenfalls mit demineralisiertem Wasser.



## 2.4 STW 5

### 2.4.1 Extrakte aus STW 5

Wie bereits beschrieben ist Iberogast<sup>®</sup> (STW5) ein Kombinationspräparat aus neun Einzelextrakten. Es handelt sich bei den Extrakten um Auszüge aus getrockneten Pflanzenteilen (Pfefferminzblättern, Kamillenblüten, Süßholzwurzel, Angelikawurzel, Kümmelfrüchten, Mariendistelfrüchten, Melissenblättern, Schöllkraut) und der frischen Pflanze Iberis Amara. **Tab. 2 und Tab.3** charakterisieren die Einzelextrakte und zeigen deren Anteil in STW 5.

Um eventuell vorhandenen Bodensatz zu suspendieren, wurden alle Extrakte vor der Verwendung gut geschüttelt. Die Verdünnungen erfolgten mit demineralisiertem Wasser. Genauere Angaben zu den eingesetzten Konzentrationen und den verwendeten Testsystemen finden sich bei den jeweiligen Ergebnissen.

**Tab.2: Einzelextraktcharakterisierung von STW 5**

Extrakt	DEV	Extraktionsmittel	Abkürzung
Angelikawurzelextrakt	1:3	Ethanol 30 %	ANG
Iberis amara Extrakt	1:2	Ethanol 50 %	IBE
Kamillenblütenextrakt	1:3	Ethanol 30 %	KAM
Kümmelfrüchteextrakt	1:3	Ethanol 30 %	KÜM
Mariendistelfrüchteextrakt	1:3	Ethanol 30 %	MAR
Melissenblätterextrakt	1:3	Ethanol 30 %	MEL
Pfefferminzblätterextrakt	1:3	Ethanol 30 %	PFE
Schöllkrautextrakt	1:3	Ethanol 30 %	SCHÖ
Süßholzwurzelextrakt	1:3	Ethanol 30 %	SÜSS

(DEV= Droge-Extrakt-Verhältnis)

Tab. 3: Zusammensetzung von STW 5 (ml/ 100ml)

Extrakt	Iberogast <sup>®</sup> (STW 5)
Angelikawurzelextrakt	10
Iberis amara Extrakt	15
Kamillenblütenextrakt	20
Kümmelfrüchteextrakt	10
Mariendistelfrüchteextrakt	10
Melissenblätterextrakt	10
Pfefferminzblätterextrakt	5
Schöllkrautextrakt	10
Süßholzwurzelextrakt	10

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

## 2.5 Biologisches Material

### 2.5.1 Isolierte Mastzellen

Unreife Mastzellen wurden aus Knochenmark von Mäusen isoliert und in Kulturmedien zu reifen MZ heran gezüchtet. Sie wurden freundlicherweise von Frau Dr. E. Shumilina, Institut für Physiologie der Universität Tübingen, zur Verfügung gestellt.

Die Zellzahl wurde am Tag des Versuches unter dem Lichtmikroskop mit Hilfe einer Neubauer-Zählkammer bestimmt. Die Färbung der Zellen erfolgte mit Trypanblau im Verhältnis Zellsuspension: Trypanblau = 1:1. Tote Zellen stellten sich in dieser Färbung dunkelblau dar, da das Trypanblau durch die defekte Zellmembranen ungehindert eindringen konnte. Hierzu wurde ein Deckglas leicht befeuchtet und auf die Neubauer-Zählkammer aufgesetzt. Die Zellsuspension wurde nach der Zugabe des Trypanblau und vor der Probenentnahme zur Zellzahlbestimmung gut durchmischt. Nun wurde jeweils ein Tropfen an beide Enden des Deckglases der Neubauer-Zählkammer pipettiert und durch dort herrschende Kapillarkräfte in die Zählkammer gesogen.

Die Auswertung erfolgte durch Auszählen der vier großen Eckquadrate. Die ermittelte Zellzahl wird mit  $10^4$  multipliziert sowie mit dem Verdünnungsfaktor der Zellsuspension. Dies ergibt die Zellzahl pro  $\mu\text{l}$ . Die jeweilige Zellzahl der verwendeten Präparate betrug ca. 1000 pro  $\mu\text{l}$ .

### **2.5.2 Präparate aus Mäuseileum**

Wildtyp-Mäuse der Zuchtlinie C57Bl6 wurden von der Firma Charles River, Sulzfeld bezogen und entsprechend gesetzlicher Richtlinien 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 waren ad libitum vorhanden. Am Tag der Messung wurden die Tiere durch  $\text{CO}_2$ -Asphyxie und zervikale Dislokation getötet.

Das Peritoneum wurde geöffnet und ein ca. 3 cm langes Präparat des distalen Ileums entnommen. Dies wurde mit Tyrode-Lösung durchgespült und anschließend von Fettgewebe, Mesenterium und Darmmukosa befreit. Für die Bestimmung der Radikalbildung wurden 2 mm lange Ringpräparate vorbereitet.

### 3 Methoden

#### 3.1 Radikalbildung durch Zymosan und H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>

In Tab.4 ist beispielhaft ein Reaktionsansatz zur Bestimmung der antioxidativen Eigenschaften der Extrakte dargestellt, der in Plastikküvetten pipettiert und im 6-Kanal Biolumat durch luminolverstärkte Chemilumineszenz sichtbar gemacht und 30 Minuten bei 37°C gemessen wurde.

**Tab.4: Zymosan- H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>- Reaktion:** Reaktionsansatz

Material	Konzentration Stammlösung	Pipettier- volumen ( $\mu$ l)	Endkonzentration
Tyrode (37°C)		475	
Luminol- Lösung	11,3 mM	5	113 $\mu$ M
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> – Lösung	50mM	10	1 mM
Zymosan		10	
Extrakt		5	siehe Ergebnisse

Bei allen Messdurchläufen wurden zwei Kanäle als Kontrolle ohne und drei Kanäle mit Phytopharmaka benutzt. Der Reaktionsablauf sah folgendermaßen aus:

Zunächst wurde für 10 Minuten die Reaktion mit H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> und Luminol als Vorinkubation verfolgt, wobei allerdings die Chemilumineszenz praktisch nicht über die Leerwertreaktion gesteigert wurde.

Dann wurde Zymosan zugesetzt und die CL für weitere 20 Minuten gemessen. Der von Biolumat gelieferte Messwert stellte dann als Integral praktisch nur die Counts pro 20 min nach Stimulation mit Zymosan dar (**Abb.1, Abb.2**).

Zur Untersuchung der Extrakteffekte wurden diese initial zugesetzt und entsprechend verfahren. Die CL- Messwerte für jeden Extrakt wurde in Prozent der jeweiligen Kontrollansätze ohne Extrakt ausgedrückt.

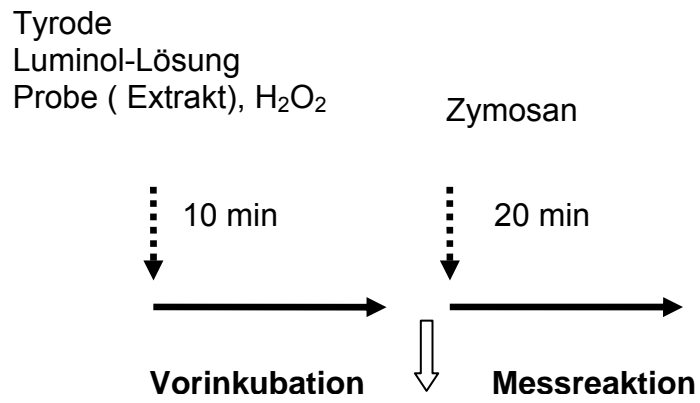


Abb. 1: Zymosan/ H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> - Reaktion: Reaktionsablauf

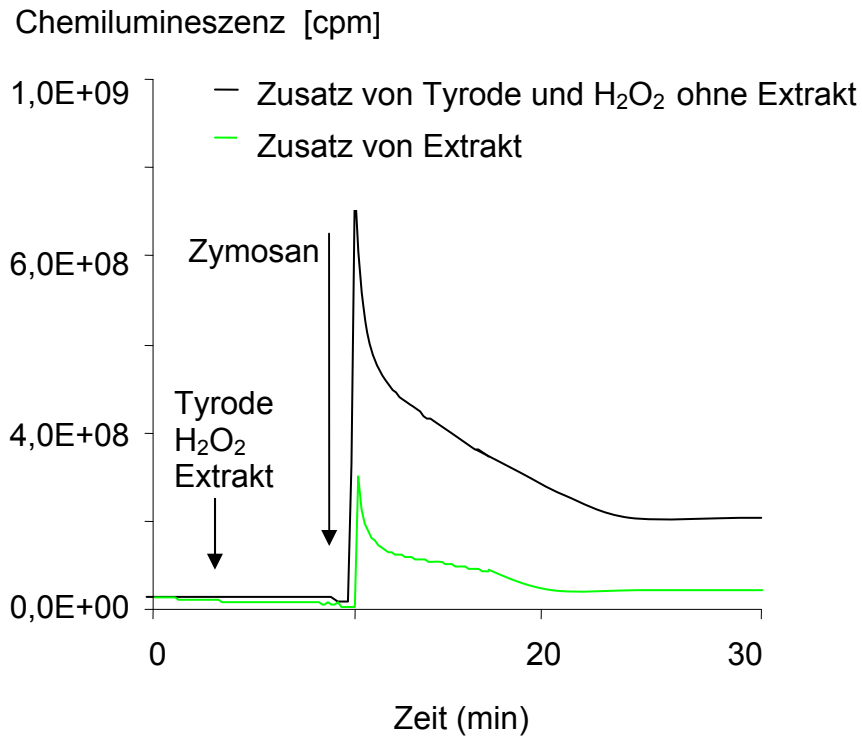


Abb.2: Zymosan-H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>- Modell: Originalaufzeichnung der CL- Reaktion

### 3.2 Radikalbildung durch Darmpräparate

In Tab.5 ist beispielhaft ein Reaktionsansatz dargestellt.

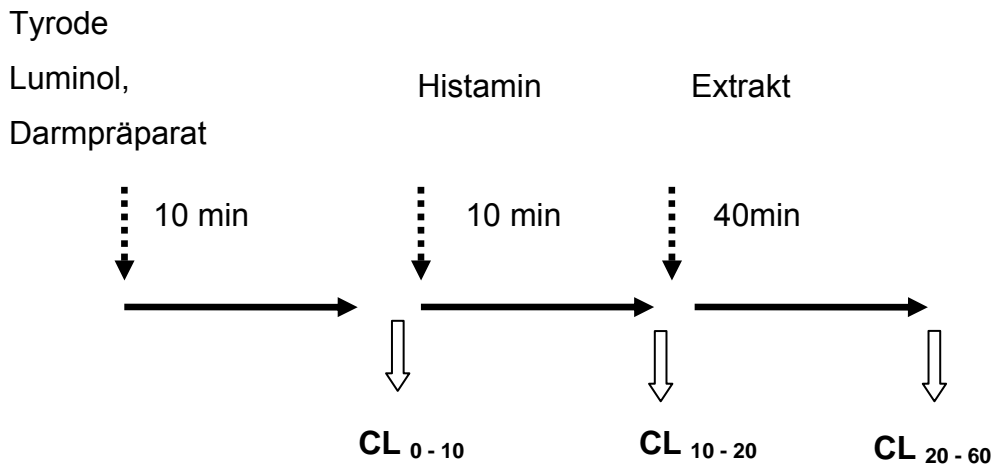
**Tab.5: Darmmodell:** Reaktionsansatz

Material	Konzentration Stammlösung	Pipettier-volumen ( $\mu\text{l}$ )	Endkonzentration
Tyrode (37°C)		480	
Luminol- Lösung	11,3 mM	5	113 $\mu\text{M}$
Darmpräparat			
Histamin	2,5 mM	10	50 $\mu\text{M}$
Extrakt		5	siehe Ergebnisse

Im 6- Kanal Biolumat wurde die Radikalbildung mit Hilfe der luminolverstärkte Chemilumineszenz sichtbar gemacht und bei einer Messtemperatur von 37° 60 Minuten integriert. Bei allen Versuchen wurde ein Kanal als Kontrolle ohne und vier Kanäle mit Phytopharmaka benutzt. Für jeden einzelnen Extrakt wurde die Messung 4-mal mit verschiedenen Präparaten durchgeführt. In den ersten 10 min wurde die basale Radikalproduktion der Darmpräparate untersucht (CL<sub>0-10</sub>). Nach 10 min Messzeit wurde Histamin zur Stimulation zugegeben und deren Einfluss auf die Radikalproduktion weitere 10 Minuten verfolgt (CL<sub>10-20</sub>). Anschließend wurden die Extrakte zugesetzt und erneut die Chemilumineszenz für weitere 40 min registriert (**Abb. 3, Abb. 4**). Zur Auswertung wurde allerdings nur die CL zwischen Minute 20 und 30 (CL<sub>20-30</sub>) integriert.

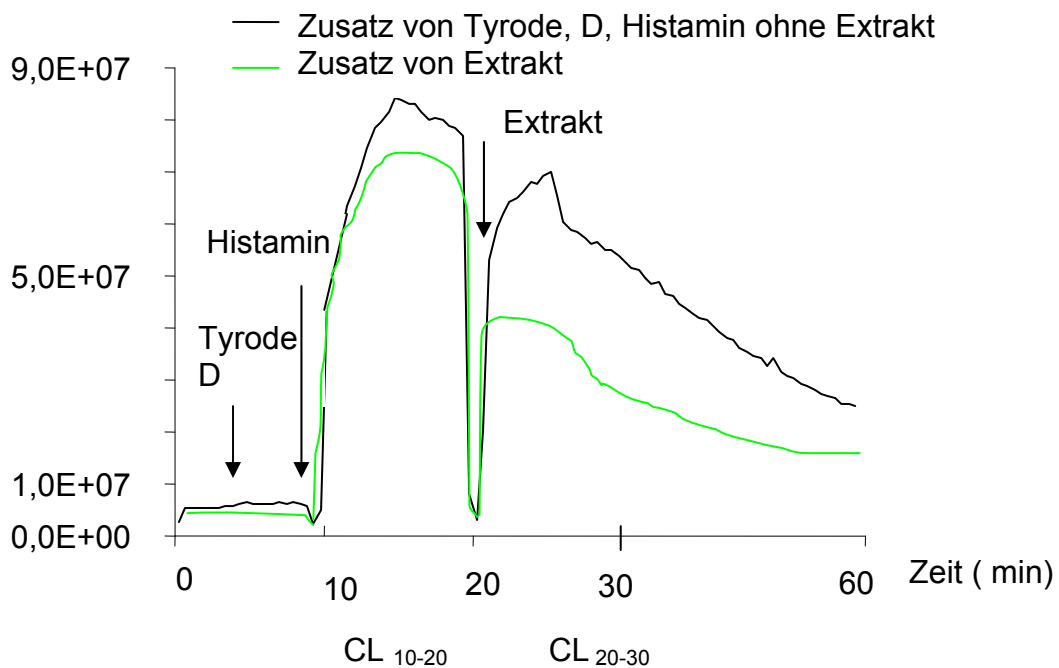
Diese Integration der CL- Werte erfolgte jeweils aus den einzelnen, vom Biolumat in WinSTAT Exel gelieferten Messpunkten.

Zur Auswertung dienten folgende Quotienten: Die Stimulation der Radikalproduktion durch Histamin wurde durch  $\text{CL}_{10-20} / \text{CL}_{0-10}$  berechnet; die antioxidative Wirkung der Extrakte durch  $\text{CL}_{20-30} / \text{CL}_{10-20}$ . Diese Hemmung durch die Extrakte wurde jeweils auf den Kontrollwert (Reaktionsablauf ohne Extrakte) bezogen (s. **Abb.4**).



**Abb. 3: Darmmodell:** Reaktionsablauf der CL- Messung bei Histamin- Stimulation

Chemilumineszenz (cpm)



**Abb. 4: Darmmodell:** Originalaufzeichnung der Chemilumineszenzreaktion

### 3.3 Radikalbildung durch isolierte Mastzellen

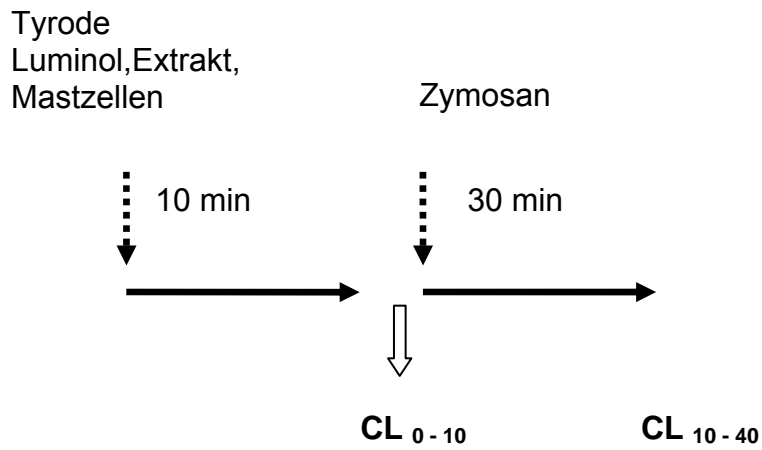
In Tab.6 ist beispielhaft ein Reaktionsansatz dargestellt.

**Tab.6: Mastzellenmodell:** Reaktionsansatz

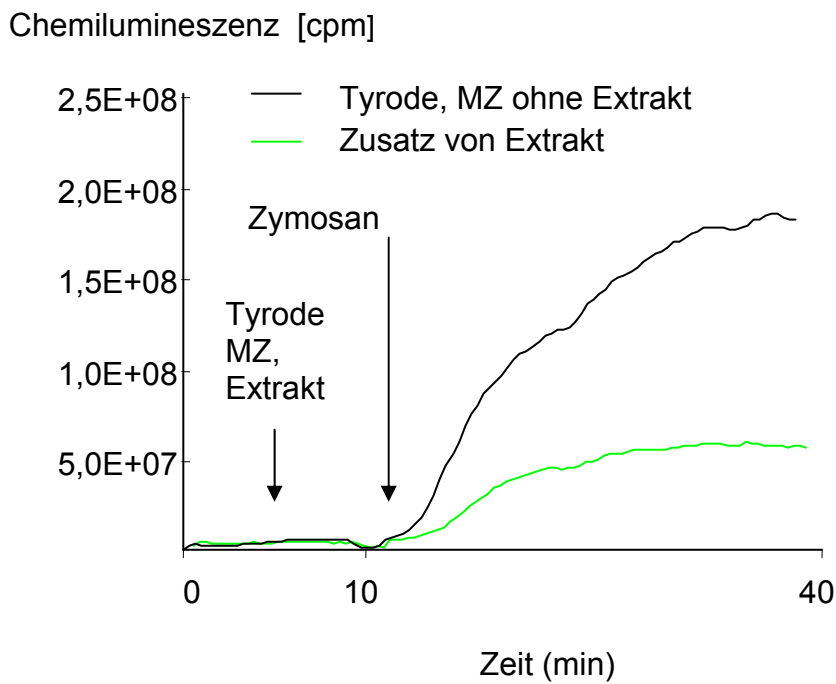
Material	Konzentration Stammlösung	Pipettier-volumen ( $\mu\text{l}$ )	Endkonzentration
Tyrode (37°C) Luminol- Lösung Zellsuspension Zymosan Extrakt	11,3 mM	siehe Ergebnisse 5 30 10 siehe Ergebnisse	113 $\mu\text{M}$    siehe Ergebnisse

Der Reaktionsansatz wurde ebenfalls in Plastikküvetten pipettiert. Durch luminolverstärkte Chemilumineszenz wurde die Radikalbildung sichtbar gemacht und im 6-Kanal Biolumat bei einer Messtemperatur von 37° 40 Minuten integriert. Bei allen Versuchen wurde ein Kanal als Kontrolle ohne und vier Kanäle mit Phytopharmaka benutzt. Die basale Radikalproduktion von Mastzellen und die antioxidative Wirkung der Extrakte wurden in den ersten 10 Minuten untersucht (CL<sub>0-10</sub>). Zur Stimulation wurde anschließend Zymosan zugesetzt und dessen Einfluss auf die Radikalproduktion weitere 30 Minuten verfolgt (CL<sub>10-40</sub>) (**Abb.5, Abb.6**). Die Stimulation wurde auch in Gegenwart der Extrakte durchgeführt.





**Abb. 5: Mastzellenmodell:** Reaktionsablauf der Stimulation mit Zymosan



**Abb. 6: Mastzellenmodell:** Originalaufzeichnung der Chemilumineszenzreaktion

Dabei wurde für jeden einzelnen Extrakt die Messung dreimal mit verschiedenen Zellpräparationen durchgeführt.

Da bei den meisten Zellpräparationen nur relativ kleine CL- Werte gefunden wurden, wurde bei diesen Auswertungen die Radikalproduktion durch Messung der Plateauintensität der CL quantifiziert. Plateau 1 entspricht CL<sub>0-10</sub>, Plateau 2 entspricht CL<sub>10-40</sub>. Der Quotient  $P_2 / P_1$  gibt dabei die Aktivierung durch Zymosan an.

Um die Hemmwirkung der Extrakte zu quantifizieren, wurden die Differenzen zwischen Kontroll (K)- und Extraktplateau (E) im Bezug auf den Kontrollwert berechnet und diese Werte als Hemmung (in %) dargestellt:

$$\frac{(K - E)}{K} * 100\% = \text{Hemmung in \% der Kontrolle}$$

Das heißt, es ergibt sich bei  $E=K$  0% Hemmung, bei  $E=0$  100% Hemmung.

### **3.4 Statistik**

Für die statistische Auswertung wurde das folgende Programm verwendet:

- WinSTAT für Excel

Mittelwertsvergleiche erfolgten mittels ungepaarten T-Tests für unabhängige Stichproben. Das Signifikanzniveau wurde auf  $p < 0,05$  festgelegt, genauere Angaben finden sich im Ergebnisteil.

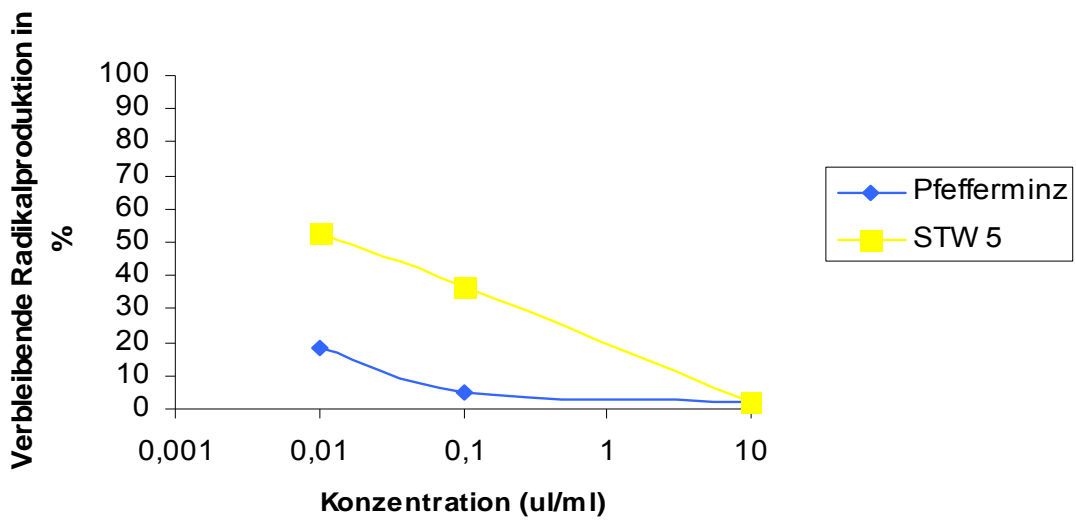
## 4 Ergebnisse

### 4.1 Einfluss von STW 5 und seinen Komponenten auf die Zymosan- $H_2O_2$ - Reaktion

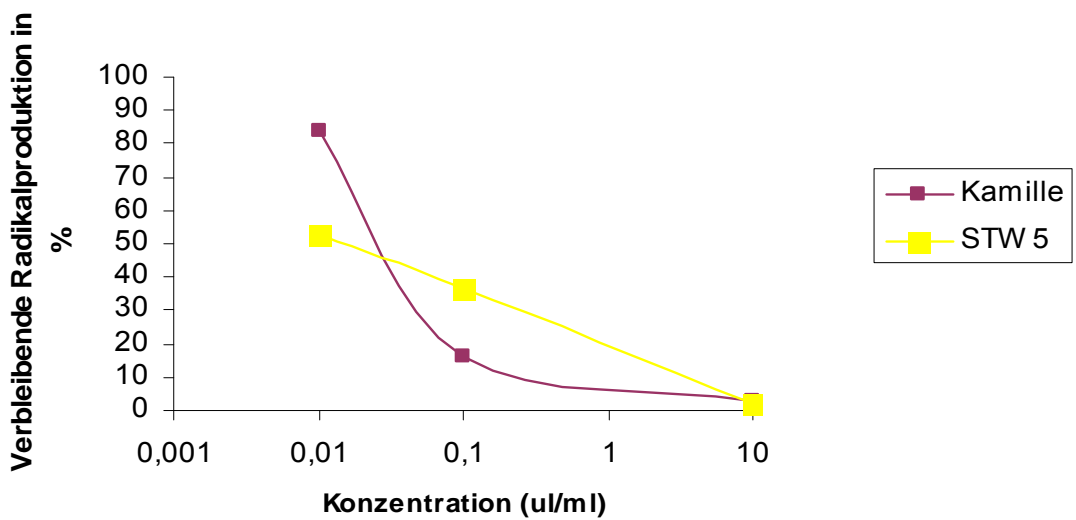
Zur Quantifizierung der radikalfangenden Effekte von STW 5 und seiner Einzelextrakte wurden die verbleibende Radikalbildung der Reaktion zwischen Zymosan und  $H_2O_2$  in Abhängigkeit von der Extraktkonzentration (in  $\mu\text{l/ml}$ ) dargestellt. **Abb. 7 a-j** zeigen immer im Vergleich zu STW 5, dass die einzelnen Extrakte in unterschiedlichen Ausmaß und konzentrationsabhängig antioxidativ wirken. Ausgehend von der niedrigsten eingesetzten Konzentration ( $0,01\mu\text{l/ml}$ ) ergaben sich bei Pfefferminz die stärkste antioxidative Wirkung, bei Schöllkraut, Süssholz und Kamille die geringste. Bei  $0,1\mu\text{l/ml}$  war wiederum Pfefferminz am Stärksten wirksam, aber auch Kamille, Melisse und Schöllkraut waren deutlich wirksamer als die Vergleichsverdünnung von STW 5. Bei  $10\mu\text{l/ml}$  war bei allen Extrakten die Radikalbildung vollständig unterdrückt (**Abb.8**).

**Abb.7 a-j: Zymosan-H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>- Reaktion:** antioxidative Wirkung der Einzalextrakte im Vergleich zu STW 5 in Abhängigkeit von der Konzentration. Die Messwerte (n=3) zeigen die verbleibende Radikalbildung in % der ungehemmten Reaktion zwischen Zymosan und H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>.

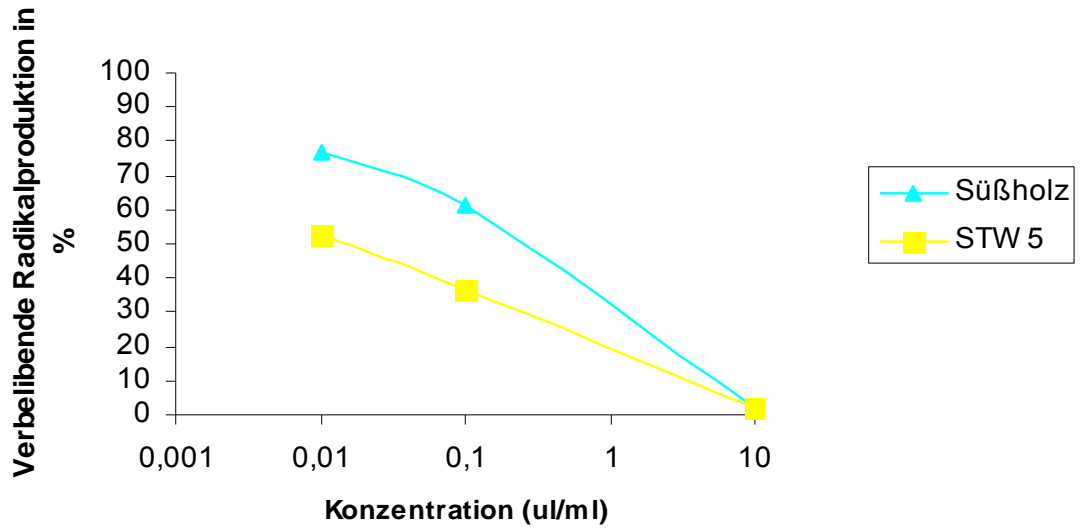
a)



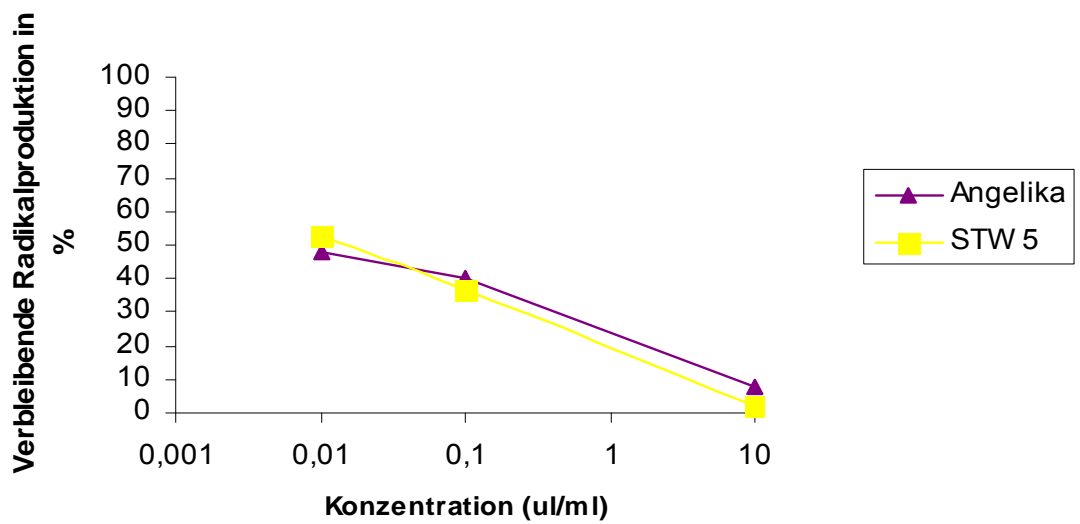
b)



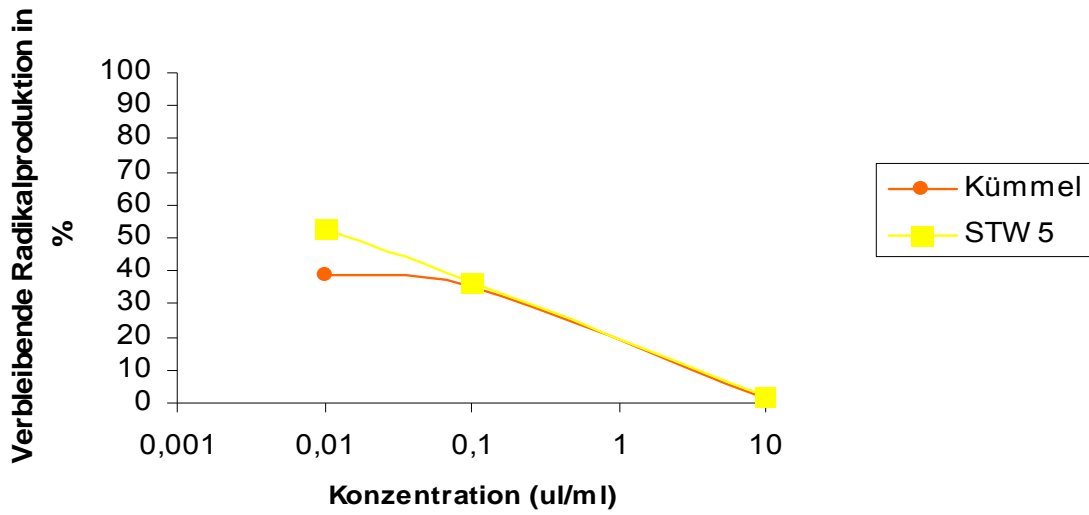
c)



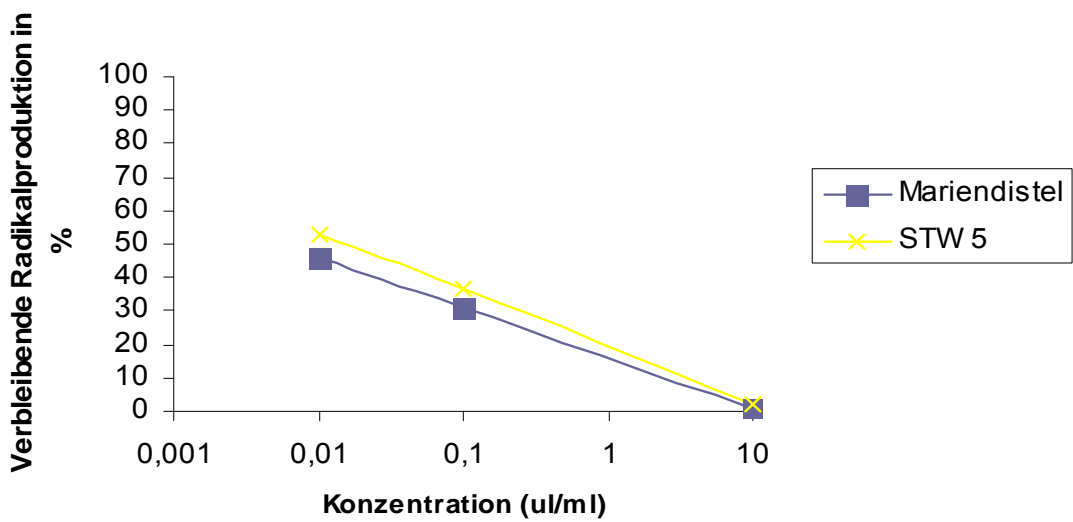
d)



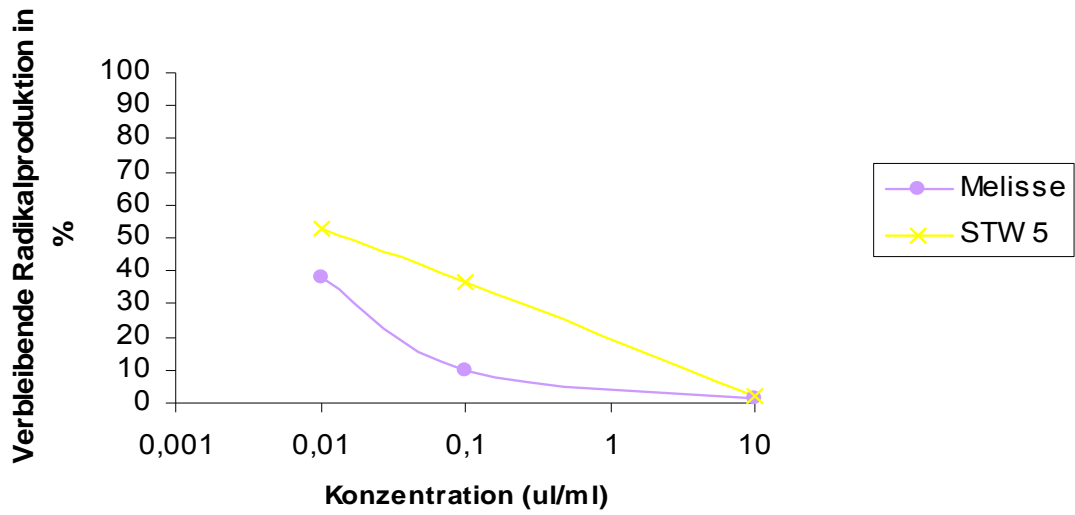
e)



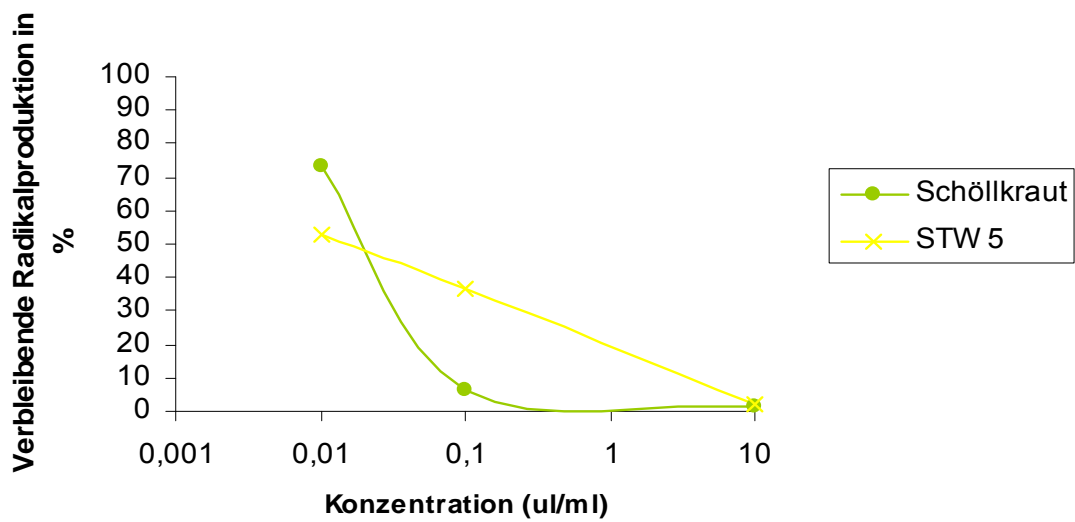
f)



g)

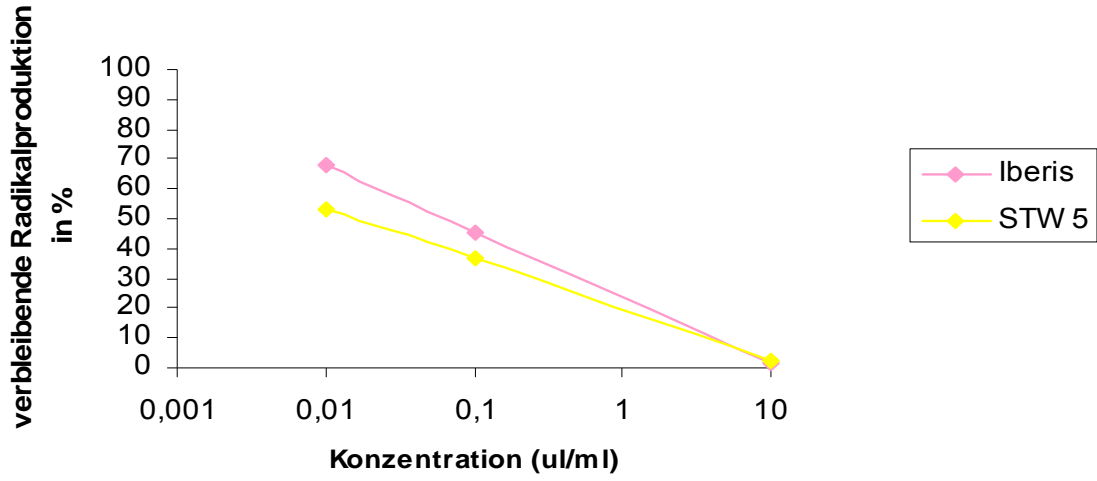


h)

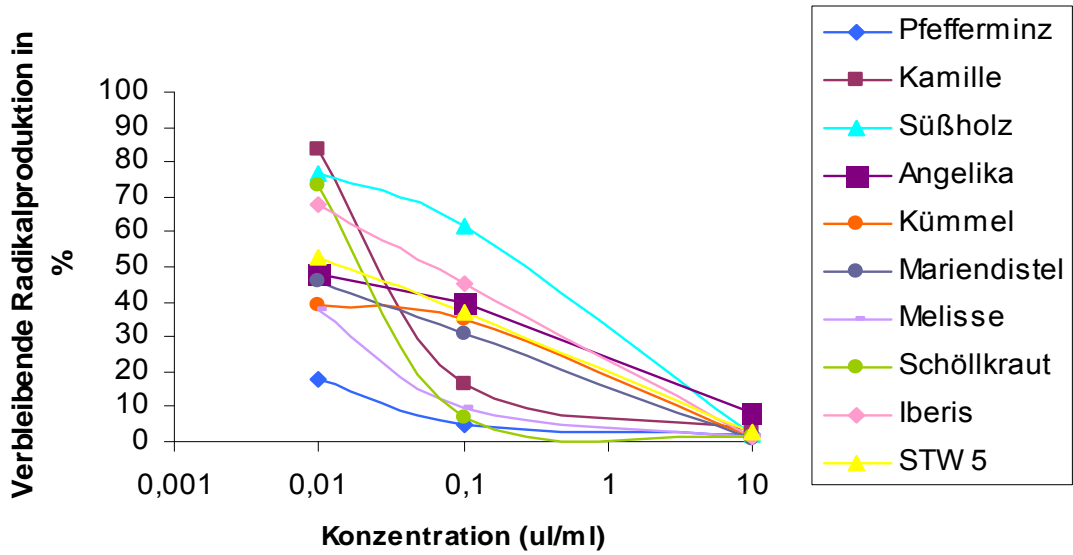


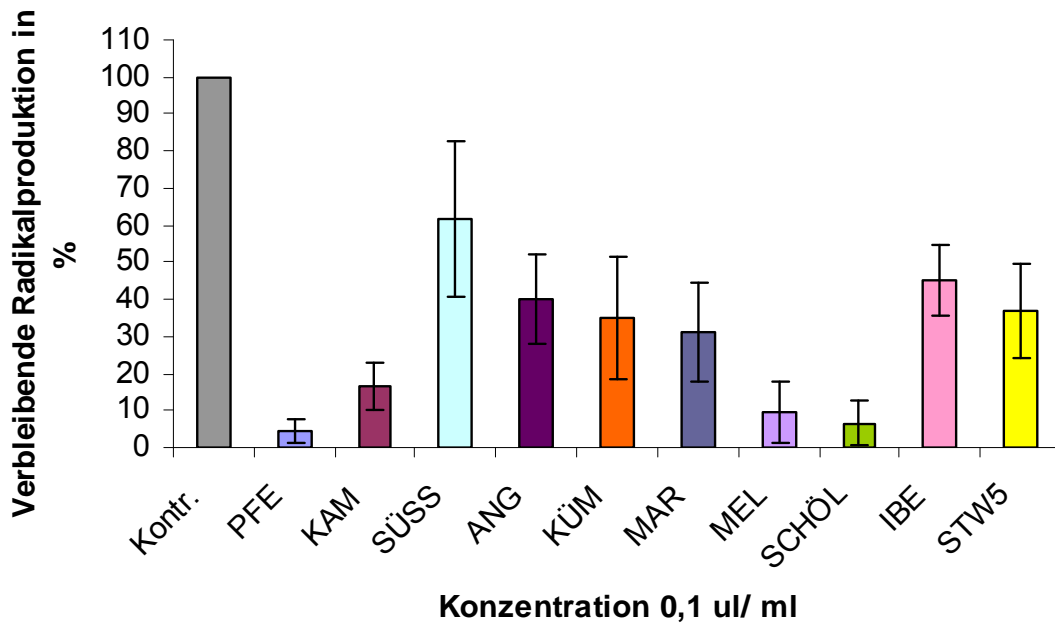


i)



j)

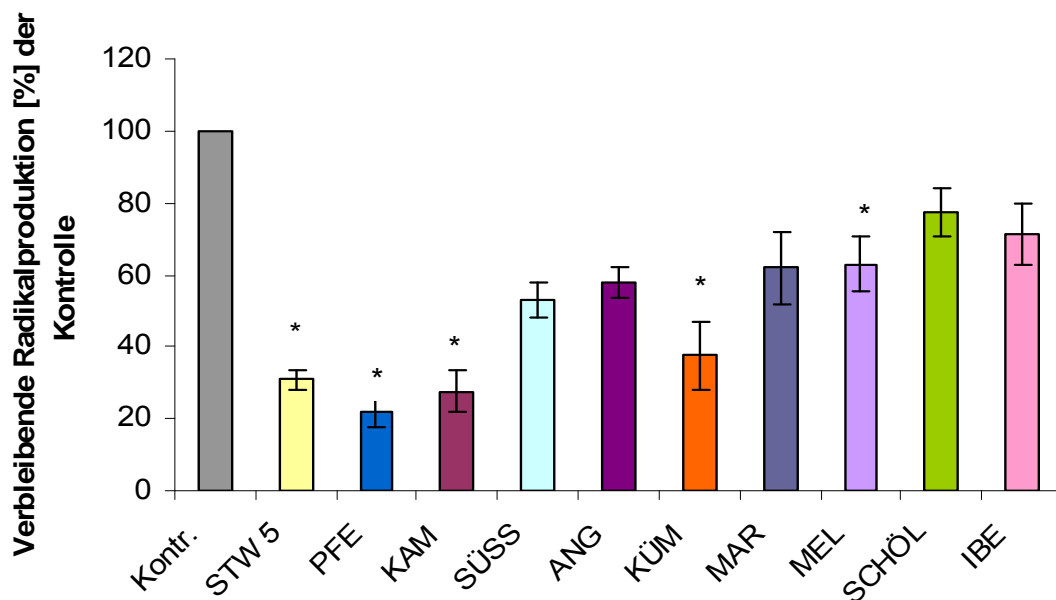




**Abb.8: Zymosan/ H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>- Reaktion:** Vergleich der Effekte von STW5 und seiner Einzelextrakte auf die Radikalbildung durch Zymosan und H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Endkonzentration der Extrakte jeweils 0,1 µl/ml, [MW, SD, n= 3]

## 4.2 Einfluss von STW 5 und seinen Komponenten auf Histamin induzierte Radikalbildung von Darmpräparaten

Wir konnten zeigen, dass mit Histamin (50  $\mu\text{M}$ ) inkubierte Präparate des terminalen Ileums verstärkt Sauerstoffradikale produzieren, wobei die basale Radikalproduktion mit Histamin um 20 -30 % gesteigert wurde. Im Anschluss wurden die einzelnen Extrakte und STW 5 in verschiedenen Konzentrationen dazugegeben und die Hemmung der Radikalproduktion ausgewertet. Für die Untersuchungen wählten wir eine Konzentration von 0,1  $\mu\text{l/ml}$ . Resultat der Untersuchung ist, dass STW 5 und alle seinen Komponenten die Radikalproduktion der Ileumpräparate dosis-abhängig hemmen können. Der Extrakt aus Pfefferminzblätter erzielte mit einer verbleibenden Radikalproduktion von 22% den stärksten, der aus Schöllkraut mit 77,5% den geringsten Effekt. Das antioxidative Potential der Extrakte nahm in folgender Reihenfolge ab: Pfefferminz, Kamille, STW5, Kümmel, Süssholz, Angelika, Mariendistel, Melisse, Iberis amara, Schöllkraut (**Abb. 9**).



**Abb. 9: Darmmodell:** Vergleich der antioxidativen Wirkung von STW5 und seinen Komponenten auf die Radikalbildung durch Darmpräparate nach Stimulation mit His, Endkonzentration der Extrakte jeweils 0,1  $\mu\text{l/ml}$ , [MW, SD, n=4 bis 5]; \*  $p < 0,05$ , unabhängiger t-Test.

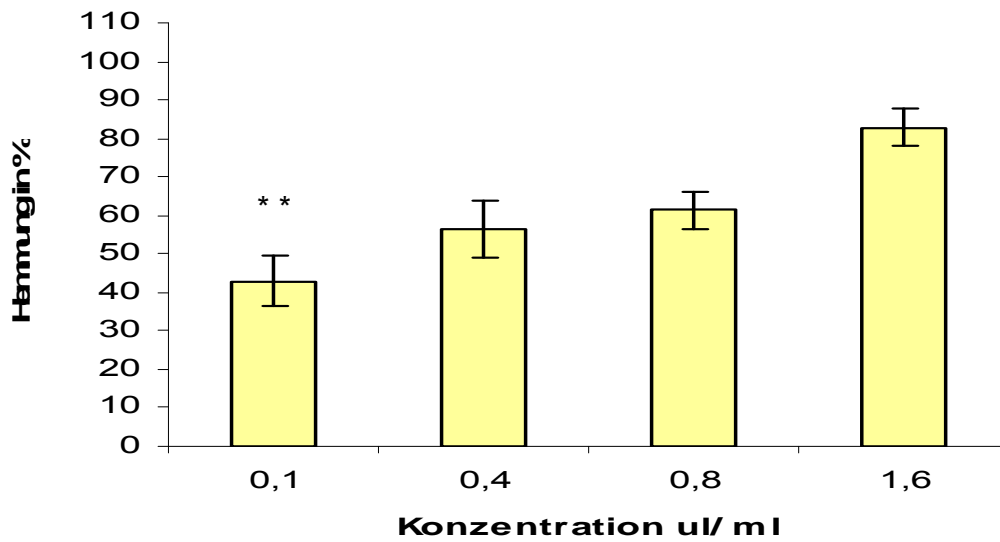
### 4.3 Einfluss von STW 5 und seinen Komponenten auf die Zymosan- stimulierte Radikalbildung von isolierten Mastzellen

Um zu prüfen, ob und in welchem Ausmaß STW 5 und seine Einzelextrakte auch bei Mastzellen Radikale abfangen oder die Radikalproduktion durch Stimulation mit Zymosan beeinflussen, wurden die Extrakte an isolierten Mastzellen vom Knochenmark der Mäuse getestet. Die Extrakte wurden jeweils in Konzentrationen von 0,1 µl/ml, 0,4 µl/ml, 0,8 µl/ml, 1,6 µl/ml eingesetzt, wobei jede Konzentration dreimal vermessen wurde und die Mittelwerte bestimmt wurden. Die Standardabweichung lag im Mittel bei circa 7% des Mittelwertes.

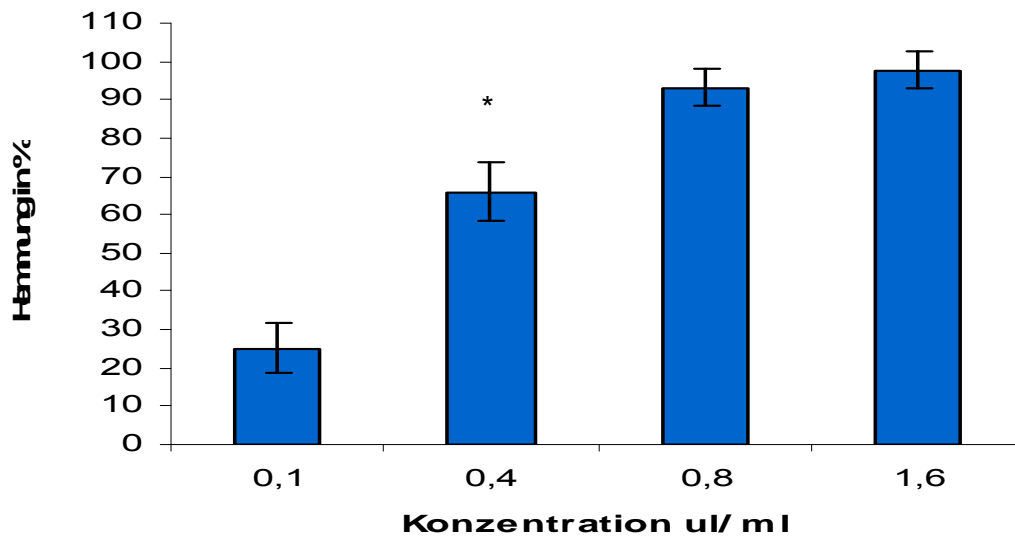
Auch in diesem zellulären Testsystem zeigten alle Extrakte konzentrationsabhängig antioxidative Wirkungen (**Abb. 10 a- j**). In **Abb. 11** werden die Effekte der Extrakte vergleichend bei der Konzentration von 0,4 µl/ml dargestellt. Der Extrakt aus Pfefferminzblättern war am wirksamsten und hemmte 66% der Radikalbildung, gefolgt vom Melissenblätterextrakt (62%) und STW 5 (56,3%) und Mariendistel Früchten (55,9%). Die Extrakte aus Süßholzwurzel (48,2%), Kamillenblüten (36,2 %), Angelikawurzel (35,1%), Kümmel Früchten (28,7%), Schöllkraut (28%) und Iberis amara (22,7%) waren weniger wirksam, zeigten jedoch auch noch deutlich antioxidative Effekte.

Abb. 10 a- j: Einfluss von STW 5 und seiner Einzelextrakte auf die Zymosan-stimulierte Radikalbildung von Mastzellen; [MW, SD, jeweils n=3]; \* p< 0,05, \*\* p< 0,01; unabhängiger t-Test. \*, \*\* zeigen, ab welcher Konzentration diese Signifikants erreicht wurde.

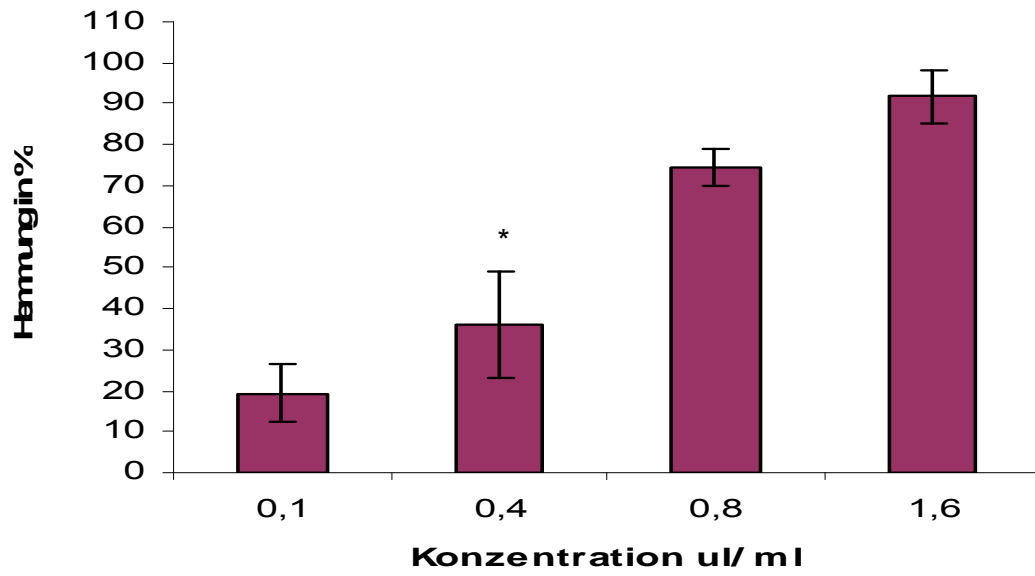
a) STW 5



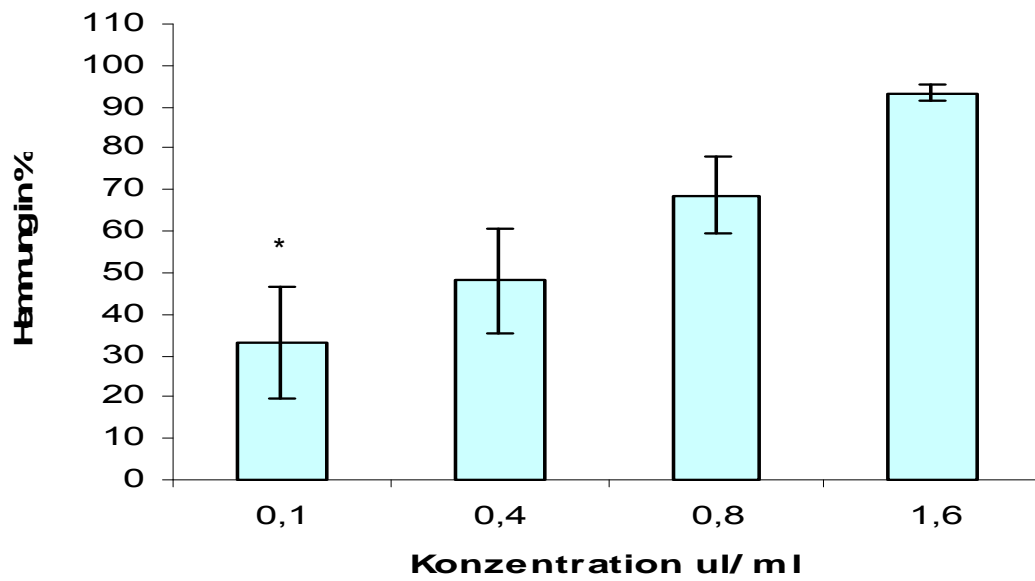
b) Pfefferminz



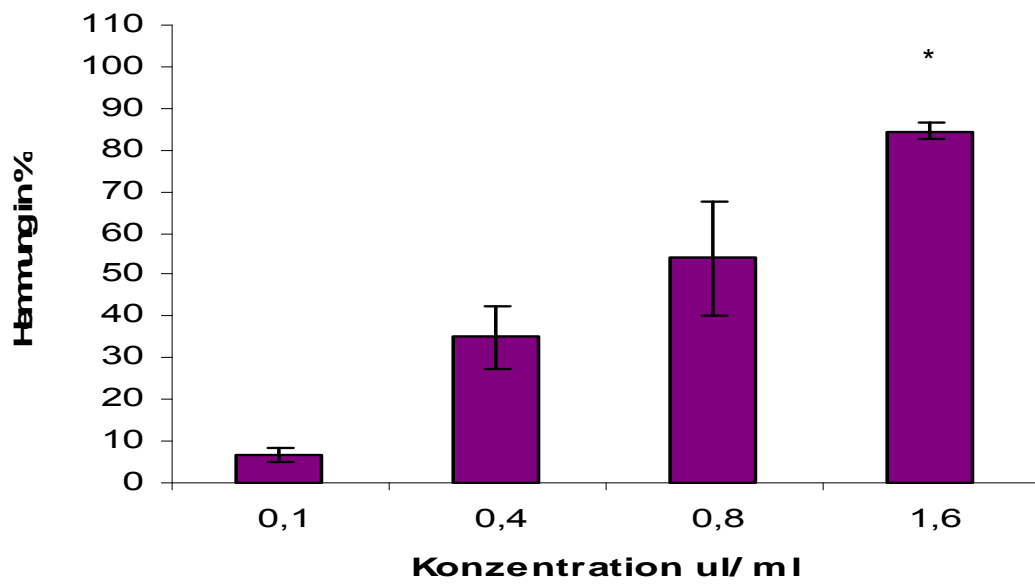
c) Kamille



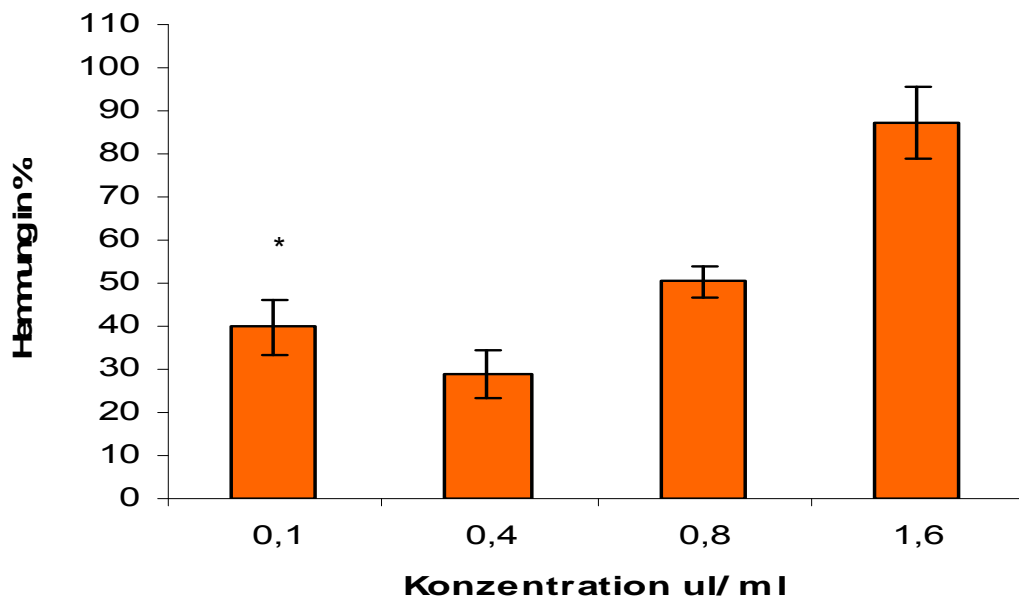
d) Süssholz



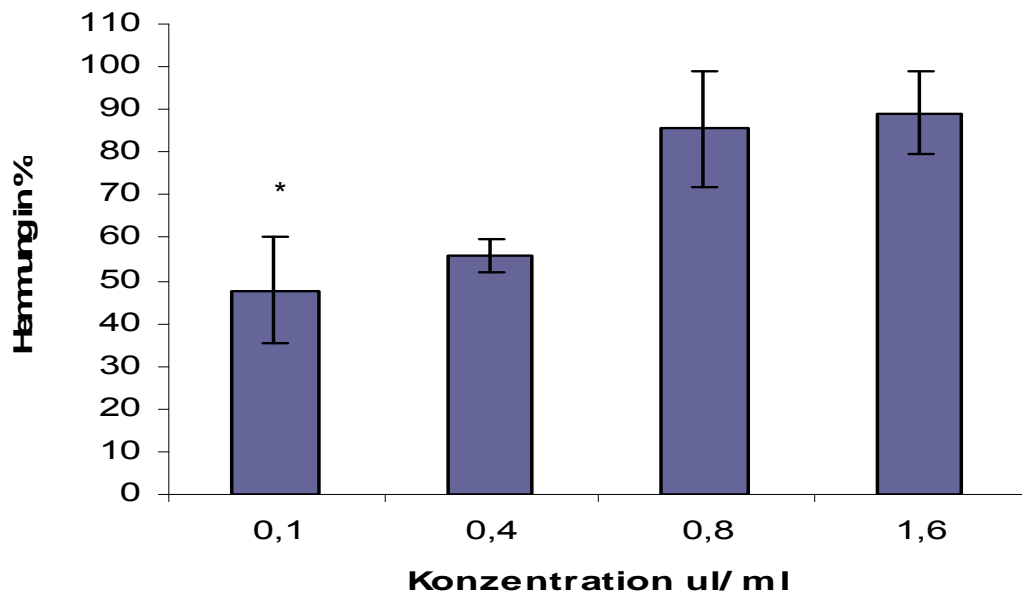
e) Angelika



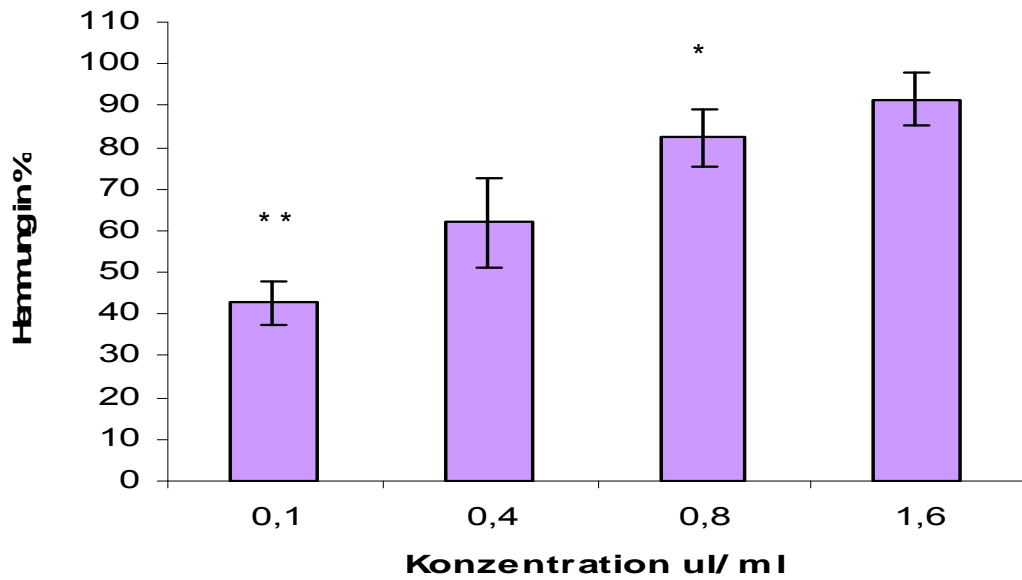
f) Kümmel



**g) Mariendistel**

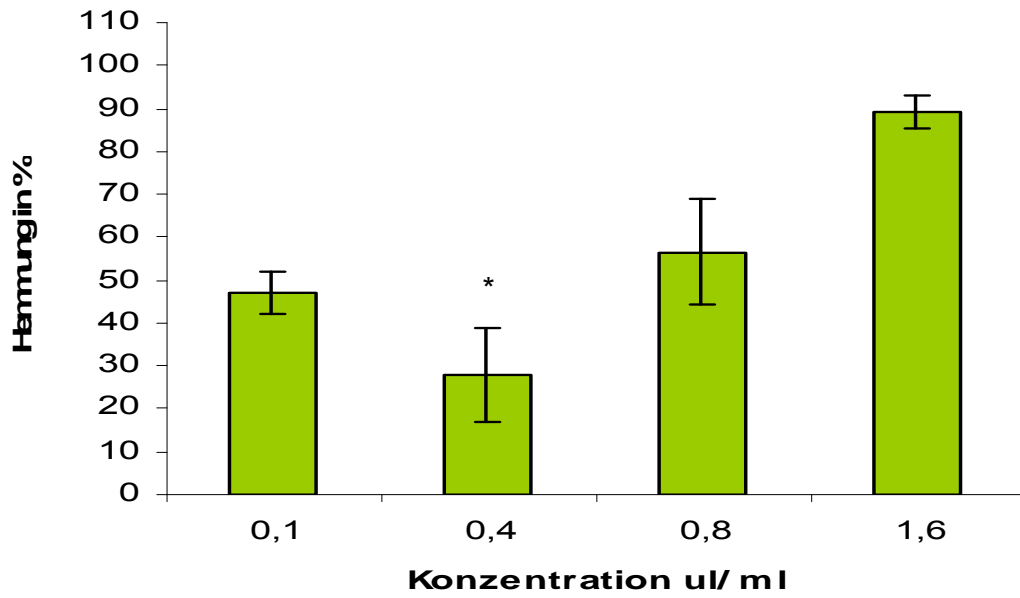


**h) Melisse**

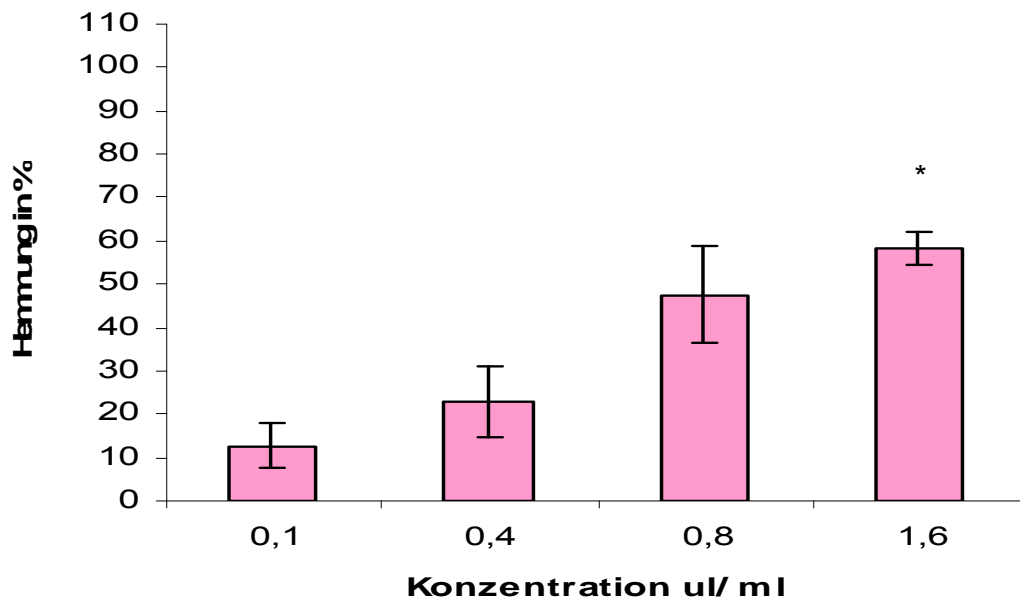


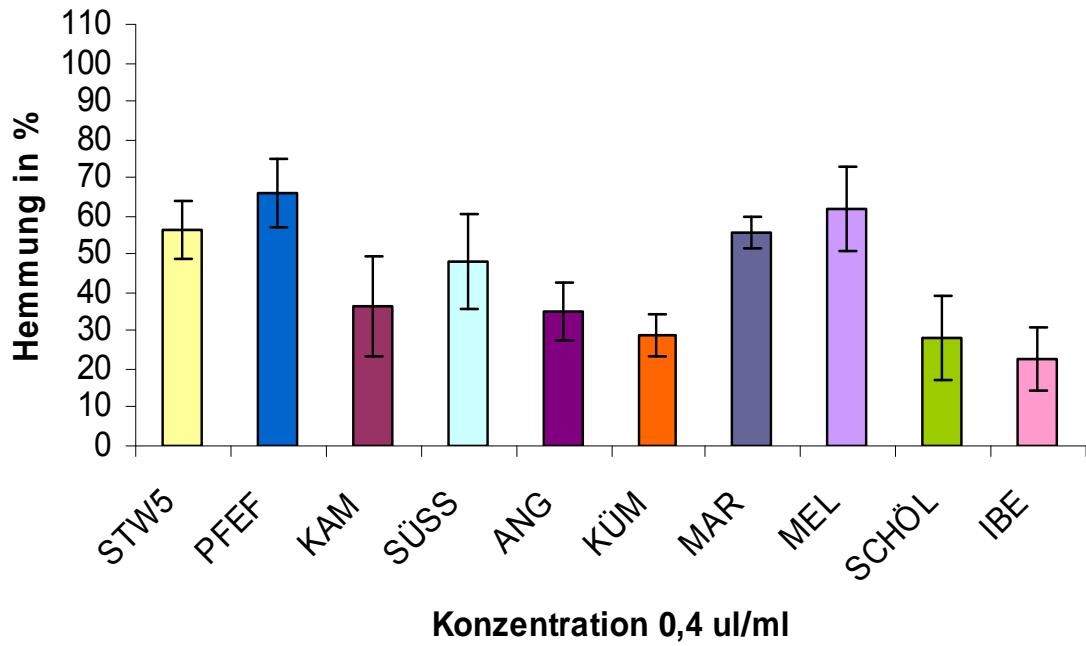


**i) Schöllkraut**



**j) Iberis**





**Abb.:11: Mastzellenmodell:** Vergleich der Hemmwirkung der Extrakte und STW 5 auf die Radikalproduktion von isolierten Mastzellen nach Stimulation mit Zym, Endkonzentration der Extrakte jeweils 0,4 µl/ml, [MW, SD, jeweils n=3]

## **4.4 Untersuchung zur pharmakologischen Synergien zwischen den Einzelextrakten in STW 5**

Ob Synergien zwischen den Einzelextrakten die Wirkung von STW 5 aktivierend oder hemmend beeinflussen können, sollte bei allen drei hier verwendeten Systemen überprüft werden.

### **4.4.1 Untersuchung mittels der Zymosan- H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>- Reaktion**

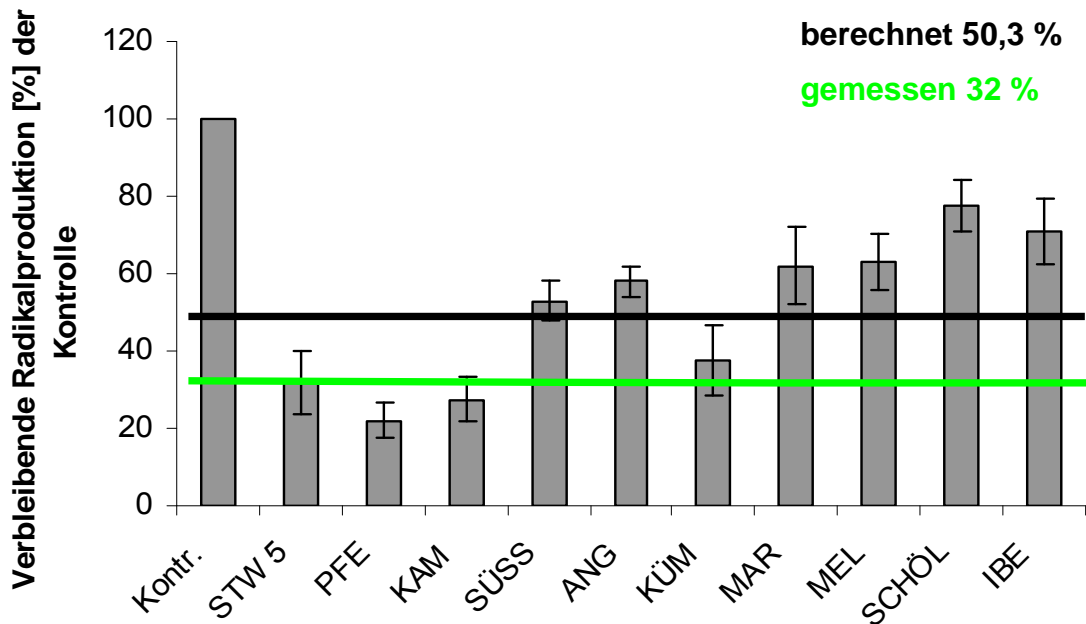
Im Zymosan/ H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>- Reaktion wählten wir für unsere Untersuchung die Extraktkonzentration von 0,1 µl/ml (s. Abb. 8). Wie in Kapitel 4.1 dargestellt, wurden alle Extrakte dreimal vermessen und die verbleibende Radikalproduktion in Prozent der Kontrolle ermittelt. Der Effekt von STW 5 wurde einerseits direkt gemessen, andererseits als Summe der Effekte der Einzelextrakte berechnet. Der gemessene Wert betrug 36,8%, der berechnete 28,6%. Diese Daten deuten auf additive Wechselwirkungen zwischen den Einzelextrakten hin.

Außerdem wurde hier ersichtlich, dass die antioxidative Wirkung in STW 5 hauptsächlich durch die Extrakte aus Pfefferminzblättern, Schöllkraut, Melissenblättern und Kamillenblüten verursacht wurde.

### **4.4.2 Untersuchung mittels des Darmmodells**

Auch am Darmmodell sollten die Wechselwirkungen zwischen den Einzelextrakten in STW 5 untersucht werden. Alle Einzelextrakte wurden in einer Konzentration von 0,1 µl/ml mindestens viermal vermessen und die verbleibende Radikalproduktion in Prozent der Kontrolle ermittelt. Um mögliche Synergien zwischen den Komponenten in STW 5 zu untersuchen wurde der Effekt von STW 5 als Summe der Effekte der Einzelextrakte, analog den Konzentrationsverhältnissen in STW 5, berechnet und mit dem direkt Gemessenen verglichen. Der berechnete Wert betrug 50,3%, der gemessene 32 %.

Dieses Ergebnis verdeutlicht am Darmmodell die supraadditive Wirkung zwischen den Einzelextrakten (**Abb. 12**), die möglicherweise vor allem durch Pfefferminzblättern, Kamilleblüten und Kümmelfrüchten hervorgerufen wird.



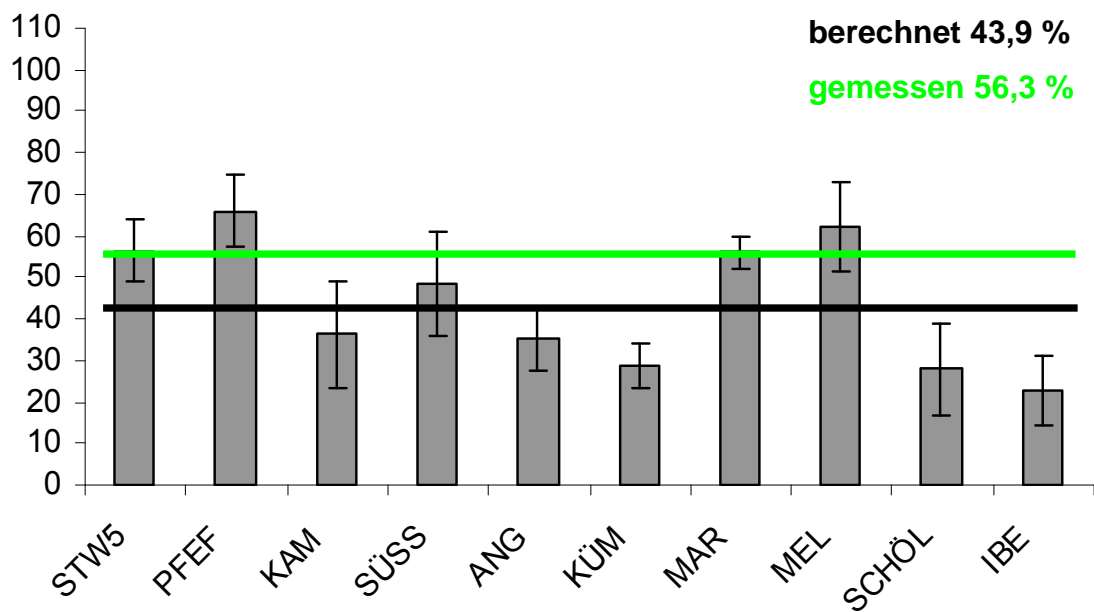
**Abb.: 12: Darmmodell:** Untersuchung zu pharmakologischen Synergien zwischen den Einzelextrakten von STW 5 [MW, SD, jeweils n=4 bis 5]

#### 4.4.3 Untersuchung mittels des Mastzellenmodells

Im Mastzellenmodell wurde ebenfalls das Zusammenwirken zwischen den Einzelextrakten in STW 5 untersucht. Die Extrakte wurden in einer einheitlichen Konzentration von 0,4  $\mu\text{l/ml}$  eingesetzt und auf den Hemmungsgrad nach Zymosanstimulation untersucht. Als Summe der Einzeleffekte der verschiedenen Extrakte wurde die verbleibende Radikalproduktion von STW 5 berechnet und mit dem gemessenen Wert von STW 5 verglichen. Für die Radikalproduktion nach Stimulation mit Zymosan betrug der berechnete Wert 43,9 %, der

gemessene 56,3 % (**Abb. 13**). Dadurch wird ersichtlich, dass alle Einzelextrakte synergistisch zur Gesamtwirkung von STW 5 beitragen.

Ferner wurde deutlich, dass der radikalfangende Effekt von STW 5 in diesem Modell überwiegend durch die Extrakte aus Pfefferminzblättern, Melisseblättern und Mariendistelfrüchten erzeugt wurde.



**Abb.: 13: MZ- Modell:** Untersuchung zu pharmakologischen Zusammenwirken zwischen den Einzelextrakten von STW 5, [MW, SD, jeweils n = 3]

## **5 Diskussion**

### **5.1 STW 5 und seine Komponenten als Antioxidantien**

In der Entstehung von zahlreichen Erkrankungen des Gastrointestinaltraktes, wie unter anderem des Reizmagens und des Reizdarms, spielt die Entzündungsreaktion eine wichtige Rolle (Barbara et al. 2002; Wang et al. 2007; Camilleri 2006; Spiller & Campell 2006). Für deren Behandlung stellen oftmals pflanzliche Mehrkomponenten-Präparate, wie zum Beispiel STW 5, eine sehr gute Alternative dar. Da ROS in der Inflammationsreaktion von großer Bedeutung sind, könnte der antioxidative Effekt des eingesetzten Arzneimittels (STW 5 und Einzelextrakte) zur therapeutischen Wirkung beitragen.

#### **5.1.1 Antioxidative Effekte in chemischen radikalbildenden Systemen**

Inwieweit STW 5 und seine Komponenten Radikale abfangen, konnte in dem rein chemischen Testsystem, das in der Reaktion zwischen Zymosan und  $H_2O_2$  besteht, bestätigt werden. Am stärksten antioxidativ wirksam waren in dieser Reaktion die Extrakte aus Pfefferminzblättern und Schöllkraut, am geringsten die aus Süssholzwurzel und Iberis amara. STW 5 selbst und die restlichen Komponenten befanden sich betreffend der Wirkstärke im Mittelfeld.

Germann führte bei der Untersuchung von STW 5 und seinen Einzelextrakten mit der AAPH- und der Xanthin/- Xanthinoxidase – Reaktion ähnliche Versuche durch (Germann 2005). Wie in der vorliegenden Arbeit zeigten auch dort diese rein chemischen Testsysteme, dass der Extrakt aus Pfefferminzblättern das stärkste radikalfangende, der aus Iberis amara das schwächste Potential aufwies. Der zweitstärkste war in der AAPH- Reaktion der Extrakt aus Melissenblättern, gefolgt von STW 5, Kamillenblüten, Kümmelfrüchten, Angelikawurzel, Schöllkraut, Mariendistel Früchte und Süssholzwurzel.

In der Xanthin/- Xanthinoxidase- Reaktion war ebenfalls der Extrakt aus Melissenblättern am stärksten wirksam, gefolgt von STW 5, Kamilleblüten, Angelikawurzel, Mariendistel, Kümmelfrüchten, Schöllkraut und Süßholzwurzel. In diesen beiden Systemen war der Extrakt aus Schöllkraut nur schwach wirksam, wobei dieser Extrakt in dieser vorgestellten Arbeit in der  $H_2O_2$ / Zymosan- Reaktion sich als sehr wirksam erwiesen hat.

Auch Schempp et al. führte eine ähnliche Studie mit einem Myeloperoxidase-Modell durch. Dabei wurde die Hypochloritbildung in einem rein chemischen Testsystem verfolgt. In dieser Reaktion zeigten absteigend die Extrakte aus Iberis amara, Kamillenblüten, Mariendistelfrüchten, Melissenblättern und Süßholzwurzel die stärkste antioxidative Wirkung, während die Extrakte aus Kümmelfrüchten, Pfefferminzblättern und Schöllkraut prooxidative Effekte zeigten. Der Extrakt aus Angelikawurzel war hier unwirksam. STW 5 selbst wirkte in dieser Reaktion antioxidativ. In diesem System war Iberis der wirksamste Extrakt, während in dem in dieser Arbeit vorgestellten Modell der Iberisextrakt im Allgemeinen nur sehr schwach wirksam war (Schempp et al. 2006).

Diese Befunde zeigen, dass die pflanzlichen Antioxidantien in unterschiedlichen Testsystemen sehr divergierende Effekte hervorrufen. Daher kann eine ausreichende Charakterisierung nur durch Verwendung eines möglichst großen Spektrums von verschiedenen Modellreaktionen gelingen.

## **5.1.2 Antioxidative Effekte in zelluären Systemen**

### **5.1.2.1 Antioxidative Effekte im Darmmodell**

Um die antioxidative Eigenschaften der Extrakte weiter zu charakterisieren, untersuchten wir auch die Effekte auf die Radikalproduktion von Ileumpräparaten nach Stimulation mit Histamin.

Das Ergebnis in dieser Arbeit zeigt, dass unstimuliert nur eine geringe basale Radikalbildung in den Darmpräparaten der Mäuse auftrat, jedoch konnte die Applikation von Histamin diese stimulieren und daher oxidativen Stress verstärken. Die Verteilung bezüglich der Wirksamkeit der Extrakte sah folgendermaßen aus: Wie im rein chemischen System hatte der Extrakt aus Pfefferminzblättern das stärkste Potential, die Radikalproduktion nach Stimulation mit Histamin zu senken. Der Extrakt aus Schöllkraut hingegen hatte in diesem Testsystem den schwächsten antioxidativen Effekt. Kamillenblütenextrakt war hier auffallend wirksam. Die übrigen Extrakte und STW 5 befanden sich dosisabhängig bezüglich ihrer Wirkstärke im Mittelfeld. Wie hier dargestellt wurde, weist das Mäuseileum nach Stimulation mit Histamin eine hohe Radikalproduktion auf, und da viele Befunde für eine Beteiligung einer Entzündungsreaktion beim RDS sprechen (Camilleri 2006), dürfte die radikalabfangende Wirkung der Phytotherapeutika wie zum Beispiel STW 5 von größter Bedeutung sein. Daher wäre es interessant der Frage nachzugehen, ob die Effekte der Extrakte auf direkten antioxidativen Eigenschaften, d.h. also in der direkten Reaktion mit den gebildeten ROS oder auf Hemmung der radikalbildenden Enzyme/ Enzymsysteme beruhen. Auch unabhängig von der Kenntnis des genauen Mechanismus ergibt sich daraus ein breites Wirkungsspektrum für STW 5 und seine Komponenten, das in der Therapie des RDS adäquat zum Tragen kommen könnte.



### 5.1.2.2 Antioxidative Effekte mit Mastzellen

In einem weiteren zellulären Modell konnten wir auch mit Zymosan-aktivierten Mastzellen zeigen, dass STW 5 und seine Komponenten Radikale abfangen. Bei der basalen Radikalproduktion hatte wieder der Extrakt aus Pfefferminzblättern das stärkste, der Iberisextrakt das schwächste antioxidative Potential, wobei auch der Extrakt aus Melisseblättern noch stark wirksam war. Kamille und Kümmel waren in diesem Test im Vergleich zu den vorherigen Tests auffallend wenig wirksam. Nach Stimulation mit Zymosan zeigten die Extrakte aus Pfefferminzblättern und Melissenblättern auf die Radikalbildung konzentrationsabhängig den deutlichsten hemmenden Effekt, der Extrakt aus Schöllkraut und Iberis amara waren am geringsten wirksam.

Da der Pfefferminzblätterextrakt sowohl im chemischen als auch im zellulären System stark wirksam war, kann somit angenommen werden, dass diese ausgeprägte Wirkung durch direkte radikalfangende Mechanismen weniger durch Enzymhemmung zustande kommt. Der Kamillenblütenextrakt hingegen hatte im Gegensatz zum Darmmodell einen geringen antioxidativen Effekt, reduzierte aber die Radikalproduktion nach Stimulation mit Zymosan deutlich. Dieser Wirkmechanismus deutet daher eher auf eine Hemmung der Mastzellaktivierung hin als auf einen radikalfangenden Effekt.

Dadurch wird erneut deutlich, dass STW 5 und seine Einzelextrakte in verschiedenen Systemen unterschiedlich starke Wirkungen entsprechend ihrer radikalfangenden Eigenschaften zeigen können. Bei den Untersuchungen von Germann (s. 5.1.2.3) hatte zum Beispiel der Extrakt aus Kamillenblüten eine viel stärkere Wirkung als in den in dieser Arbeit vorgestellten Modellen. Zur Beschreibung der antioxidativen Eigenschaften von Phytopharmaka müssen daher immer verschiedene Testsysteme eingesetzt werden, da davon ausgegangen werden kann, dass in vivo unterschiedliche Spezies von Radikalen aus unterschiedlichen Quellen wirksam sind.

### 5.1.2.3 Antioxidative Effekte in weiteren zellulären Systemen

Germann konnte in weiteren zellulären Modellen mit Hilfe von Lungenmakrophagen und Blut-Leukozyten ebenfalls zeigen, dass STW 5 und seine Komponenten Radikale abfangen. Im Lungenmodell hatte der Extrakt aus Pfefferminzblättern den stärksten antioxidativen Effekt, gefolgt von Melissenblättern, STW 5, Kamillenblüten, Mariendistelfrüchten, Süßholzwurzel, Schöllkraut und Iberis amara. In allen bisher vorgestellten Modellen war der Extrakt aus Iberis amara nur sehr schwach wirksam. Im Leukozytenmodell untersuchte Germann zunächst den Einfluss der Extrakte auf die basale Radikalproduktion. Dort bewirkte der Extrakt aus Kamillenblüten die stärkste Hemmung der basalen Radikalproduktion, gefolgt vom Pfefferminz- und Melissenblättereextrakt und STW 5. Kümmelfrüchtenextrakt war hier auffallend wenig wirksam, wobei Kümmel in dieser vorgestellten Arbeit im Darmmodell deutlich wirksamer war. Kamille hatte hier den stärksten hemmenden Effekt, jedoch im Mastzellenmodell war Kamille nur sehr schwach wirksam.

Neben den Effekten auf die basale Radikalproduktion wurden von Germann auch die nach Zymosan-Stimulation untersucht. Hier senkte Pfefferminzblätterextrakt die Stimulierbarkeit am stärksten, gefolgt von Melissenblättern, STW 5 und Iberis amara (Germann 2005).

Wie auch schon von Germann beschrieben, sollte im Weiteren auch in dieser Arbeit untersucht werden, inwieweit synergistische Wirkeffekte für die Mischung STW 5 beobachtet werden können.

### 5.1.3 Synergieeffekte zwischen den Einzelextrakten von STW 5

Vergleicht man die Wirksamkeit von STW 5 und seinen Extrakten in den verschiedenen Testsystemen, so fällt auf, dass STW 5 bei den zellulären Systemen im Vergleich zu seinen Einzelkomponenten relativ wirksamer ist als bei den rein chemischen.

Daher überprüften wir durch die Berechnung des sich durch die Zusammensetzung von STW 5 ergebende anteiligen Wirkeffektes der Einzelextrakte und dem Vergleich zur gemessenen Wirkung von STW 5, inwieweit diese als rein additiv oder als synergistisch betrachtet werden kann.

Die Untersuchung im Darmmodell weist auf supraadditive Wechselwirkungen zwischen den Einzelextrakten hin. Dies zeigt sich darin, dass in diesem Testsystem bei der Wirkung auf die stimulierte Radikalproduktion ein deutlicher Unterschied zwischen den berechneten (50,3%) und den gemessenen (32%) Werten. D.h. STW 5 weist einen wesentlich größeren Effekt auf als er aus den Einzelkomponenten bei additivem Verhalten errechnet wurde.

Nicht ganz so deutlich sind die Verhältnisse im Mastzellenmodell. Hier betrug der berechnete Wert 43,9% und der gemessene Wert 56,3%, sodass auch hier leichte supraadditive Wechselwirkungen auftreten.

Germann (2005) konnte ebenfalls in Untersuchungen mit zellulären Systemen (Lungenmodell und Leukozytenmodell) zeigen, dass pflanzliche Mehrkomponentenpräparate wie STW 5 supraadditiv synergistisch wirksam waren- die gemessene verbleibende Radikalproduktion betrug 64% bzw. 52% des berechneten Wertes. Dagegen wurden keine Synergismen bei den einfachen, rein chemischen Modellen wie hier in dieser vorgestellten Arbeit mit Zymosan/ H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>- Reaktion (gemessener (36,8%)- und berechneter (28,6%) Wert), als auch mit AAPH- und Xanthin/ Xanthinoxidase- Reaktion (gemessene (26,4min) und berechnete (26,6min) Auslöschzeit) gefunden (Germann 2005).

Synergetische antioxidative Effekte konnten auch in anderen Studien mit pflanzlichen Extrakten beobachtet werden (Liu 2003). Prabhakar & Doble (2009)

konnten zeigen, dass synergistische antioxidative Effekte von Berberin bei der Therapie von Diabetes mellitus Typ II auftraten.

Die Frage, wie solche Synergien bei Mehrkomponentensystemen zustande kommen, kann bisher noch nicht beantwortet werden (Wagner & Merzenich 2009). In Fall von STW 5 wäre es aus theoretischen und praktischen Erwägungen interessant zu wissen, inwieweit alle oder nur einzelne Extrakte dazu beitragen, und inwieweit eventuell eine Minimalversion ähnliche gute therapeutische Wirkungen erzielen könnte.

## **5.2 Oxidativer Stress und Mastzellen in der Pathogenese des RDS- können die antioxidativen Eigenschaften zur therapeutischen Wirkung von STW 5 beitragen?**

Ausgehend von den aktuellen Befunden wird immer deutlicher, dass Infektionen, Inflammation und Mastzellaktivierung für die Pathogenese des RDS wichtig sind (Barbara et al. 2002; Chadwick et al. 2002; Parry et al. 2003; Spiller 2007). In weiteren Studien konnte gezeigt werden, dass Mastzellabhängige Aktivierung von viszeralen sensorischen Neuronen zu nozizeptorische Hypersensitivität führen kann (Barbara et al. 2007; Farmer & Aziz 2008). Außerdem wird diskutiert, dass oxidativer Stress die Durchlässigkeit der Darmschleimhaut erhöht und dadurch auch immunkompetente Zellen, vor allem Mastzellen aktiviert, die dann enterische Neuronen sensibilisieren (Spiller & Garsed 2009; Cuzzocrea et al. 2000). In einigen Studien wurde nachgewiesen, dass Mastzellen fähig sind, Radikale zu bilden bzw. durch deren Aktivierung die Bildung von ROS begünstigt wird (Suzuki et al. 2005, Ching et al. 1995, Yang & Marshall 2009, Swindle & Metcalfe 2007), aber auch, dass ROS für die durch IgE- Antigen verursachte Mastzelldegranulation verantwortlich sind (Swindle et al. 2004). Zusätzlich wird auch die Aktivierung von Makrophagen für die ROS-Bildung verantwortlich gemacht (Swindle et al. 2002). Auf der Basis dieser Erkenntnis werden inzwischen antiinflammatorische Therapieansätze bei RDS verfolgt. Neben Phytotherapeutika wie STW 5 oder anderen pflanzlichen Antioxidantien (Chen et al. 2000, Kaplan et al. 2007) kommen Entzündungshemmer wie Mesalazin zum Einsatz, wobei letzteres auch als Radikalfänger wirkt und die Mastzellinfiltration in die Darmwand hemmt (Barbara et al. 2007). Ob es sich bei der therapeutischen Wirkung um eine tatsächliche Reduktion der Mastzellzahl oder um eine Hemmung der Mastzelldegranulation handelt, ist unklar.

Noviana et al. konnten im GIT von Hunden zeigen, dass sich die höchste Mastzellichte in der Lamina propria sowie in der Tela submucosa befindet, während in der Tunica muscularis und Tunica serosa die niedrigsten Zahlen

vorliegen (Noviana et al. 2004). In dieser Publikation wird beschrieben, dass in der Lamina propria des Magens und des Duodenums, unabhängig von der Gewebefixierung, mehr metachromatisch gefärbte Mastzellen zu finden sind als Tryptase und/oder Chymase positive Mastzellen. Zwischen den einzelnen Dünndarmabschnitten verändert sich ihre Zelldichte nicht, und ihre Anzahl nimmt in der Lamina propria von der Zotte zur Krypte hin zu (Spinato et al. 1990; Noviana et al. 2004). Intraepitheliale Mastzellen wurden nicht nachgewiesen (German et al. 1999).

He konnte zeigen, dass es bei Morbus Crohn und Colitis ulcerosa des Menschen zu einer Erhöhung der Mastzellendichte kommt (He 2004). German et al. hingegen lieferte widersprüchliche Untersuchungsergebnisse hinsichtlich der Mastzellinfiltration bei kaninen RDS. Dabei wurde eine Abnahme der Mastzellendichte im Duodenum beschrieben (German et al. 2001, Locher et al. 2001).

Diese Befunde legen nahe, dass oxidativer Stress einen wesentlichen Beitrag zur Pathogenese des RDS liefert. Zumindest in initialen Stadien würde sich oxidativer Stress nur in Störungen der Zellfunktion äußern, so dass die Definition des RDS als eine funktionelle Erkrankung des Darmes ohne „Organbefund“ voll erfüllt wäre (Battino et al. 2002; Kruidenier et al. 2003; Siems et al. 2005; Camilleri 2006; Spiller & Campell 2006; Wang et al. 2007; Kondo et al. 2009; Spiller & Garsed 2009; Mearin et al. 2009; Ohman & Simrén 2010).

Weitere Untersuchungen sollten dann die genaueren Zusammenhänge zwischen oxidativem Stress und den weiteren Symptomen des RDS aufdecken sowie erklären, ob Antioxidantien gezielt therapeutisch dagegen eingesetzt werden können.

## 6 Zusammenfassung

Das Reizdarmsyndrom ist gekennzeichnet durch vielfältige Symptome unterschiedlicher Pathogenese und ist eine der häufigsten Erkrankungen des Gastrointestinaltrakts. Im Vordergrund 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. In diesem Zusammenhang übernehmen reaktive Sauerstoffspezies eine wichtige Rolle in der Entstehung entzündlicher Erkrankungen des Magen- Darm- Trakts wie Reizmagen und Reizdarm. Deshalb werden in der Therapie dieser Beschwerden häufig Phytotherapeutika eingesetzt, so dass in der vorliegenden Arbeit die Wirkungen des Magen- Darm- Therapeutikum STW 5 und seinen neun Einzelextrakten sowohl in rein chemischen Testsystem (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>/ Zymosan- Reaktion) als auch in zellulären Modellen (Darmmodell, isolierte Mastzellenmodell) auf ihre antioxidativen Wirkungen hin untersucht wurden.

In allen Untersuchungen wurden radikalfangende Effekte für STW 5 und seine Einzelextrakte gefunden, wobei die Extrakte je nach Testsystem unterschiedlich stark wirksam waren. Im rein chemischen System zeigten die Extrakte aus Pfefferminzblättern und Schöllkraut dosisabhängig den stärksten und die Extrakte aus Iberis amara und Süssholz den schwächsten antioxidativen Effekt. Auch im Darmmodell wurde die Radikalproduktion nach Stimulation mit Histamin von Pfefferminzblätterextrakt am deutlichsten reduziert. Der Extrakt aus Schöllkraut zeigte sowohl im Darmmodell als auch im Mastzellenmodell die schwächste Wirkung. Der Pfefferminzblätterextrakt war ebenso im Mastzellenmodell wirksam, wobei es hier nach Stimulation mit Zymosan den stärksten hemmenden Effekt auf die Radikalproduktion aufwies. Auch der Extrakt aus Melissenblättern war hier im Vergleich zu den vorherigen genannten Tests deutlich wirksam. Dies veranschaulicht wiederum, dass die

Extrakte immer in verschiedenen Testsystemen überprüft werden sollten, damit ihre radikalfangenden Eigenschaften charakterisiert werden können.

Weiterhin wurde überprüft, ob in Mehrkomponentenpräparate wie STW 5 hemmende oder aktivierende Synergien zwischen den Einzelextrakten auftreten. Das Ergebnis im chemischen Modell deutete auf additive Wechselwirkungen hin. Im Darmmodell und Mastzellenmodell hingegen kamen wir zu dem Ergebnis, dass supraadditive Wechselwirkungen zwischen den Einzelextrakten auftreten und somit zur Gesamtwirkung von STW 5 beitragen.

Zusammenfassend konnte gezeigt werden, dass das untersuchte Phytotherapeutikum STW 5 und seine Einzelextrakte einerseits zu einer signifikanten Reduzierung von in der Darmwand produzierten freien Radikalen und andererseits zu einer Hemmung der Mastzellaktivierung führen. Dieses Wirkungsspektrum könnte durchaus auch einer pharmakologischen Therapie des Reizdarmsyndroms mittels STW 5 zugrunde liegen.



## 7 Literaturverzeichnis

**Allescher H.D. (2006):** Functional dyspepsia – A multicausal disease and its therapy. *Phytomedicine*; 13: 2–11.

**Allescher H.D., Wagner H. (2007):** STW 5/Iberogast: multi-target-action for treatment of functional dyspepsia and irritable bowel syndrome. *Wien Med Wochenschr.*; 157: 301-307.

**Allescher H.D., Müller M.H., Vinson B.R., Kelber O., Weiser D. (2009):** STW 5: Multi-Target-Therapie bei funktionellen Magen-Darm-Erkrankungen zodiazepinen (STW5: Multi-target therapy of functional gastrointestinal diseases); *Z. Phytother.*; 3: 123-128.

**Ammon H.P.T., Kelber O., Okpanyi S.N. (2006):** Spasmolytic and tonic effect of Iberogast (STW 5) in intestinal smooth muscle. *Phytomedicine*; 13: 67–74.

**Babior B. M. (2004):** NADPH oxidase. In: *Curr Opin Immunol*, S.42–47.

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

**Barbara G., Wang B., Stanghellini V., De Giorgio R., Cremon C., Di Nardo G., (2007):** Mast cell-dependent excitation of visceral-nociceptive sensory neurons in irritable bowel syndrome. *Gastroenterology*; 132: 26–37.

**Bauer O., Razin E. (2000):** Mast Cell-Nerve Interactions, *News Physiol Sci*; 15: 213-218.

**Battino M., Bullon P., Wilson M., Newman H. (1999):** Oxidative injury and inflammatory periodontal diseases: the challenge of anti-oxidants to free radicals and reactive oxygen species. *Crit Rev Oral Biol Med*, 10: 458-476.

**Biesalski H. K., Köhrle J., Schümann K. (2002):** Vitamine, Spurenelemente und Mineralstoffe. Georg Thieme Verlag; Stuttgart/ New York, 50-56, 265-267, 269-278, 312-348, 386-391, 651-662, 717-723.

**Bijkerk C.J., De Wit N.J., Muris J.W., Whorwell P.J., Knottnerus J.A., Hoes A.W. (2009):** Soluble or insoluble fibre in irritable bowel syndrome in primary care? Randomised placebo controlled trial, *BMJ*; 339: b3154.

**Bilge T., Levent F., Altintas E., Turhan N., Ulker A., Daglı U. (2005):** Mucosal mast cells in irritable bowel syndrome and inflammatory bowel disease. *Acta Medica*; 48: 163-164.

**Bischoff S. (2009):** Probiotika, Präbiotika und Synbiotika : Zusammenspiel von intestinalem Immunsystem, Darmflora und Ernährung als Faktoren für gesundheitliches Wohlbefinden; Thieme Verlag KG, S.1-7.

**Black P.H., Garbutt L.D. (2002):** Stress, inflammation and cardiovascular disease. *J Psychosom Res*; 52: 1-23.

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

**Caldecott K.W. (2003):** Protein-protein interactions during mammalian DNA single-strand break repair.; *Biochem Soc Trans* 31: 241-251.

**Camilleri M. (2006):** Is there a role for probiotics in irritable bowel syndrome? *Dig Liver Dis.*; 38: 266-269.

**Chadwick V. S., Chen W., Shu D., Paulus B., Bethwaite P., Tie A., Wilson I. (2002):** Activation on the mucosal immune system in irritable bowel syndrome. *Gastroenterology*; 122: 1778-1783.

**Chapple I.L. (1997):** Reactive oxygen species and antioxidants in inflammatory diseases. *J. Clin. Periodontol.*, 24: 287-296.

**Chen S.S., Gong J., Liu F.T., Mohammed U. (2000):** Naturally occurring polyphenolic antioxidants modulate IgE-mediated mast cells activation. *Immunology*; 100: 471-480.

**Ching T.L., Koelemij J.G., Bast A. (1995):** The effect of histamine on the oxidative burst of HL60 cells before and after exposure to reactive oxygen species. *Inflamm Res*; 44: 99-104.

**Clarkson P.M., Thompson H.S. (2000):** Antioxidants: what role do they play in physical activity and health?, *Am. J. of Clinical Nutrition*, 72: 637- 646.

**Collins S.M., Barbara G. (2004):** East meets West: infection, nerves, and mast cells in the irritable bowel syndrome, *Gut*; 53: 1068-1069.

**Cuzzocrea S., Mazzon E., De Sarro A., Caputi A.P. (2000):** Role of free radicals and poly(ADP-ribose)synthetase in intestinal tight junction permeability. *Mol Med*; 6: 766-778.

**Defeng Wu PH.D., Arthur I. Cederbaum PH.D. (2003):** Alcohol, oxidative stress, and free radical damage. *Alcohol Research & Health*, 27: 277-284.

**Deter H.C., Wienbeck M. (1998):** Funktionelle Darmbeschwerden, Deutsches Ärzteblatt; 95: A-1966- 1972.

**Dietl H., Ohlenschläger G. (2004):** Handbuch der Orthomolekularen Medizin. Karl F. Haug Fachbuchverlag, 25-30, 79-87.

**Drossman D.A., Dumitrascu D.L. (2006):** Rome III: New standard for functional gastrointestinal disorders. J Gastrointestin Liver Dis; 15: 237-241.

**Dworski R. (2000):** Oxidant stress in asthma. Thorax, 55: 51-53.

**Echternacher B., Mannel D.N., Hultner L. (1996):** Critical protective role of mast cells in a model of acute septic peritonitis. Nature. 381: 75-77.

**Eckert G.P., Wegat T., Schaffer S., Müller W.E. (2006):** Oxidativer Stress, PZ, Pharmazeutische Zeitung; Pharmakologisches Institut für Naturwissenschaftler, Universität Frankfurt.

**Elstner E.F., Bors W., Wilmanns W. (1986):** Reaktive Sauerstoffspezies in der Medizin. Springer- Verlag, Berlin Heidelberg New York London Paris Tokyo, S. 5, 11, 100, 118, 143.

**Enerbäck L. (1966a):** Mast cells in rat gastrointestinal mucosa. I. Effects of fixation. Acta Pathol. Microbiol. Scand. 66: 289-302

**Enerbäck L. (1966b):** Mast cells in rat gastrointestinal mucosa. II. Dye-binding and metachromatic properties. Acta Pathol. Microbiol. Scand. 66: 303-312.

**Ercal N., Gurer-Orhan H., Aykin-Burns N. (2001):** Toxic metals and oxidative stress part I: mechanisms involved in metal-induced oxidative damage. Curr Top Med Chem. 1: 529-539.

**Farhadi A., Fields J.Z., Keshavarzian A. (2007):** Mucosal mast cells are pivotal elements in inflammatory bowel disease that connect the dots: Stress, intestinal hyperpermeability and inflammation; World J Gastroenterol, 13: 3027-3030.

**Farmer A.D., Aziz Q. (2008):** Visceral pain hypersensitivity in functional gastrointestinal disorder, Gut, 57: 923–929.

**Faure C., Bouin M., Poitras P. (2007):** Visceral Hypersensitivity in Irritable Bowel Syndrome: Does It Really Normalize Over Time? Gastroenterology, 132: 464-465.

**Ford A.C., Talley N.J., Spiegel B.M., Foxx-Orenstein A.E., Schiller L., Quigley E.M., Moayyedi P. (2008):** Effect of fibre, antispasmodics, and peppermint oil in the treatment of irritable bowel syndrome: systematic review and meta-analysis. BMJ; 337: a2313 Review. Erratum in: BMJ; 338: b1881.

- Friedt M. (2008):** Abteilung Gastroenterologie und Ernährung, Universitätskinderkliniken Zürich, Reizdarmsyndrom, 156: 275–286.
- Gambhir J., Nath R. (1992):** Effect of cadmium on tissue glutathione and glutathione peroxidase in rats: influence of selenium supplementation. *Ind. J. Exp. Biol.* 30: 597- 601.
- German A. J., Hall E.J., Day M.J. (1999):** Analysis of leucocyte subsets in the canine intestine. *J. Comp. Pathol.* 120: 129-175.
- German A. J., Hall E.J., Day M.J. (2001):** Immune cell populations within the duodenal mucosa of dogs with enteropathies. *J. Vet. Intern. Med.* 15: 14-25.
- Germann I., Hagelauer D., Kelber O., Vinson B., Laufer S., Weiser D., Heinle H. (2006):** Antioxidative properties of the gastrointestinal phytopharmaceutical remedy STW 5, *Phytomedicine*; 1:45-50.
- Germann I. (2005):** Charakterisierung der radikalfangenden Eigenschaften pflanzlicher Entzündungshemmer. Dissertation der Fakultät für Chemie und Pharmazie der Universität Tübingen.
- Gottwald, T., Coerper S, Schaffer M, Koveker G, Stead RH (1998):** The mast cell-nerve axis in wound healing: a hypothesis. *Wound Repair Regen.* 6: 8-20.
- Graf B.A., Milbury P.E., Blumberg, J.B.(2005):** Flavols, Flavanones, and Human Health: Epidemiological Evidence. *J Med Food*, 8: 281–290.
- Guilarte M., Santos J., De Torres I., Alonso C., Vicario M., Ramos L., Martínez C., Casellas F., Saperas E., Malagelada J.R. (2007):** Diarrhoea-predominant IBS patients show mast cell activation and hyperplasia in the jejunum. *Gut.* 56: 203-209.
- Gustav D., Deuse U., Michalsen A. (2006):** Chronische Erkrankungen integrativ. Konventionelle und komplementäre Therapie, Urban & Fischer
- Gutteridge J.M., Halliwell B. (2000):** Free radicals and antioxidants in the year 2000. A historical look to the future. *Ann. N.Y. Acad. Sci.*, 899: 136- 147.
- Gwinn M. R., Vallyathan V. (2006):** Respiratory burst: role in signal transduction in alveolar macrophages. In: *Journal of toxicology and environmental health. Part B, Critical reviews*, S.27–39.
- Hagelauer D. (2007):** 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

**Halliwell B. (1994):** Free radicals, antioxidants, and human disease: curiosity, cause, or consequence? *Lancet*, 344: 721-724.

**Halliwell B. (1996):** Antioxidants in human health and disease. *Annu. Rev. Nutr.*, 16: 33- 50.

**Halliwell B. (1996):** Oxidative stress, nutrition and health. Experimental strategies for optimization of nutritional antioxidant intake in humans. *Free. Radic. Res.*, 25 : 57- 74.

**Halliwell B., Gutteridge J.M., Cross C.E. (1992):** Free radicals, antioxidants, and human disease: where are we now? *J. Lab Clin. Med.*, 119: 598-620.

**Halliwell B., Gutteridge J.M. (1999):** Free radicals in biology and medicine. 3.rd edition, Oxford Science Publications, 18:125- 126.

**Halliwell B., Whiteman M. (2004):** Measuring reactive species and oxidative damage in vivo and in cell culture: how should you do it and what do the results mean? *Brit. J. Pharmacol.* 142: 231-255.

**Halvorson H.A., Schlett C.D., Riddle M.S. (2006):** Postinfectious irritable bowel syndrome--a meta-analysis, *Am J Gastroenterol.*, 101: 1894-1899.

**He S.H. (2004):** Key role of mast cells and their major secretory products in inflammatory bowel disease. *World J. Gastroenterol.* 10: 309-318.

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

**Henningsen P., Zimmermann T., Sattel H. (2003):** Medically unexplained physical symptoms, anxiety, and depression: a meta-analytic review. *Psychosom Med*; 65: 528-533.

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

**Holtmann G., Adam B, Vinson B (2004):** Evidenz-basierte Medizin und Phytotherapie bei funktioneller Dyspepsie und Reizdarmsyndrom: Eine systematische Analyse der verfügbaren Evidenz zum Präparat Iberogast. *Wien Med Wochenschr.* 154: 528–534.

**Hotz J., Madisch A., Enck P., Goebell H. (2000):** Das Reizdarmsyndrom: Definition, Diagnosesicherung, Pathophysiologie und Therapiemöglichkeiten; *Dtsch Ärzteblatt* 97: A-3263/ B-2745/ C-2432.

**Hotz J., Enck P., Goebell H., Heymann-Mönnikes I., Holtmann G., Layer P. (1999):** Consensus report: irritable bowel syndrome– definition, differential diagnosis, pathophysiology and therapeutic possibilities. *Z Gastroenterol.* 37: 685-700.

**Irani K. (2000):** Oxidant signaling in vascular cell growth, death, and survival : a review of the roles of reactive oxygen species in smooth muscle and endothelial cell mitogenic and apoptotic signaling. *Circ. Res.*, 87: 179-183.

**Kaplan M., Mutlu E.A., Benson M., Fields J.Z., Banan A., Keshavarzian A. (2007):** Use of herbal preparations in the treatment of oxidant-mediated inflammatory disorders. *Complement Ther Med.*; 15: 207-216.

**Kassinen A., Krogius-Kurikka L., Mäkivuokko H., Rinttilä T., Paulin L., Corander J., Malinen E., Apajalahti J., Palva A. (2007):** The fecal microbiota of irritable bowel syndrom patients differs significantly from that of healthy subjects. *Gastroenterology* 133: 24-33.

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

**Khayyal M., El-Ghazaly M., Kenawy S., Self-El-Nasr M., Mahran L., Kafafi Y., Okpanyi S.N. (2001):** Antulcerogenic effect of some gastrointestinally acting plant extracts and their combination. *Arzneim Forsch Drug* 51: 545–553.

**Kiank C., Taché Y., Larauche M. (2010):** Stress-related modulation of inflammation in experimental models of bowel disease and post-infectious irritable bowel syndrome: Role of corticotropin-releasing factor receptors *Brain, Behavior and Immunity*: 24: 41-48.

**Kleinschmidt S. (2007):** Untersuchungen über altersassoziierte Veränderungen des kaninen mukosalen Darmimmunsystems und zur Beteiligung von Mastzellsubtypen und Immunzellen bei Hunden mit chronischen idiopathischen Darmentzündungen (IBD).

**Klinische Pathophysiologie (2001):** 8.Auflage, Walter Siegenthaler , Georg Thieme Verlag Stuttgart- New York

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

**Kolfenbach L. (2007):** The pathophysiologie, diagnosis, and treatment of IBS, *JAAPA- Journal*; 20: 16-20.

**Kondo T.**, Hirose M., Kageyama K. (2009): Roles of Oxidative Stress and Redox Regulation in Atherosclerosis, *J Atheroscler Thromb.* 16:532-538.

**Kruidenier L.**, Kuiper I., Lamers C.B., Verspaget H.W. (2003): intestinal oxidative damage in inflammatory bowel disease: semi-quantification, localization, and association with mucosal antioxidants. *J Pathol.* 201: 28-36.

**Leeuwenburgh C.**, Heinecke J.W. (2001): Oxidative Stress and Antioxidants in Exercise., *Current Medicinal Chemistry*; 8: 829- 838.

**Liu C.Y.**, Müller M.H., Glatzle J., Weiser D., Kelber O., Enck P., Grundy D., Kreis M.E. (2004): The herbal preparation STW5 (Iberogast) desensitizes intestinal afferents in the rat small intestine. *Neurogastroenterol Motil*; 16: 759–764.

**Liu R.H.** (2003): Health benefits of fruit and vegetables are from additive and synergistic combinations of phytochemicals. *Am. J. Clin. Nutr.*; 78: 517- 520.

**Locher C.**, Tipold A., Welle M., Busato a., Zurbriggen A., Griot-Wenk M.E. (2001): Quantitative assessment of mast cells and expression of IgE protein and mRNA for IgE and interleukin 4 in the gastrointestinal tract of healthy dogs and dogs with inflammatory bowel disease. *Am. J. Vet. Res.* 62: 211-216.

**Longstreth G.F.**, Thompson W.G., Chey W.D., Houghton L.A., Mearin F., Spiller R.C. (2006): Functional bowel disorders. *Gastroenterology*; 130: 1480-1491.

**Madisch A.**, Holtmann G., Mayr G., Vinson B., Hotz J. (2004a): Treatment of functional dyspepsia with a herbal preparation. A double-blind, randomized, placebo-controlled multicenter trial, *\_Digestion*; 69: 45-52.

**Madisch A.**, Holtmann G., Plein K., Hotz J. (2004b): Treatment of irritable bowel syndrome with herbal preparations: results of a double-blind, randomized, placebo-controlled, multi-centre trial., *Aliment Pharmacol Ther.*; 19: 271-279.

**Malaviya R.**, Abraham S.N. (1998): Clinical implications of mast cell-bacteria interaction. *J. Mol. Med.*; 76: 617-623.

**Malaviya R.**, Ikeda T., Ross E., Abraham S.N. (1996): Mast cell modulation of neutrophil influx and bacterial clearance at sites of infection through TNF-alpha. *Nature.* 381: 77-80.

**Mearin F.**, Perelló A., Balboa A. (2009): Irritable bowel syndrome and inflammatory bowel disease: Is there a connection? *Gastroenterol Hepatol.* 32: 364-372.

**Meyer R. (2000):** Neue Therapieansätze beim Reizdarmsyndrom. Dtsch Ärzteblatt; 97: A-2549.

**Michael S.,** Kelber O. Vinson B. Nieber K. **(2006):** Herbal preparations STW 5 and STW 6 inhibit inflammation-mediated motility disorders in the ileum. UEGW Berlin A206

**Molderings G. (2010):** Mast cells function in physiology and pathophysiology, Biotrend Reviews; 5: 1-9.

**Monk K.R.,** Wu J., Williams J.P., Finney B.A., Fitzgerald M.E., Filippi M.D., Ratner N. **(2007):** Mast cells can contribute to axon-glia dissociation and fibrosis in peripheral nerve. Neuron Glia Biol. 3: 233-244.

**Montuschi P.,** Barnes P.J., Roberts L.J. **(2004):** II. Isoprostanes: markers and mediators of oxidative stress. FASEB J. 18: 1791-1800.

**Müller M.H.,** Liu C.Y., Glatzle J., Weiser D., Kelber O., Enck P., Grundy D., Kreis M.E. **(2006):** STW 5 (Iberogast) reduces afferent sensitivity in the rat small intestine., Phytomedicine.; 13: 100-106.

**Noli C., Miolo A. (2001):** The mast cell in wound healing. Vet Dermatol.; 12: 303-313.

**Noviana D.,** Mamba K., Makimura S, Horii Y. **(2004):** Distribution, histochemical and enzyme histochemical characterization of mast cells in dogs. J. Mol. Histol. 35: 123-132.

**Ohman L., Simrén M. (2010):** Pathogenesis of IBS: role of inflammation, immunity and neuroimmune interactions. Nat Rev Gastroenterol Hepatol.; 7: 163-173.

**O'Sullivan M.,** Clayton N., Breslin N.P., Harman I., Bountra C., McLaren A., **(2000):** Increased mast cells in the irritable bowel syndrome. Neurogastroenterol Motil; 12: 449-457.

**ÖAZ- Aktuell (2006):** Oxidative Stressmessung

**Park J.H.,** Rhee P.L., Kim H.S., Lee J.H., Kim Y.H., Kim J.J., Rhee J.C. **(2006):** Mucosal Mast Cell Counts Correlate With Visceral Hypersensitivity in Patients With Diarrhea Predominant Irritable Bowel Syndrome J Gastroenterol Hepatol.; 21: 71-78.

**Parry S.D.,** Stansfield R., Jelley D., Gregory W., Phillips E., Barton J.R., Welfare M.R. **(2003):** Is irritable bowel syndrom more common in patients presenting with bacterial gastroenteritis? A community-based, case-control study. Am J Gastroenterol; 98: 1970-1975.



**Parsons C.L.**, Dell J., Stanford E.J., Bullen M., Kahn B.S., Waxell T. (2002): Increased prevalence of interstitial cystitis: previously unrecognized urologic and gynecologic cases identified using a new symptom questionnaire and intravesical potassium sensitivity. *Urology*; 60: 573-578.

**Penissi A. B.**, Rudolph M.I., Piezzi R.S. (2003): Role of mast cells in gastrointestinal mucosal defense, *Biocell*; 27: 163-172.

**Piche T.**, Saint- Paul M.C, Dainese R., Barjoan M., Iannelli A., Montoyal M.L., Peyron J.F., Czerucka D., Cherikh F., Filippi J., Tran A., Hebuterne X. (2008): Mast cells and cellularity of the colonic mucosa correlated with fatigue and depression in irritable bowel syndrome *Gut*; 57: 468-473.

**Pierce J.D.**, Cackler A.B., Arnett M.G. (2004): Why should you care about free radicals? *RN.*; 67: 38-42.

**Piementel M.**, Park S., Mirocha J., Kane S.V., Kong Y. (2007): The effect of a non-absorbed oral antibiotic (rifaximin) in the symptoms of the irritable bowel syndrome: a randomized trial. *Ann Intern Med.*; 145: 557-563.

**Prabhakar P., Doble M.** (2009): Synergistic effect of phytochemicals in combination with hypoglycemic drugs on glucose uptake in myotubes: *Phytomedicine*; 16: 1119-1126.

**Reichling J., Saller R.** (2002): *Iberis amara* L. (bitter candytuft)-profile of a medicinal plant. *Forsch Komplementar med. Klass Naturheilkd*; 9: 21-33.

**Rhee S.G.** (1999): Redox signaling: hydrogen peroxide as intracellular messenger, *Exp Mol Med.*; 31: 53-59.

**Robbie- Ryan M., Brown M.** (2002): The role of mast cells in allergy and autoimmunity. *Curr Opin Immunol.*; 14: 728-733.

**Rösch W.** (2008a): Antibiotika gegen Reizdarm? *Dtsch Ärzteblatt*; 105: 750.

**Rösch W.** (2008b): Reizdarm durch veränderte Darmflora bedingt? *Dtsch Ärzteblatt* 105: 822.

**Ruitenberg E.J., Elgersma A.** (1976): Absence of intestinal mast cell response in congenitally athymic mice during *Trichinella spiralis* infection. *Nature.*; 264: 258-260.

**Saller R.**, Pfister-Hotz G., Iten F., Melzer J., Reichling J. (2002): 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 Komplementar med. Klass Naturheilkd*; 9: 1-20.

**Schaffer S. (2005):** Mediterrane Ernährung, Benefit und wissenschaftliche Grundlagen. Pharm. Ztg.; 150: 1856-1866.

**Schäppi M.G.,** Borrelli O., Knafelz D., Williams S., Smith V.V., Milla P.J., Lindley K.J. **(2008):** Mast cell-nerve interactions in children with functional dyspepsia. J Pediatr Gastroenterol Nutr.; 47: 472-480.

**Schempp H.,** Weiser D., Kelber O., Elstner E.F. **(2006):** Radical scavenging and anti-inflammatory properties of STW 5 (Iberogast) and its components. Phytomedicine 13: 36-44.

**Schnitker J., Schöneberg G. (2000):** Metaanalyse zur Auswirkung von Iberogast auf säurebedingte funktionelle Beschwerden des Magen-Darm-Traktes im Rahmen doppelblinder placebokontrollierter klinischer Studien. Forschungsbericht IAS/ STW0201-01

**Schölmerich J.,** Burdach S.E.G., Drexler H., Hallek M. **(2007):** Medizinische Therapie 2007/2008, 3 Auflage, Springer- Verlag

**Siems W.,** Krämer K., Grune T. **(2005):** Oxidativer Stress und Pharmaka. Govi-Verlag, PZ, Pharmazeutischer Verlag GmbH, Eschborn

**Spiller R. (2009):** Overlap between Irritable Bowel Syndrome and Inflammatory Bowel Disease: Dig Dis.; 27: 48- 54.

**Spiller R., Campbell E. (2006):** Post-infectious irritable bowel syndrome, Curr Opin Gastroenterol.; 22: 13-17.

**Spiller R.,** Aziz Q., Creed F., Emmanuel A., Houghton L., Hungin P. **(2007):** Guidelines on the irritable bowel syndrome: mechanisms and practical management. Gut; 56: 1770-1798.

**Spiller R., Garsed K. (2009):** Infection, inflammation, and the irritable bowel syndrome. Dig Liver Dis.; 41: 844-849.

**Spiller R. (2007):** Role of infection in irritable bowel syndrom. J Gastroenterol; 42: 41-47.

**Spinato M.T.,** Barker I.K., Houston D.M. **(1990):** A morphometric study of the canine colon: Comparison of control dogs and cases of colonic disease. Can. J. Vet. Res. 54: 477-486.

**Suzuki Y.,** Yoshimaru T., Inoue T., Niide O., Ra C. **(2005):** Role of oxidants in mast cell activation. Chem Immunol Allergy.; 87: 32-42.

**Swindle E.J., Metcalfe D.D. (2007):** The role of reactive oxygen species and nitric oxide in mast cell-dependent inflammatory processes. Immunol Rev.; 217: 186-205.

**Swindle E.J.**, Hunt J.A., Coleman J.W. (2002): A comparison of reactive oxygen species generation by rat peritoneal macrophages and mast cells using the highly sensitive real-time chemiluminescent probe pholasin: Inhibition of antigen-induced mast cell degranulation by macrophage-derived hydrogen peroxide. *J Immunol*; 169: 5866-5873.

**Swindle E.J.**, Metcalfe D.D., Coleman J.W. (2004): Rodent and human mast cells produce functionally significant intracellular reactive oxygen species but not nitric oxide. *J Biol Chem.*; 279: 48751-48759.

**Tieu K., Ischiropoulos H., Przedborski S. (2003):** Nitric oxide and reactive oxygen species in Parkinson's disease. *IUBMB. Life*; 55: 329-335.

**Tunc B.**, Filik L., Altıntaş E., Turhan N., Ulker A., Dağlı U. (2005): Mucosal mast cells in irritable bowel syndrome and inflammatory bowel disease, *Acta Medica (Hradec Kralove)*; 48: 163-164.

**Valko M.**, Morris H., Cronin M.T. (2005): Metals, toxicity and oxidative stress, *Curr Med Chem.*; 12: 1161-1208.

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

**Watzl B., Rechkemmer G. (2001):** Basiswissen aktualisiert: Flavonoide. *Ernährungs-Umschau* 48

**Wang S.**, Dong L., Luo J., Gong J., Li L., Lu X., Han S. (2007): Decreased expression of serotonin in the jejunum and increased numbers of mast cells in the terminal ileum in patients with irritable bowel syndrome. *World J Gastroenterol*; 13: 6041-6047.

**Wächtershäuser A., Stein J.M. (2008):** Ernährungsfaktoren und Ernährungstherapie beim Reizdarmsyndrom– was ist valide? *Gastroenterologie*; 46: 277-298.

**Wagner H., Merzenich U. (2009):** Synergy research: Approaching a new generation of phytopharmaceuticals; *Phytomedicine*, 16: 97-110.

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

**Weston A.P.**, Biddle W.L., Bhatia P.S. (1993): Terminal ileal mucosal mast cells in irritable bowel syndrome. *Dig Dis Sci*; 38: 1590–1595.

**Wood J.D. (2005):** Histamine, mast cells, and the enteric nervous system in the irritable bowel syndrome, enteritis, and food allergies. *Gut*; 55: 445-447.

**Wu X. Q.,** Ce X.C., Zhou H.F., Rao Y.W., Li A.F., Zang W.J. (1990): The antagonistic effect of selenium on the toxicity of mercury. *Trace Elements in Medicine* 7: 40- 44.

**Yang Z., Marshall J.S. (2009):** Zymosan treatment of mouse mast cells enhances dectin-1 expression and induces dectin-1-dependent reactive oxygen species (ROS) generation. *Immunobiology* 214: 321-330.

## 8 Danksagung

Mein hauptsächlichster Dank geht an meinem Doktorvater Herrn Prof. Dr. Helmut Heinle, welcher ständig und unermüdlich für meine Fragen offen war und von dem ich vieles Lernen durfte. Außerdem bedanke ich mich bei ihm für seine exzellente Betreuung in allen Phasen der Arbeit und für die schöne und tolle Atmosphäre im Labor. Ich danke ihm für seine aufmunternden Worte, wenn ich nicht mehr „weiter“ wusste. Vor allem bedanke ich mich für das „Korrekturlesen“!

Der Firma Steigerwald GmbH, Darmstadt, vor allem Herrn Dr. Dieter Weiser und Herrn Dr. Olaf Kelber, danke ich für die Überlassung der Extrakt-Proben. Ferner danke ich Frau Dr. E. Shumilina für die Überlassung der Mastzellen.

Besonderer Dank gilt auch Herrn Dr. Horst Apfel, Katrin Wald und v.a. meiner Schwester Mona und Michael für die hervorragende Unterstützung bei allen meinen Word- und Excelfragen, den Layoutproblemen und für die Hilfe bei der statistischen Auswertung.

Ferner bedanke ich mich bei allen Mitarbeitern des Physiologischen Instituts für ihre Hilfsbereitschaft in allerlei Angelegenheiten, vom Blutabnehmen bis zu technischen Problemen. V.a. Herrn Uwe Schüler, der immer da war, wenn man ihn gebraucht hat und für seine ausgezeichnete Hilfe bei Computerproblemen und beim gesamten Werkstattteam für die Unterstützung bei allen technischen Problemen.

Mein herzlicher Dank gilt allen meinen Kolleginnen für die angenehme Atmosphäre im Labor und die netten Gespräche in den Mess- und Mittagspausen und die Unterstützung beim Gelingen dieser Arbeit: Herrn Dr. Horst Apfel, Katrin, Karin, Dünya, Victoria, Irina, Dayong, Shopie. Nina Eremic möchte ganz besonders für ihre herzliche Art, für die Interesse am Fortgang meiner Arbeit, für die tollen Gespräche und für die stetige Versorgung mit Kaffee bedanken.

Weiterhin möchte ich mich bei einem der wichtigsten Menschen in meinem Leben bedanken, meinem Freund Michael, der mich immer während meines Studiums und meiner Promotion moralisch und seelisch unterstützt hat und mit seiner Geduld und Liebe mich auch in schwierigen Zeiten aufgemuntert und begleitet hat.

Meiner Schwester Mona gilt dank, für das, was sie ist- meine beste und einzige, unverzichtbare und einzigartige Freundin.

Meinen Eltern Mohammad und Homa Jandaghi gebührt ein ganz besonderer Dank. Ihnen möchte ich auch die Dissertation widmen. Ihnen verdanke ich eine stets strebsame Lebenseinstellung, denn ich kann ohne Übertreibung sagen, dass ich ohne sie nicht soweit gekommen wäre. Sie haben mich in jeder Hinsicht unterstützt und mein Leben mit Verständnis, Liebe und Vertrauen bereichert. Außerdem bedanke ich mich bei meinem Bruder Nima Jandaghi, der immer an mich geglaubt hat.

