

**Wirkungen von pflanzlichen Extrakten
auf murines Ileum:
Untersuchungen zum Reizdarmsyndrom
an *in vitro* Modellen**

DISSERTATION

der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät
der Eberhard Karls Universität Tübingen
zur Erlangung des Grades eines Doktors
der Naturwissenschaften
(Dr. rer. nat.)

vorgelegt von
KATRIN MARIA MERKEL
geb. Wald
aus Kappelrodeck

Tübingen
2010

Tag der mündlichen Prüfung: 14.12.2010

Dekan: Prof. Dr. Wolfgang Rosenstiel

1. Berichterstatter: Prof. Dr. H. Heinle

2. Berichterstatter: Prof. Dr. S. Laufer

**«Wahrlich es ist nicht das Wissen, sondern das Lernen,
nicht das Besitzen, sondern das Erwerben,
nicht das Dasein, sondern das Hinkommen,
was den größten Genuss gewährt.»
(Carl Friedrich Gauß)**

Meinen Eltern

Bisherige Publikationen:

Hagelauer D, Wald K, Kelber O, Weiser D, Laufer S, Heinle H (2008):

Spasmolytische Effekte von STW 5 und seinen Einzelextrakten auf eine durch verschiedene Agonisten gesteigerte Kontraktilität des Ileums der Maus in vitro.

Zeitschrift für Phytotherapie 2008; 29: 24 (Abstract)

Poster auf dem Kongress „Phytopharmaka und Phytotherapie“, Berlin, 14. - 16. Februar 2008

Hagelauer D, Wald K, Kelber O, Weiser D, Laufer S, Heinle H (2008):

Spasmolytic effects of STW 5 and its components on ileal contractions induced by acetylcholine, prostaglandin F_{2α} and substance P.

Planta Medica 2008, 74: 912

Kurzvortrag auf dem “7th Joint Meeting of GA, AFERP, ASP, PSE & SIF”, Athen, 03. – 08. August 2008

Hagelauer D, Wald K, Kelber O, Vinson B, Weiser D, Laufer S, Heinle H (2008):

STW 5 und seine Komponenten wirken spasmolytisch auf eine durch verschiedene Agonisten gesteigerte Kontraktilität des Ileums in vitro.

Z Gastroenterol 2008; 46: 1039

Poster auf der 63. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Verdauungs- und Stoffwechselkrankheiten, Berlin, 01. – 04. Oktober 2008

Wald K, Hagelauer D, Kelber O, Weiser D, Heinle H (2008):

Effects of STW 5, its extracts and isolated components on spontaneous contractions of ileum.

Abstract-Band

Poster auf der Jahrestagung der Deutschen Pharmazeutischen Gesellschaft, Bonn, 08. – 11. Oktober 2008

Wald K, Hagelauer D, Kelber O, Weiser D, Heinle H (2008):

Effects of STW 5 and its components on spontaneous contractions of mouse ileum in vitro.

Neurogastroenterol Motil 2008; 20, Suppl. 1: 59 (Abstract)

Poster auf dem “Joint International Meeting in Neurogastroenterology and Motility“, Luzern, 06. – 09. November 2008

Wald K, Hagelauer D, Vinson B, Kelber O, Weiser D, Heinle H (2009):

Effects of STW 5 and some of its components on spontaneous contractions in mouse ileum in vitro.

Abstract-Band

Poster auf der "Digestive Disease Week", Chicago, 30. Mai – 04. Juni 2009

Wald K, Kelber O, Weiser D, Heinle H (2009):

Effects of plant extracts and their combination on histamine-stimulated intestinal tissue preparations producing ROS.

Abstract-Band

Poster auf dem „13. International Congress Phytopharm“, Bonn, 29. – 31. Juli 2009

Wald K, Kelber O, Weiser D, Laufer S, Heinle H (2009):

Effects of STW 5 and its single extracts on ileal oxygen radical production induced by histamine.

Planta medica 2009, 75: 1015

Poster auf dem 57. Internationalen Kongress und Jahrestagung der Gesellschaft für Arzneipflanzenforschung, Genf, 16. – 20. August 2009

Wald K, Kelber O, Weiser D, Heinle H (2009):

Antioxidative Eigenschaften von STW 5 und seinen Einzelextrakten auf die durch Histamin induzierte Radikalproduktion des Mäuseileums.

Zeitschrift für Phytotherapie 2009, 30, Suppl. 1, S.36

Poster auf dem 7. Berliner Kongress für Phytotherapie, Berlin, 10. – 12. September 2009

Merkel K, Klein K, Jandaghi D, Vinson B, Kelber O, Weiser D, Laufer S, Heinle H (2010): Histamine-induced inflammatory reactions in intestinal mucosa: Inhibition by STW 5.

Neurogastroenterol Motil 2010, im Druck

Poster auf dem "Joint International Meeting in Neurogastroenterology and Motility", Boston, 26. – 29. August 2010

Merkel K, Klein K, Jandaghi D, Vinson B, Kelber O, Weiser D, Laufer S, Heinle H (2010): Histamine-induced inflammatory reactions in intestinal mucosa: Inhibition by STW 5.

Planta Medica 2010, in Druck

Kurzvortrag auf dem 58. Internationalen Kongress und Jahrestagung der Gesellschaft für Arzneipflanzen- und Naturstoffforschung, Berlin, 29. August – 02. September 2010

Klein K, Merkel K, Jandaghi D, Kelber O, Vinson BR, Weiser D, Klessen C, Rammensee HG, Heinle H (2010):

Localisation and pharmacology of Histamin-induced free radical production in small and large intestine.

Abstractband

Kurzvortrag auf der Jahrestagung der Deutschen Pharmazeutischen Gesellschaft, Braunschweig, 04. – 07. Oktober 2010.

1	Einleitung und Fragestellung	1
1.1	Reizdarmsyndrom	1
1.1.1	Definition und Symptome	1
1.1.2	Ätiologie des RDS	2
1.1.3	Anatomie und Physiologie des Ileums	4
1.2	Inflammation, Reaktive Sauerstoffspezies und oxidativer Stress	6
1.2.1	Oxidativer Stress in vivo	6
1.2.2	Entgiftungsmechanismen für ROS	8
1.3	Peristaltik des Ileums	10
1.3.1	Mechanische Funktion des Ileums	10
1.3.2	Kontraktionsmechanismus der glatten Muskulatur	10
1.3.3	Neuronale Steuerung der Darmfunktionen	11
1.4	Therapie des RDS	13
1.5	Fragestellung	16
2	Material	17
2.1	Geräte	17
2.2	Chemikalien	18
2.3	STW 5 und seine Einzelextrakte	20
2.4	Lösungen	21
2.5	Biologische Materialien	24
3	Methoden	25
3.1	Gewinnung der Gewebe-Präparate	25
3.1.1	Gewebe für die Versuche zur Messung der Radikalbildung	25
3.1.2	Gewebe für die Versuche zur Kontraktionsmessung	25
3.2	Messung der Histamin-induzierten Radikalbildung mittels Luminol-verstärkter Chemilumineszenz	26
3.2.1	Reaktionsansatz	26
3.2.2	Messung und Auswertung	27
3.2.3	Kontrollmessungen	28
3.3	Histologische Charakterisierung der Präparate	29
3.3.1	Hämatoxylin-Eosin-Färbung (HE-Färbung)	29
3.3.2	Immunohistochemische Markierungen	29

3.4	Messung der Darmkontraktionen	31
3.4.1	Messaufbau.....	31
3.4.2	Einfluss der Extrakte auf spontane Kontraktionen der Ileumpräparate.....	32
3.4.3	Einfluss der Extrakte auf durch Kaliumchlorid und Acetylcholin stimulierte Kontraktionen der Ileumpräparate.....	34
3.5	Statistik	37
4	Ergebnisse	38
4.1	Radikalfangende Eigenschaften von STW 5 und seinen Komponenten 38	
4.1.1	Charakterisierung der Histamin-induzierten Radikalbildung des Ileums	38
4.1.1.1	Stimulation der Radikalproduktion von Tela submucosa durch Histamin	39
4.1.1.2	Korrelation von Gewebe-Masse und Ausmaß der Radikalproduktion	41
4.1.1.3	Messungen mit dem CL-Indikator Lucigenin.....	42
4.1.1.4	Messungen in kaliumreicher Tyrode-Lösung	44
4.1.1.5	Einfluss von Histaminrezeptor-Antagonisten auf die Histaminstimulation	46
4.1.2	Effekte von STW 5 und seinen Einzelextrakten auf die durch Histamin stimulierte Radikalproduktion	47
4.1.3	Effekte von ausgewählten Substanzen auf die durch Histamin stimulierte Radikalproduktion	49
4.1.4	Histologische Charakterisierung der Darmpräparate	50
4.1.4.1	Hämatoxylin-Eosin-Färbungen (HE-Färbung).....	50
4.1.4.2	Immunohistochemische Färbungen: CD-Markierungen.....	52
4.1.4.3	Immunohistochemische Färbungen: alpha-Aktin-Färbung (α A-Färbung)	57
4.2	Kontraktionsmodulierende Eigenschaften von STW 5 und seinen Komponenten	58
4.2.1	Effekte von STW 5, seinen Einzelextrakten sowie ausgewählten Inhaltsstoffen auf die spontane Peristaltik	58
4.2.2	Effekte von STW 5, seinen Einzelextrakten sowie ausgewählten Inhaltsstoffen auf induzierte Kontraktionen.....	62
4.2.2.1	Stimulation der Ileumpräparate durch Kaliumchlorid [90 mM]	62
4.2.2.2	Stimulation der Ileumpräparate durch Acetylcholin [100 μ M].....	64

5	Diskussion	66
5.1	RDS, oxidativer Stress, Entzündung und Histamin	66
5.1.1	RDS – funktionelle oder entzündliche Erkrankung?	66
5.1.2	Modelle zur Untersuchung der Pathogenese des RDS	68
5.1.3	Histamin-induzierte ROS-Sekretion als Modell für RDS	71
5.1.4	Effekte von STW 5, seinen Einzelextrakten sowie ausgewählten Inhaltsstoffen auf die durch Histamin stimulierte Radikalproduktion.....	75
5.2	RDS und gestörte Darmmotilität	78
5.2.1	Effekte von STW 5, seinen Einzelextrakten sowie ausgewählten Inhaltsstoffen auf spontane rhythmische Kontraktionen	78
5.2.2	Effekte von STW 5, seinen Einzelextrakten sowie ausgewählten Inhaltsstoffen auf durch Membran-Depolarisation induzierte Kontraktionen	80
5.2.3	Effekte von STW 5, seinen Einzelextrakten sowie ausgewählten Inhaltsstoffen auf durch Acetylcholin stimulierte Kontraktionen	81
6	Zusammenfassung	83
7	Literaturverzeichnis	87

Abkürzungsverzeichnis

ACh	Acetylcholin
Ang	Anglicae radix (Angelikawurzel)
ATP	Adenosin-Triphosphat
AUC	Area under the curve
BSC	<i>N</i> -Butylscopolamin-Bromid
CL	Chemilumineszenz
COX	Cyclooxygenase
DNA	Desoxyribonukleinsäure
ENS	Enterisches Nervensystem
GIT	Gastrointestinaltrakt
GSH	Glutathion
His	Histamin
Ibe	<i>Iberis amara</i>
Kam	Matricariae flos (Kamillenblüten)
Küm	Carvi fructus (Kümmelfrüchte)
LOX	Lipoxygenase
Mar	Cardui mariae fructus (Mariendistelfrüchte)
Mel	Melissae folium (Melissenblätter)
mRNA	messenger-Ribonukleinsäure
MW	Mittelwert
NSS	Normal swine serum
Pfe	Menthae piperitae folium (Pfefferminzblätter)
RDS	Reizdarmsyndrom
ROS	Reaktive Sauerstoffspezies
Schö	Chelidonii herba (Schöllkraut)
SD	Standardabweichung
SOD	Superoxiddismutase
Süß	Liquiritiae radix (Süßholzwurzel)
ZNS	Zentrales Nervensystem

1 Einleitung und Fragestellung

1.1 Reizdarmsyndrom

1.1.1 Definition und Symptome

Das Reizdarmsyndrom (RDS) zählt zu den funktionellen Erkrankungen des unteren Verdauungstraktes. In der westlichen Bevölkerung ist das RDS mit einer Prävalenz von etwa 20 % eine der häufigsten Ursachen für die Konsultation eines Gastroenterologen (Thompson, 2006), wobei Frauen etwa doppelt so häufig betroffen sind wie Männer (Longstreth et al, 2006).

Zu den Symptomen, die einzeln, aber meist in verschiedenen Kombinationen auftreten können, zählen veränderte Stuhlgewohnheiten wie Diarrhöe und/oder Obstipation, abdominale Schmerzen und Krämpfe sowie Völlegefühl und Blähungen. Hinzu kommt häufig eine von der Nahrungsaufnahme unabhängige erniedrigte Reizschwelle für Dehnungsreize aus dem Magen-Darm-Trakt.

Die beschriebenen Beschwerden sollen nach obiger Definition funktionell bedingt sein und nicht durch organisch fassbare Veränderungen verursacht werden. Allerdings soll hier schon auf die Problematik dieser Definition hingewiesen werden, denn häufig, bspw. bei Inflammationen, ist der Übergang von gestörter Funktion („funktionell“) und zellulärer Gewebeveränderung fließend und nicht klar abgrenzbar.

Die Diagnose erfolgt nach Ausschluss organischer Erkrankungen entsprechend den ROME-III-Leitlinien (Stand: 2006), nach denen der Patient mindestens sechs Monate an einigen der genannten Symptomen leidet und diese an mindestens 3 Tagen pro Monat über 3 zusammenhängende Monate auftreten (Drossmann and Dumitrascu, 2006). Die verschiedenen Subtypen gliedern sich nach den veränderten Stuhlgewohnheiten (Longstreth et al., 2006).

1.1.2 Ätiologie des RDS

Die Symptome des RDS kommen hauptsächlich durch eine gestörte Motilität, Veränderungen der Sekretions- und Resorptionsvorgänge sowie durch eine gesteigerte Schmerzwahrnehmung (Hypersensitivität) zustande. Die kausalen Zusammenhänge sind derzeit jedoch noch nicht eindeutig geklärt. Es werden verschiedene Mechanismen in Betracht gezogen, die zu den typischen Beschwerden führen können.

Zunächst können Ursachen definiert werden, die vom Darminhalt her wirksam sind; hierzu gehören Nahrungsmittelunverträglichkeiten und Veränderungen der Darmflora (Whorwell, 2007; Codling et al., 2010, Barbara et al, 2008) sowie abgeklungene bakterielle Infektionen, die durch verschiedene Keime wie *Campylobacter jejuni* oder *Escherichia coli* verursacht wurden (Spiller and Garsed, 2009).

Diese Faktoren führen zu allergischen oder inflammatorischen Reaktionen, die in der Darmwand selbst Störungen der Sekretions- und Resorptionsvorgänge sowie der Peristaltik verursachen. Hier können auch neuronale Veränderungen innerhalb des darmassoziierten enterischen Nervensystems (ENS), aber auch zwischen ENS und efferenten Zielzellen wie glatter Muskulatur, Mucosazellen oder Zellen des Immunsystems Funktionsänderungen hervorrufen, beispielsweise die für RDS-Patienten typische erhöhte Schmerzempfindlichkeit (Akbar et al, 2008; Wood, 2004; Gebhart, 2000).

In neueren Untersuchungen wird zunehmend auf die Bedeutung entzündlicher Zellen in der Pathogenese des RDS hingewiesen, die sowohl die Motilität als auch die Nozizeption der Darmwand beeinflussen können (Spiller and Garsed, 2009). Eine besondere Rolle scheinen dabei Mastzellen zu spielen, die einerseits durch den Mediator Histamin stimuliert werden, andererseits diesen auch freisetzen können. Da sowohl Leukozyten als auch Mastzellen reaktive Sauerstoffspezies sezernieren, ist anzunehmen, dass oxidativer Stress eine wichtige Komponente in der Pathogenese des RDS darstellt.

Eine übergeordnete Rolle in der Entstehung des RDS besteht in der Modulation der Darmfunktionen durch das zentrale Nervensystem (ZNS), das durch parasymphatische und sympathische Bahnen mit dem ENS verbunden ist. (Talley, 2006).

Neuerdings weisen Studien auf genetische Prädispositionen hin, die möglicherweise die Entwicklung eines RDS begünstigen (Saito et al, 2010; Kapeller et al, 2008), doch ist über deren phänotypische Expression noch nichts bekannt.

In der Regel treten mehrere dieser Faktoren bei den einzelnen Patienten gemeinsam auf, weshalb man von einer multifaktoriellen Pathogenese des RDS ausgehen kann.

Das RDS kann sowohl den Dünndarm ebenso wie den Dickdarm betreffen, daher wurde in der vorliegenden Arbeit terminales Ileum untersucht, dessen Aufbau und Funktion im Folgenden erläutert werden sollen.

1.1.3 Anatomie und Physiologie des Ileums

Das Ileum (dt. Krummdarm) ist der distale, beim Menschen 2-3 m lange Teil des Dünndarms. Zu seinen Aufgaben zählen Durchmischung und Transport des Chymus, Sekretion verschiedener Verdauungssäfte sowie Resorption von Vitamin B₁₂ und aufgespaltener Nahrungsbestandteile.

Diese Vorgänge werden durch die verschiedenen funktionellen Schichten der Wand des Dünndarms ermöglicht (Abb. 1):

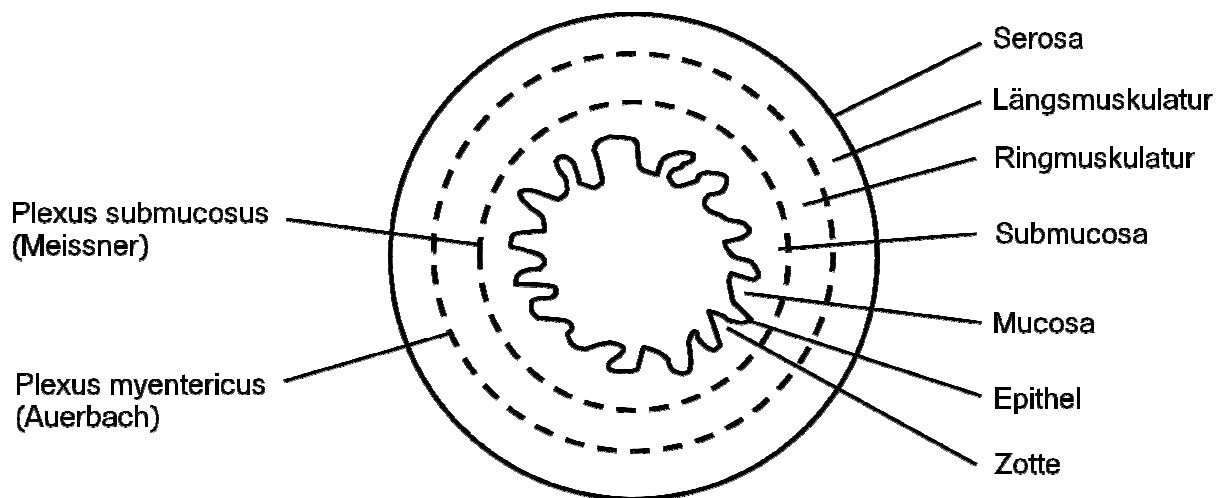


Abb. 1: Schematische Darstellung der Dünndarmwand (Querschnitt). (nach Voss und Herrlinger, 1974, S. 61).

Zum Lumen hin befindet sich die Schleimhaut (Mucosa), die aus einem einschichtigen Epithel (Lamina epithelialis mucosae), Bindegewebe (Lamina propria mucosae) und einer dünnen Muskelschicht (Lamina muscularis mucosae) zusammengesetzt ist. Sie ist in sog. Zotten aufgefaltet, welche die Resorptionsfläche des Darms vergrößern.

Die Submucosa (Tela submucosa) bildet als weitere Bindegewebsschicht den Übergang zur für die Peristaltik des Ileums nötigen glatten Muskulatur, innerhalb der Submucosa ist auch ein Teil des ENS, der Plexus submucosus (Plexus Meissner) lokalisiert. Die Muskelschicht (Tunica muscularis) gliedert sich in Ring- und Längsmuskulatur (Stratum circulare, Stratum longitudinale), dazwischen befindet sich der zweite Teil des ENS, der Plexus myentericus (Plexus Auerbach). Zum

Bauchraum hin ist der Darm abschließend von der aus Bindegewebe bestehenden Serosa überzogen.

Das den gesamten Magen-Darm-Trakt durchziehende ENS, das hauptsächlich aus den zwei großen Nervenkernen Plexus submucosus und Plexus myentericus besteht, ist für die Erfüllung der physiologischen Aufgaben des Ileums essentiell. Während der Plexus submucosus vorwiegend Sekretions- und Resorptionsvorgänge in der Schleimhaut steuert, regulieren die Nervenzellen des Plexus myentericus die peristaltische Motilität der glatten Muskulatur.

Beide Plexus sind untereinander vielfach neuronal verbunden. Über afferente und efferente Bahnen, letztere gehören zu Parasympathikus und Sympathikus, steht das ENS auch in engem Kontakt mit dem ZNS.

Während die Struktur der Zotten in aboraler Richtung des Ileums immer weniger ausgeprägt ist und somit die Resorption von Nahrungsbestandteilen in den Hintergrund tritt, nimmt die Bedeutung des Ileums als Teil des Immunsystems zu. In tieferen Schichten der Schleimhaut finden sich zahlreiche T-Zellen sowie Mastzellen, in der Lamina propria mucosae kommen außer den solitären Zellen Ansammlungen von Lymphfollikeln, sogenannte Peyer-Plaques, vor. Diese bestehen aus einer großen Anzahl an B- und T-Zellen sowie dendritischen Zellen.

Somit zeigt die gesunde Schleimhaut des Ileums viele Merkmale einer chronischen Entzündungsreaktion; die große Zahl an vorhandenen Lymphozyten kämpft permanent gegen Unmengen von Antigenen, die über die Nahrung in den Darm gelangen (Murphy et al, 2009) bzw. durch die Darmflora präsentiert werden.

1.2 Inflammation, Reaktive Sauerstoffspezies und oxidativer Stress

Wie bereits erwähnt legen aktuelle Untersuchungen nahe, dass Inflammation an der Entstehung von RDS beteiligt ist (Spiller and Garsed, 2009; Akiho et al, 2005; Barbara et al, 2002). Obwohl die Entzündungsreaktion ein komplexes pathophysiologisches Geschehen darstellt, dürfte dabei oxidativem Stress, d.h. der verstärkten Bildung von freien reaktiven Sauerstoffmetaboliten (reactive oxygen species, ROS), eine bedeutende vermittelnde Rolle zukommen. Zudem konnte von Hagelauer (2007) gezeigt werden, dass ROS auch direkt die Motilität des Ileums beeinflussen können.

Eine Übersicht über die Zusammenhänge zwischen oxidativem Stress und den durch ihn induzierten pathophysiologischen Prozessen wird im Folgenden dargestellt.

1.2.1 Oxidativer Stress in vivo

Zu den ROS zählen unter anderen das Hydroxylradikal OH^\bullet , das Superoxidradikal $\text{O}_2^{\bullet-}$, Peroxylradikale ROO^\bullet und Wasserstoffperoxid H_2O_2 . Sie werden in fast allen aeroben Zellen innerhalb des normalen Stoffwechsels als physiologische Metabolite gebildet. Wichtigste ROS-Quellen sind dabei die Atmungskette und die NADPH-Oxidase, des Weiteren der Purinabbau (Xanthinoxidase), die Autoxidation von Catecholaminen oder Glutathion und verschiedene freie Enzyme wie Oxidasen, Cyclooxygenasen und Lipoxygenasen.

Als Intermediate des Stoffwechsels haben sie vielerlei physiologische Bedeutung: ROS sind beteiligt an Biosynthesen, so bei der Hydroxylierung von L-Prolin im Rahmen der Kollagensynthese, aber auch im Arachidonsäure-Stoffwechsel bei der Synthese von Prostaglandinen und Leukotrienen (Laufer, 2002).

Sie aktivieren die Transkription verschiedener Gene, beispielsweise Transkriptionsfaktoren der NF- κ B-Familie, welche wiederum die Transkription von mRNA proinflammatorischer Zytokine wie $\text{TNF}\alpha$, IL-1 β , IL-2 und IL-6 aktivieren (Halliwell and Gutteridge, 2007).

Des Weiteren erfüllen ROS Messenger-Funktion innerhalb der Zelle und untereinander bei Proliferations- und Apoptosevorgängen (Kohen and Nyska, 2002; Irani 2000).

Im Zusammenhang mit Entzündung tragen ROS zur Abwehr von Krankheitserregern bei: Leukozyten produzieren mit Hilfe der NADPH-Oxidase und der Myeloperoxidase große Mengen ROS („respiratory burst“), durch die die phagozytierten Krankheitserreger abgetötet werden (Magder, 2006).

Pathophysiologisch führen erhöhte ROS-Spiegel zu Schäden an allen intra- und extrazellulären makromolekularen Substanzklassen.

Durch Peroxidation ungesättigter Fettsäuren in der Zellmembran verändert sich die Membranfluidität, was zu Fehlfunktionen von Kanalproteinen und Rezeptoren führen kann.

Proteine können durch ROS an oxidationsempfindlichen Aminosäuren wie Histidin und Tryptophan oxidiert und modifiziert werden, was ebenso wie die Bildung von Disulfidbrücken mit Cystein häufig zu Funktionsverlust führt.

Durch ROS verursachte Schäden an der DNA zeigen sich nach Reaktion mit der Desoxyribose in Einzel- und Doppelstrangbrüchen sowie in Mutationen und Fehlpaarungen, die durch Oxidation der Basen zustande kommen, vorwiegend durch Bildung von 8-Oxo-Guanin, aber auch durch Oxidation von Thymin zu Thyminglycol.

Verschiebt sich das Gleichgewicht aus Produktion und Elimination der ROS zugunsten der Produktion, spricht man von oxidativem Stress (Kohen and Nyska, 2002). Zu den Ursachen, die zu dieser Verschiebung führen, gehören prooxidative Prozesse wie Entzündungen, Infektionen, verschiedene Erkrankungen, aber auch exogene Faktoren wie Arzneimittel- und Alkoholkonsum (Halliwell and Gutteridge, 2007). Andererseits kann auch eine Verminderung der antioxidativen Kapazitäten der Zelle, beispielsweise aufgrund eines Gendefektes, zu oxidativem Stress führen (Dalle-Donne et al, 2006).

1.2.2 Entgiftungsmechanismen für ROS

Zur Entgiftung der ROS stehen den Zellen verschiedene enzymatische Systeme sowie direkte radikalfangende Antioxidantien zur Verfügung (Abb. 2).

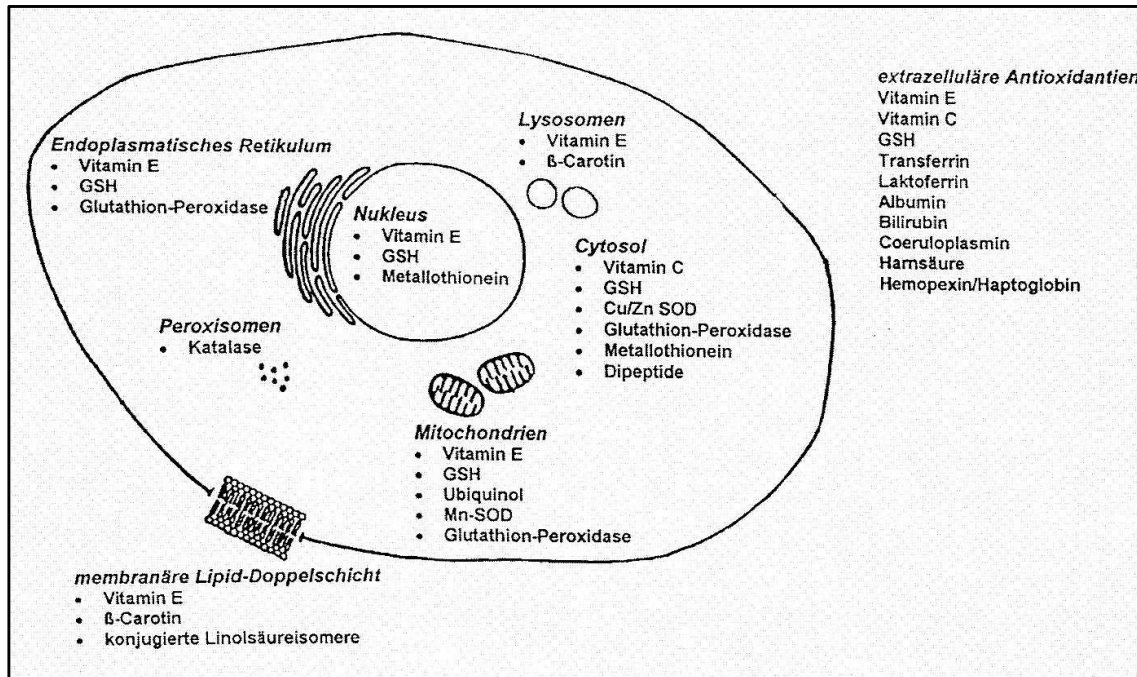


Abb. 2: Übersicht der antioxidativen Schutzsysteme (Siems et al, 2005, Abb. 1-5, S. 21).

Die enzymatische Beseitigung wird eingeleitet von der Superoxid-Dismutase (SOD), die die Umwandlung von Superoxidradikalen unter Bildung von Wasserstoffperoxid und Sauerstoff katalysiert. Wasserstoffperoxid wird anschließend entweder von der Katalase zu Wasser und Sauerstoff umgewandelt, oder durch die Glutathion-Peroxidase reduziert, wobei ebenfalls Wasser entsteht und Glutathion (GSH) zu GS-SG oxidiert wird.

Zu den direkt antioxidativ wirkenden Molekülen gehören endogene Substanzen wie GSH, Harnsäure sowie Coenzym Q10. Exogen sind Vitamin C, Vitamin E und β -Carotine die prominentesten Antioxidantien. Sie eliminieren die Radikale direkt, indem sie selbst oxidiert werden. Die Regeneration der oxidierten Form erfolgt im Cytoplasma über Oxidation von GSH und anschließender vollständiger Entgiftung durch die NADPH-abhängige Glutathion-Reduktase.

Besondere Beachtung finden sekundäre Pflanzenstoffe, die antioxidative Eigenschaften besitzen. Zu dieser großen Gruppe der Polyphenole gehören u.a. Flavonoide, Gerbstoffe und polyfunktionelle Carbonsäuren sowie Cumarinderivate.

Zu den stärksten pflanzlichen Antioxidantien gehören Anthocyane und Proanthocyanidine aus der Gruppe der Flavonoide. Durch die phenolischen Hydroxylgruppen bieten sie einerseits direkten Schutz vor Oxidation und verstärken durch Regeneration andere Antioxidantien wie Vitamin C und E (Graf et al, 2005), andererseits haben sie dadurch auch die Fähigkeit Übergangsmetallionen (Fe^{2+} , Cu^{2+}) zu komplexieren und so die Entstehung von durch die Haber-Weiss-Reaktion bedingten oxidativem Stress zu verhindern.

Viele häufige Erkrankungen wie Atherosklerose (Chisolm and Steinberg, 2000), Diabetes mellitus (Piconi et al, 2003), Morbus Parkinson (Tieu et al, 2003) und Krebs (Cerutti, 1994) werden im Zusammenhang mit den pathophysiologischen Auswirkungen von oxidativem Stress gesehen.

Auch zur Pathogenese von entzündlichen Darmerkrankungen sollen erhöhte ROS-Spiegel beitragen (Grisham 1994). Beim RDS finden subklinisch entzündliche Vorgänge statt, die in engem Zusammenhang mit oxidativem Stress stehen, weshalb in dieser Arbeit ein Modell für oxidativen Stress am Ileum der Maus entwickelt werden sollte.

1.3 Peristaltik des Ileums

Der Transport des Chymus durch peristaltische Kontraktionen gehört zu den essentiellen Funktionen des Ileums. Da Störungen der Peristaltik auch zu den Symptomen des RDS gehören, die durch STW 5 beeinflusst werden, soll kurz auf diese mechanische Darmfunktion eingegangen werden.

1.3.1 Mechanische Funktion des Ileums

Die Peristaltik des Ileums umfasst phasische und tonische Kontraktionen, die den Speisebrei durchmischen und weitertransportieren. Die phasischen Kontraktionen setzen sich zusammen aus propulsiven, nicht-propulsiven und retrograden Kontraktionen sowie Pendelbewegungen, die aus einem Wechsel von An- und Entspannung benachbarter Muskelzellen entstehen. Punktuell stattfindende tonische Kontraktionen schnüren kleine intestinale Kompartimente ab, in denen verschiedene Verdauungsvorgänge parallel ablaufen können.

1.3.2 Kontraktionsmechanismus der glatten Muskulatur

Die Ring- und Längsmuskulatur des Magen-Darm-Traktes besteht aus glatter Muskulatur. Innerhalb der glatten Muskelzelle sind die Filamente nicht in Sarkomeren angeordnet, d.h. dass die Aktinfilamente also nicht durch Z-Streifen, sondern durch „dense bodies“ („Verdichtungszone“) verbunden sind, die eine stärkere Verkürzung der Muskelzelle ermöglichen, als es bei der quergestreiften Muskelzelle der Fall ist.

Induziert werden die Kontraktionen der Muskelzelle durch elektromechanische sowie durch pharmakologische Kopplung. Erstere wird über spannungsabhängige Calcium-Kanäle in der Plasmamembran vermittelt, letztere durch eine Vielzahl von Agonisten. Beide Mechanismen resultieren letztendlich in einer Erhöhung der cytoplasmatischen Calcium-Konzentration. Es bildet sich ein Calcium-Calmodulin-Komplex, der die Phosphorylierung der Myosin-leichten Ketten durch die entsprechenden Kinasen und unter ATP-Verbrauch einleitet. Dies erlaubt schließlich die Querbrückenzyklen zwischen Aktin und Myosin und somit die Kontraktion.

Um in der Peristaltik die Kontraktionen der einzelnen Muskelzellen zu synchronisieren, werden Potenzialwellen ausgesendet, die die Muskelzellen koordiniert erregen. Die Schrittmacherzellen, auch als interstitielle Cajal-Zellen bezeichnet, haben eine sehr niedrige Erregungsschwelle und leiten die Depolarisation über gap junctions an die umliegenden Muskelzellen weiter, wo sie Aktionspotentiale und somit Kontraktionen auslösen. Die Wellen werden aboral weitergeleitet und versiegen nach einer gewissen Strecke, weiter distal liegende Schrittmacherzellen lösen neue Depolarisationswellen aus.

Diese Aktivierung der Darmmuskulatur ist myogener Natur, doch es gibt auch reflektorische und zentrale Impulse, die die Peristaltik kontrollierten.

1.3.3 Neuronale Steuerung der Darmfunktionen

Das enterische Nervensystem (ENS), das etwa gleich viele Neurone enthält wie das Rückenmark, steuert weitgehend autonom sämtliche Verdauungsvorgänge des Magen-Darm-Traktes.

Um die myogene Spontanrhythmik der Peristaltik aktuellen Anforderungen anzupassen, sind dieser komplexe neuronale Regelmechanismen überlagert, welche einerseits im schon erwähnten ENS, andererseits in Teilen des vegetativen Nervensystems verankert sind.

Das grundlegende Funktionsprinzip liegt dabei in Reflexbögen, die ihren Ursprung in einer Vielzahl von mechanischen, chemischen sowie nozizeptiven Sensoren in der Darmwand haben. Sie schalten noch innerhalb der Darmwand über Interneurone direkt zu efferenten, die Darmfunktion steuernden Neuronen um.

Diesen „kurzen“ Reflexbögen stehen „lange“ Reflexbögen gegenüber, bei denen die afferenten Informationen meist über den Nervus vagus zum Nucleus tractus solitarius in den Hirnstamm gelangen. In diesem zentralen Reflexzentrum erfolgt die Umschaltung auf parasympathische, evtl. auch sympathische Efferenzen, die somit eine zweite Ebene der Steuerung darstellen. Bemerkenswert ist in diesem Zusammenhang, dass periphere, darmorientierte Nerven zu 90 % afferente, sensible und nur ca. 10 % efferente Neurone enthalten.

Schließlich tragen auch übergeordnete Zentren wie beispielsweise der Hypothalamus und das limbische System zur Modulation der Verdauungsvorgänge

bei. Diese Ebene der Kommunikation zwischen dem ZNS und dem Gastrointestinaltrakt bietet einen möglichen Ansatz zum Verständnis der Tatsache, dass psychosoziale Probleme wie Stress viele gastrointestinale Symptome verschlimmern können (Mayer et al, 2001).

1.4 Therapie des RDS

Die Therapie des RDS richtet sich nach den individuellen Symptomen, da aufgrund der multifaktoriellen Pathogenese keine kausale Therapie möglich ist. Es werden also Laxantien bei Obstipation, Antidiarrhoika bei Diarrhöe, Muskelrelaxantien bei Krämpfen und viele weitere Arzneimittel angewendet, die den vielfältigen Beschwerdekplexen der RDS-Patienten oft nur kurzzeitig oder unzureichend Erleichterung verschaffen (Camilleri and Andresen, 2009).

Zu den typischen, beim RDS indizierten Arzneimitteln gehören je nach Subtyp Antidiarrhoika wie Loperamid oder Laxantien wie Lactulose, Macrogol oder Bisacodyl. Blähungen werden mit Simeticon erfolgreich behandelt, Pre- und Probiotika können zur Stabilisierung der Darmflora eingenommen werden (McFarland and Dublin, 2008). Abdominelle Schmerzen und Krämpfe werden mit den Spasmolytika *N*-Butylscopolaminbromid und/oder Mebeverin therapiert.

Trizyklische Antidepressiva sollen sowohl die Schmerzempfindlichkeit, als auch Sekretion und Motilität normalisieren (Rahimi et al, 2009), auch selektive Serotonin-Reuptake-Hemmer können sich positiv auf den Krankheitsverlauf auswirken (Ford et al, 2009).

Neben den klassischen Medikamenten stehen auch verschiedene Phytotherapeutika zur Verfügung, so hat sich die pflanzliche Mehrkomponentenmischung Iberogast® (STW 5) in einer klinischen Studie und diversen Anwendungsbeobachtungen beim RDS bewährt (Madisch et al, 2004; Klein-Galczinsky und Sassin, 1999). Im Sinne einer Multi-Target-Therapie bieten die einzelnen Arzneipflanzenextrakte in der Summe ein breites Wirkungsspektrum (Wagner, 2006), des Weiteren kann das Nebenwirkungsrisiko durch geringere Dosierung der Einzelextrakte gesenkt werden. Seitens der Patienten nehmen Phytopharmaka in der Therapie chronischer Erkrankungen einen hohen Stellenwert ein, was zu einer guten Compliance bei vergleichsweise geringen Kosten führt.

STW 5 ist ein Kombinationspräparat aus ethanolischen Drogenextrakten von Angelikawurzel, Kamillenblüten, Kümmelfrüchten, Mariendistelfrüchten, Melissenblättern, Pfefferminzblättern, Schöllkraut und Süßholzwurzel sowie eines Frischpflanzenausuges von *Iberis amara*. Die speziellen Effekte der einzelnen Extrakte sind in Tab. 1 erläutert.

Zahlreiche Studien belegen bereits modulierende Effekte von STW 5 auf die Kontraktilität des Gastrointestinaltraktes (GIT) (Michael et al, 2009; Hagelauer, 2007; Heinle 2006). Ebenso gibt es Untersuchungen an verschiedenen Testmodellen zur antioxidativen Wirkung von STW 5 (Schempp et al, 2006; Germann et al, 2006). Diese wurden bisher jedoch noch nicht direkt an intestinalem Gewebe beschrieben.

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

Tab. 1: Übersicht über die Effekte der Einzelextrakte aus STW 5 auf den Gastrointestinaltrakt. (Monographie der Kommission E Angelikawurzel, 1990; Monographie der Kommission E Kamillenblüten, 1990; Monographie der Kommission E Kümmelfrüchte, 1990; Monographie der Kommission E Mariendistel Früchte, 1986; Monographie der Kommission E Melissenblätter, 1990; Monographie der Kommission E Pfefferminzblätter, 1990; Monographie der Kommission E Schöllkraut, 1985; Monographie der Kommission E Süßholzwurzel, 1991; Reichling and Saller, 2002; Wegener and Wagner, 2006)

1.5 Fragestellung

Ausgehend von den vorgestellten verschiedenen pathogenen Mechanismen des RDS, sollten in dieser Arbeit zwei unterschiedliche Fragestellungen zur Wirkungsweise von STW 5 und seinen Einzelextrakten untersucht werden:

- 1) Können die antioxidativen bzw. radikalfangenden Eigenschaften der pflanzlichen Extrakte auch an einem darmrelevanten Modell für oxidativen Stress bestätigt werden?

Dazu sollte zunächst ein aussagekräftiges Testsystem entwickelt werden, bei dem oxidativer Stress in der Darmwand induziert und untersucht werden kann. Nachdem Vorarbeiten gezeigt hatten, dass dies an einem aus Tela submucosa bestehenden Darmwandpräparat durch Stimulation mit Histamin gelang, sollte dieses Modell weiter charakterisiert und daran STW 5 und seine Einzelkomponenten auf ihre antioxidativen Eigenschaften überprüft werden.

- 2) Können die spasmolytischen Wirkungen auch dann bestätigt werden, wenn die Ileumkontraktionen unter pathophysiologisch verstärkter Agonistenwirkung induziert werden?

Dazu sollte die glatte Muskulatur von Ringpräparaten des Ileums entweder durch starke Depolarisation mit erhöhter Kalium-Konzentration oder durch hohe Acetylcholin-Konzentration stimuliert und die Effekte von STW 5 und den Einzelextrakten auf das kontraktile Verhalten beobachtet werden.

2 Material

2.1 Geräte

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

Gefriermikrotom HM 550, Microm, Walldorf

Gefriermikrotom HM 560, Microm, Walldorf

Kraftaufnehmer SG3-0.25, SWEMA, Stockholm, Schweden

Magnetrührer IKAMAG REO, Staufen

Messkraftverstärker MGCplus, Hottinger Baldwin Messtechnik, Darmstadt

Multibiolumat LB 9505C (6 Kanäle), Berthold Technologies, Bad Wildbad

Operationsbinokular mit Beleuchtungseinheit, Zeiss, Oberkochen

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

PowerLab 4/25T, ADInstruments, Spechbach

Stativpumpe ISM 853 Ismatec, Glattbrugg-Zürich, Schweiz

Thermostat Colora, Lorch

Ultraschallbad Sonorex 1RK100, Bandelin Electronic, Berlin

Vortex-Genie, Bender und Hohbein, Zürich, Schweiz

Waage AC 100, Mettler, Gießen

Waage BP 121 S, Sartorius, Göttingen

2.2 Chemikalien

Acetylcholinchlorid ($C_7H_{16}NO_2Cl$), Sigma-Aldrich, Steinheim

α -Bisabolol ($C_{15}H_{26}O$), Roth, Karlsruhe

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

(+)-Carvon ($C_{10}H_{14}O$), Roth, Karlsruhe

Chlorogensäure ($C_{16}H_{18}O_9$), Sigma-Aldrich, Steinheim

Citral cis/trans-Gemisch ($C_{10}H_{16}O$), Sigma-Aldrich, Steinheim

(\pm)-Citronellal ($C_{10}H_{18}O$), Roth, Karlsruhe

Clobenpropitdihydrobromid ($C_{14}H_{17}ClN_4S \times 2 HBr$), Sigma-Aldrich, Steinheim

Eosin-Lösung wässrig 0,1%, Chroma, Münster

Ethanol absolut zur Analyse (C_2H_5OH), Merck, Darmstadt

Famotidin ($C_8H_{15}N_7O_2S_3$), Sigma-Aldrich, Steinheim

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

Hämalaun-Lösung sauer, Mayer, Chroma, Münster

HEPES-Pufferan (*N*-2-Hydroxyethylpiperazin-*N'*-2-ethansulfonsäure, $C_8H_{18}N_2O_4S$),
Roth, Karlsruhe

Histamin-Dihydrochlorid (2-(4-Imidazolyl)ethylamin-Dihydrochlorid,

$C_5H_9N_3 \times 2 HCl$), Sigma-Aldrich, Steinheim

Histogreen[®], Linaris, Wertheim-Bettingen

Kaffeensäure (3,4-Dihydroxycimtsäure, $C_9H_8O_4$), Sigma-Aldrich, Steinheim

Kaliumchlorid (KCl), Roth, Karlsruhe

Kämpferol (3,5,7,4'-Tetrahydroxyflavon, $C_{15}H_{10}O_6$), Sigma-Aldrich, Steinheim

Lucigenin (*N,N'*-Dimethyl-9,9'-Bisacridin-Nitrat, $C_{28}H_{22}N_4O_6$), Streva, Heidelberg

Luminol (5-Aminophthalhydrazid, $C_8H_7N_3O_2$), Merck, Darmstadt

Magnesiumsulfat-Heptahydrat ($MgSO_4 \times 7 H_2O$), Roth, Karlsruhe

(-)-Menthol ($C_{10}H_{20}O$), Roth, Karlsruhe

(-)-Menthon ($C_{10}H_{18}O$), Roth, Karlsruhe

Natriumchlorid (NaCl), Roth, Karlsruhe

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

Natriumhydroxid (NaOH), Roth, Karlsruhe

N-Butylscopolaminbromid ($\text{C}_{21}\text{H}_{30}\text{NO}_4\text{Br}$), Sigma-Aldrich, Steinheim

Pyrilaminmaleat ($\text{C}_{17}\text{H}_{23}\text{N}_3\text{O}$), Sigma-Aldrich, Steinheim

R-(+)-Limonen ($\text{C}_{10}\text{H}_{16}$), Sigma-Aldrich, Steinheim

anti xylgG-Biotin, GE Healthcare, München

Rabbit anti alpha smooth muscle aktin, Abcam, Cambridge, Großbritannien

Rat anti mouse CD31, BD Pharmingen, Franklin Lakes (NJ), USA

Rat anti mouse CD4, Abcam, Cambridge, Großbritannien

Rat anti mouse CD68, BD Pharmingen, Franklin Lakes (NJ), USA

Rat anti mouse CD8, Abcam, Cambridge, Großbritannien

Rosmarinsäure ($\text{C}_{18}\text{H}_{16}\text{O}_8$), Sigma-Aldrich, Steinheim

Streptavidin-horseradish Peroxidase, GE Healthcare, München

Tissue-Tek[®], Sakura, Staufen

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

Wasserstoffperoxid-Lösung (H_2O_2) 30%, Roth, Karlsruhe

2.3 STW 5 und seine Einzelextrakte

Sämtliche pflanzlichen Extrakte einschließlich STW 5 wurden von der Firma Steigerwald Arzneimittel GmbH (Darmstadt) zur Verfügung gestellt.

STW 5 ist ein Phytotherapeutikum, dessen Wirksamkeit beim RDS durch zahlreiche klinische und pharmakologische Studien belegt sind (Rösch et al, 2002; Madisch et al, 2004; Gundermann et al, 2004).

Die Mischung besteht aus acht wässrig-alkoholischen Extrakten aus Drogen von Angelikawurzel, Kamillenblüten, Kümmelfrüchten, Mariendistelfrüchten, Melissenblättern, Pfefferminzblättern, Schöllkraut und Süßholzwurzel; für den wässrig-alkoholischen Extrakt von *Iberis amara* wurde die ganze Frischpflanze verwendet.

Tab. 2 erläutert die Zusammensetzung von STW 5 und beschreibt die einzelnen Extrakte mit ihren zugehörigen Drogen-Extrakt-Verhältnissen und dem jeweiligen Extraktionsmittel.

Einzelextrakt	Anteil in STW 5 (ml / 100 ml)	Drogen-Extrakt- Verhältnis	Extraktionsmittel
Angelikawurzel	10	1:3	Ethanol 31 %
Kamillenblüten	20	1:3	Ethanol 31 %
Kümmelfrüchte	10	1:3	Ethanol 30 %
Mariendistelfrüchte	10	1:3	Ethanol 31 %
Melissenblätter	10	1:3	Ethanol 30 %
Pfefferminzblätter	5	1:3	Ethanol 30 %
Schöllkraut	10	1:3	Ethanol 30 %
Süßholzwurzel	10	1:3	Ethanol 30 %
<i>Iberis amara</i>	15	1:2	Ethanol 50 %

Tab. 2: Zusammensetzung von STW 5 und Charakterisierung der Einzelextrakte.

2.4 Lösungen

Normal-Tyrode

NaH ₂ PO ₄ x H ₂ O	1,54	mM
MgSO ₄ x 7 H ₂ O	1,19	mM
CaCl ₂ x 2 H ₂ O	2,5	mM
KCl	5	mM
NaCl	118	mM
Hepes	10	mM
Glucose-Monohydrat	5	mM

Die Lösung wurde mit Natronlauge [10 M] auf pH 7,4 eingestellt.

Kalium-reiche Tyrode (K⁺ [90mM])

NaH ₂ PO ₄ x H ₂ O	1,54	mM
MgSO ₄ x 7 H ₂ O	1,19	mM
CaCl ₂ x 2 H ₂ O	2,5	mM
KCl	90	mM
NaCl	33	mM
Hepes	10	mM
Glucose-Monohydrat	5	mM

Die Lösung wurde mit Natronlauge [10 M] auf pH 7,4 eingestellt.

Acetylcholinlösung

Es wurde eine Acetylcholinchlorid-Stammlösung [100 mM] in Tyrode-Lösung hergestellt und mit Tyrode-Lösung auf 100 µM verdünnt.

Butylscopolaminlösung

Es wurde eine Butylscopolaminbromid-Stammlösung [10 mM] in Tyrode-Lösung hergestellt und mit Tyrode-Lösung auf 100 µM verdünnt.

Histamin-Stammlösung

Es wurde eine Histamindihydrochlorid-Stammlösung [5 mM] in Tyrode Lösung hergestellt. Weitere Verdünnungen erfolgten mit Tyrode-Lösung (1, 10, 20, 50, 100 μM).

Luminol-Lösung

Es wurde eine Luminol-Lösung [11,3 mM] in DMSO hergestellt.

Lucigenin-Lösung

Es wurde eine Lucigenin-Lösung [9,8 mM] in DMSO hergestellt.

TroloxTM-Stammlösung

Es wurde eine TroloxTM-Stammlösung [100 mM] in Methanol hergestellt, weitere Verdünnungen erfolgten mit Tyrode-Lösung (1, 2, 5, 10, 20 μM).

Bisabolol-Stammlösungen

Es wurde jeweils eine α -Bisabolol-Stammlösung [Kontraktionsmessungen: 1 M; Radikalmessungen: 100 mM] in Ethanol hergestellt, weitere Verdünnungen erfolgten mit Tyrode-Lösung [Kontraktionsmessungen: 50, 100, 300, 500 μM ; Radikalmessungen: 1, 2, 5, 10 μM].

Carvon-Stammlösung

Es wurde eine (+)-Carvon-Stammlösung [1 M] in Ethanol hergestellt, weitere Verdünnungen erfolgten mit Tyrode-Lösung [100, 150, 300, 500 μM].

Citral-Stammlösung

Es wurde eine Citral-Stammlösung (cis/trans-Gemisch) [1 M] in Ethanol hergestellt, weitere Verdünnungen erfolgten mit Tyrode-Lösung [100, 300, 500 μ M].

Citronellal-Stammlösung

Es wurde eine (\pm)-Citronellal-Stammlösung [1 M] in Ethanol hergestellt, weitere Verdünnungen erfolgten mit Tyrode-Lösung [100, 300, 500 μ M].

Chlorogensäure-Stammlösung

Es wurde eine Chlorogensäure-Stammlösung [100 mM] in DMSO hergestellt, weitere Verdünnungen erfolgten mit Tyrode-Lösung [Kontraktionsmessungen: 100, 300, 500 μ M; Radikalmessungen: 1, 2, 5, 10 μ M].

Kämpferol-Stammlösung

Es wurde eine Kämpferol-Stammlösung [10 mM] in DMSO hergestellt, weitere Verdünnungen erfolgten mit Tyrode-Lösung [Kontraktionsmessungen: 2,5, 5, 25 μ M; Radikalmessungen: 1, 2, 5, 10, 20 μ M].

Limonen-Stammlösung

Es wurde eine R-(+)-Limonen-Stammlösung [1 M] in Ethanol hergestellt, weitere Verdünnungen erfolgten mit Tyrode-Lösung [100, 300, 500 μ M].

Kaffeesäure-Stammlösung

Es wurde eine Kaffeesäure-Stammlösung [100 mM] in DMSO hergestellt, weitere Verdünnungen erfolgten mit Tyrode-Lösung [Kontraktionsmessungen: 100, 300, 500 μ M; Radikalmessungen: 1, 2, 5, 10, 20 μ M].

Menthol-Stammlösung

Es wurde eine (-)-Menthol-Stammlösung [1 M] in Ethanol hergestellt, weitere Verdünnungen erfolgten mit Tyrode-Lösung [50, 100, 300, 500 μ M].

Menthon-Stammlösung

Es wurde eine (-)-Menthon-Stammlösung [1 M] in Ethanol hergestellt, weitere Verdünnungen erfolgten mit Tyrode-Lösung [100, 300, 500 μ M].

Rosmarinsäure-Stammlösung

Es wurde eine Rosmarinsäure-Stammlösung [100 mM] in Ethanol hergestellt, weitere Verdünnungen erfolgten mit Tyrode-Lösung [100, 300, 500 μ M].

2.5 Biologische Materialien

Für die Experimente wurde terminales Ileum von Wildtyp-Mäusen verwendet.

Die Mäuse der Zuchtlinie C57Bl6 wurden von Charles River, Sulzfeld bezogen und den gesetzlichen Bestimmungen entsprechend (offene Gemeinschaftskäfige, 12 Stunden Hell-Dunkel-Rhythmus) in den Tierställen des Physiologischen Instituts Tübingen bei freiem Zugang zu Standardfutter (Nagetierfutter, Ssniff, Soest) und Leitungswasser gehalten und weitergezüchtet.

3 Methoden

3.1 Gewinnung der Gewebe-Präparate

Zur Organentnahme wurden die 4-10 Monate alten Tiere beiderlei Geschlechts durch CO₂-Asphyxie und zervikale Dislokation getötet. Nach Öffnung der Bauchdecke wurden 5-10 cm des distalen Ileums direkt vor dem Übergang in das Colon entnommen, mit Tyrode-Lösung durchspült, von Fett- und Bindegewebe befreit und in gekühlter Tyrode-Lösung aufbewahrt.

Für die jeweiligen Versuche wurde das Ileumgewebe noch weiter präpariert.

3.1.1 Gewebe für die Versuche zur Messung der Radikalbildung

Aus dem nach Kap. 3.1 vorbereiteten Ileum wurde die Mucosa samt Nahrungsresten mit einer Pinzette herausgestrichen und die komplette Muskelschicht ebenfalls mit einer Pinzette stumpf entfernt. Dieses Vorgehen führte zu drei histologisch verschiedenen Gewebepreparaten: Mucosa, Tela submucosa und Tela muscularis.

Die in Tyrode-Lösung bereit gehaltene Tela submucosa wurde zur Radikalmessung in 2 mm breite Ringe disseziert.

Von allen drei Präparaten (Mucosa, Tela submucosa, Tela muscularis) wurden die in Kap. 3.3 beschriebenen histologischen Färbungen angefertigt.

3.1.2 Gewebe für die Versuche zur Kontraktionsmessung

Für die Messungen der peristaltischen Kontraktion wurde das nach Kap. 3.1 vorbereitete Ileum in etwa 4 mm breite Ringpräparate geschnitten. Diese wurden im Abstand von 2 mm mit zwei Edelstahlnadeln senkrecht zum Lumen durchstoßen und anschließend in gekühlter Tyrode-Lösung bis zur Messung im Organbad aufbewahrt.

3.2 Messung der Histamin-induzierten Radikalbildung mittels Luminol-verstärkter Chemilumineszenz

3.2.1 Reaktionsansatz

Grundlage des Messverfahrens ist die Reaktion von Luminol mit Sauerstoffradikalen zu 5-Aminophthalsäure unter Emission von Licht der Wellenlänge 425 nm (Abb. 3). Diese Photonen wurden mit einem 6-Kanal-Multibiolumat registriert; die Intensität wurde zeitabhängig in „counts per minute“ (cpm) graphisch und als Excel-Datei angegeben.

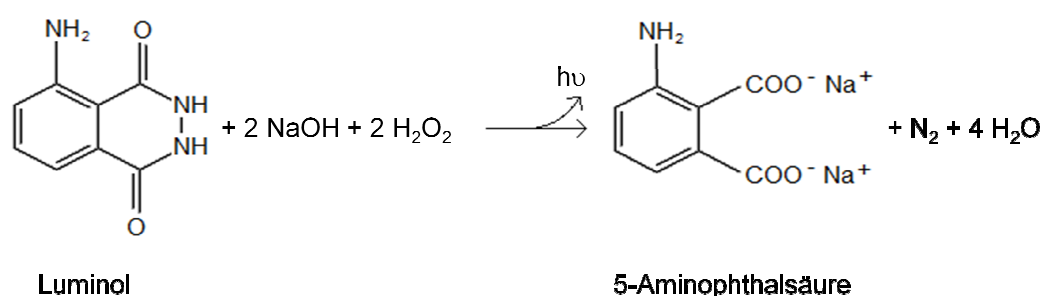


Abb. 3: Reaktionsgleichung für die Chemilumineszenzreaktion von Luminol.

Die Chemilumineszenzmessung (CL) wurde mit den Präparaten im Reaktionsansatz (Tab. 3) im Multibiolumat LB 9505C (Berthold Technologies, Bad Wildbad) durchgeführt.

Lösung	Konzentration Stammlösung	Pipettier-Volumen	Endkonzentration
Tyrode-Lösung		485 µl	
Luminol-Lösung	11,3 mM	5 µl	113 µM
Histamin-Lösung	5 mM	5 µl	50 µM
Testlösung		5 µl	
Gewebepräparat			

Tab. 3: Reaktionsansatz für die Radikalmessungen.

3.2.2 Messung und Auswertung

Ein typischer Verlauf der CL-Messung nach Histamin-Stimulation ist in Abb. 4 dargestellt: Zunächst wurde über 10 Minuten die basale Radikalproduktion aufgezeichnet. Dann wurde Histamin [50 μM] zupipettiert und wieder 10 Minuten gemessen, bevor STW 5, die Extrakte, die Substanzen oder die Lösungsmittelkontrollen appliziert und weitere 10 Minuten gemessen wurde.

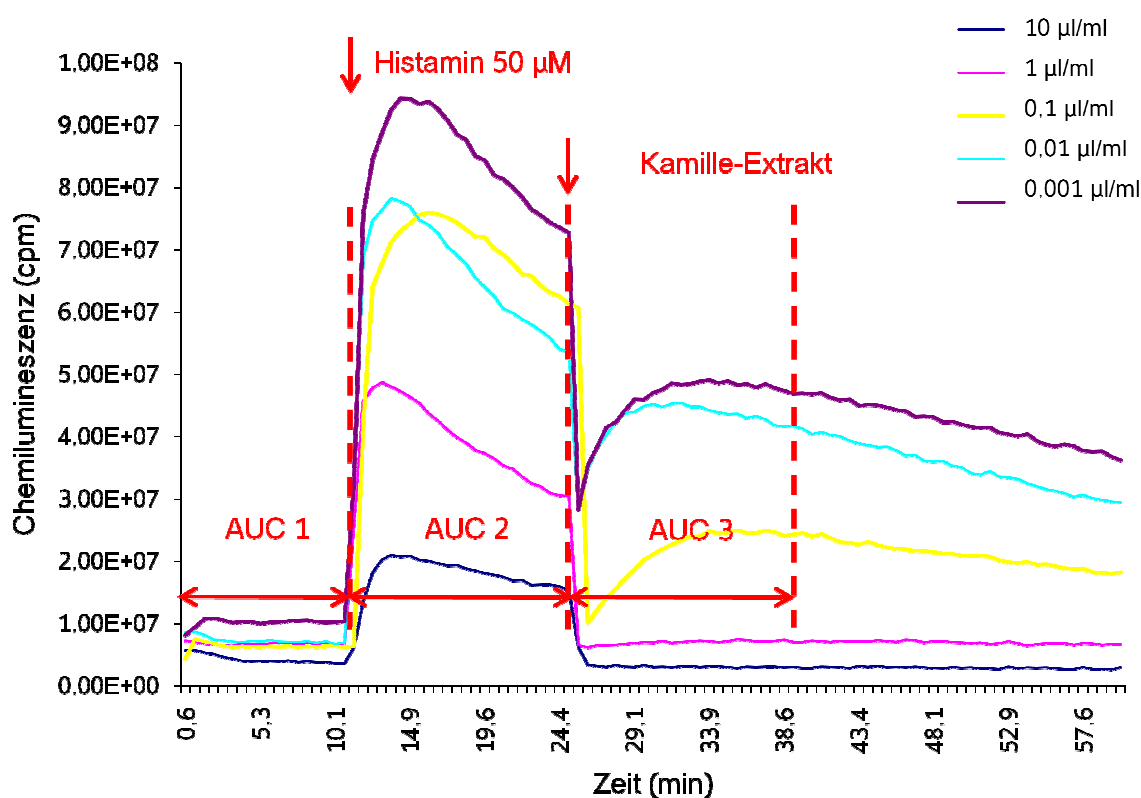


Abb. 4: Messung der durch Histamin induzierten Radikalproduktion an 5 Ileumpräparaten derselben Maus bei Zugabe von Histamin [50 μM] und anschließender Hemmung durch Kamillen-Extrakt in verschiedenen Konzentrationen [0,001-10 $\mu\text{l/ml}$]. Beispiel einer Originalregistrierung.

Für die Auswertung wurden zunächst durch Integration der CL-Werte, die vom Biolumat in Excel-Format konvertiert wurden, die „area under the curve“ (AUC) für die Abschnitte, 1, 2 und 3 (Abb. 4) ermittelt. Dann wurde aus AUC 3 und AUC 2 der Quotient gebildet, der als maximale Radikalproduktion nach Stimulation mit Histamin [50 μM] als 100 % definiert wurde.

Die Hemmwirkung der untersuchten pflanzlichen Extrakte sowie der Mischung STW 5 wurde ebenfalls durch den Quotienten aus AUC 3 und AUC 2 quantifiziert, welcher dann auf den Histamin-Referenzwert (= 100 %) bezogen wurde.

Für die Charakterisierung der Einzelsubstanzen und der Histamin-Rezeptor-Antagonisten wurde nach Registrierung der Basalaktivität die zu untersuchende Substanz zeitgleich mit Histamin den Gewebeproben zugegeben und über 10 Minuten gemessen (AUC 2*). Aus jeder Messung wurde nach Integration von Abschnitt 1 und 2* der Quotient von AUC 2* und AUC 1 bestimmt.

Auch hier sollte die maximale Radikalproduktion als Bezugswert dienen, deshalb wurden pro Versuchstier 12 Präparate nur mit Histamin [50 µM] behandelt, die Quotienten aus AUC 2 und AUC 1 gemittelt und als 100 % definiert. Anschließend wurden die Quotienten AUC 2*/AUC 1 aus den Messungen der Substanzen und Antagonisten auf diesen Histamin-Referenzwert (= 100 %) bezogen.

Jede Konzentration der Testlösungen wurde pro Tier an fünf verschiedenen Präparaten gemessen.

3.2.3 Kontrollmessungen

Um weitere Informationen zu diesem Stimulationsmodell zu erhalten, wurde bei einigen Messungen der unspezifische CL-Indikator Luminol durch den spezifischen, aber nicht zellgängigen Indikator Lucigenin ersetzt.

In einer weiteren Messreihe mit depolarisierender, KCl-angereicherter Tyrode-Lösung [KCl = 90 mM] sollte untersucht werden, inwieweit die Histamin-Stimulation vom Membranpotential der Zellen bzw. von spontanen neuronalen Aktionspotentialen abhängig ist.

Um zu zeigen, dass enzymatische Reaktionen für die Radikalproduktion verantwortlich sind, wurden Ileumpräparate über eine Stunde bei 50 °C denaturiert und anschließend mit Histamin stimuliert.

3.3 Histologische Charakterisierung der Präparate

Für die Färbungen wurde Gewebe verwendet, das entweder direkt nach der Entnahme oder nach entsprechender Präparation für die Radikalmessung (Kap. 3.1.1) eingefroren worden war.

3.3.1 Hämatoxylin-Eosin-Färbung (HE-Färbung)

Für die HE-Färbung wurden am Mikrotom HM560 12 µm dicke Gewebeschnitte hergestellt, die für 10 Minuten bei 4°C in einem Acetonbad fixiert, dann mit destilliertem Wasser gespült und schließlich für 4 Minuten in die saure Hämalaun-Lösung getaucht wurden. Nach gründlichem Spülen mit destilliertem Wasser und einem Bad in Leitungswasser für 15 Minuten, wurden die Schnitte für 30 Sekunden in die Eosin-Lösung getaucht. Nach wiederholtem Spülen mit destilliertem Wasser wurden die Präparate durch Tauchbäder in aufsteigender Alkoholreihe (96, 99, 100 %) entwässert und fixiert.

Als Ergebnis dieser Färbemethode sind die Zellkerne in der mikroskopischen Ansicht blau-violett; Cytoplasma, kollagenes Bindegewebe sowie Erythrozyten erscheinen rot.

Aufarbeitung, Färbung und fotografische Bearbeitung wurden vom Labor Prof. Klessen, Anatomisches Institut der Universität Tübingen, durchgeführt.

3.3.2 Immunohistochemische Markierungen

Für diese Färbungen wurde das entnommene Ileum unter Eiskühlung entsprechend Kap. 3.1.1 vorbereitet, in Tissue Tek[®] eingebettet und in Stickstoff-gekühltem Isopentan schockgefroren. Auf Trockeneis gelagert wurden die Proben nach Mannheim ans Zentrum für Biomedizin und Medizintechnik, Sektion Makroskopische Anatomie, zur Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Kinscherf gebracht.

Dort wurden von den Präparaten an einem Mikrotom HM550 6 µm dicke Gefrierschnitte angefertigt, die zuerst für 10 Minuten mit normalem Schweineserum benetzt wurden, um unspezifische Antigene abzufangen. Die Schnitte wurden dann

über Nacht mit dem jeweiligen spezifischen Antikörper inkubiert: für die α -Aktin-Färbung ein „rabbit anti alpha smooth muscle actin“ (Verdünnung 1:200, abcam), für die Markierung der CD-Antigene jeweils ein „rat anti mouse antibody“ (anti CD4 und anti CD8 (Verdünnung jeweils 1:200); abcam; anti CD31 (Verdünnung 1:100) und anti CD68 (Verdünnung: 1:500); BD Pharmingen).

Nach der Inkubation wurde der Antikörper ausgewaschen. Anschließend wurde die endogene Peroxidase-Aktivität mit 3 %iger H_2O_2 -Lösung inaktiviert und das Präparat mit PBS gewaschen.

Für die weitere Nachweisreaktion wurde als Brücke zwischen dem spezifischen Antikörper und der Peroxidase ein biotinylierter Antikörper („anti xylgG-Biotin“, GE Healthcare) verwendet, der für 30 Minuten mit den Gewebeschnitten inkubiert wurde. Die mit PBS gründlich ausgewaschenen Schnitte wurden anschließend für 30 Minuten mit der Streptavidin-gekoppelten Peroxidase behandelt und wieder gewaschen.

Um die markierten Zellen sichtbar zu machen, wurde den Präparaten unter dem Mikroskop das Substrat für die Peroxidase (Histogreen[®]) zugegeben, anschließend die Zellkerne mit Hämatoxylin gegengefärbt.

Ergebnis der Markierung mit Peroxidase und anschließender Färbung mit Histogreen[®] sind türkisfarbige Zellkörper, die sich von den nicht-markierten Zellen deutlich abheben. Die Hämatoxylin-Färbung erleichtert die Auswertung, da die gesamte Zellpopulation erkennbar wird.

3.4 Messung der Darmkontraktionen

3.4.1 Messaufbau

Die nach Kap. 3.1.2 vorbereiteten Ringpräparate wurden mit den Edelstahlnadeln in der auf 37°C temperierten Messkammer fixiert (Abb. 5). Eine Nadel war mit einer Mikrometerschraube zur Vorgabe der Grundspannung verbunden, die andere Nadel mit einem Kraftaufnehmer. Dieser registrierte die durch die Kontraktionen auftretenden isometrischen Kräfte und leitete die Messdaten über einen Verstärker an den Computer weiter. Mit der Software Chart 5 (ADInstruments, Spechbach) wurden diese kontinuierlich aufgezeichnet. Die Messeinrichtung wurde regelmäßig mit einer Federwaage im Bereich bis 50 mN geeicht.

Jede der zu untersuchenden Lösungen wurde an insgesamt 10 Präparaten von 5 Tieren gemessen.

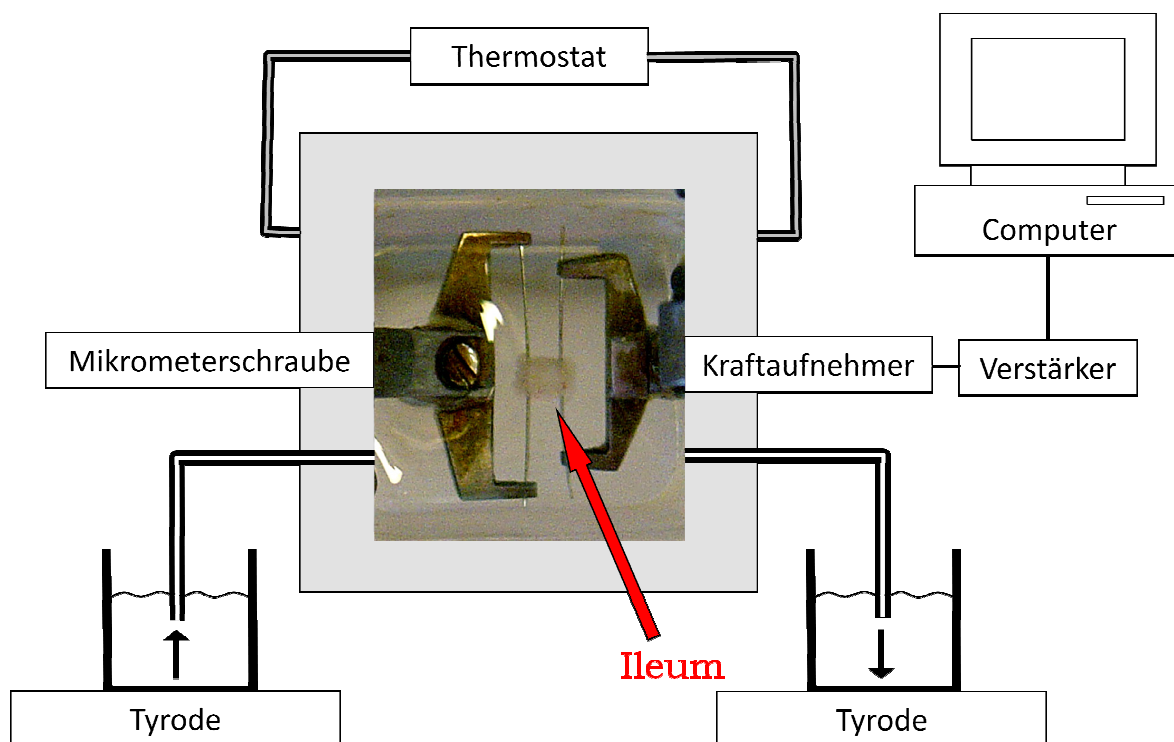


Abb. 5: Schematische Darstellung der Messanlage

3.4.2 Einfluss der Extrakte auf spontane Kontraktionen der Ileumpräparate

Zur Messung des Einflusses verschiedener Extrakte bzw. Substanzen auf die Spontanmotilität des Mäuseileums wurden die Präparate auf 2 mN vorgedehnt. Nach einer Equilibrierungsphase von etwa 20 Minuten unter Tyrode-Lösung-Perfusion (10 ml/min) konnten phasische Kontraktionen konstant über 8 Stunden registriert werden.

Die Parameter Amplitude P (mN) und Frequenz F (min^{-1}) wurden jeweils über einen Zeitraum von 2 Minuten direkt vor Applikation der Testlösung durch die Software Chart 5.5 ausgewertet und gemittelt. Die unter Tyrode-Lösung-Perfusion (Tyr) erhaltenen Werte P_{Tyr} und F_{Tyr} wurden zum Vergleich mit weiteren Messungen für jedes Präparat als 100 % definiert.

Um die Effekte der zu untersuchenden Extrakte bzw. Substanzen auf die Motilität zu charakterisieren, wurde die Tyrode-Lösung durch die jeweilige Testlösung ersetzt. Diese wurden aus den in Kapitel 2.4 beschriebenen Stammlösungen bzw. Extrakten durch Verdünnung mit Tyrode-Lösung hergestellt.

Die Applikationsdauer für jede Testlösung betrug 10 Minuten. Ausgewertet wurden P_{Test} und F_{Test} immer in Minute neun und zehn (Abb. 6), anschließend wurden die absolut gemessenen Werte auf P_{Tyr} bzw. F_{Tyr} (= 100 %) bezogen.

Zum Vergleich wurde das Anticholinergikum Butylscopolamin (Bsc) [10 μM] eingesetzt.

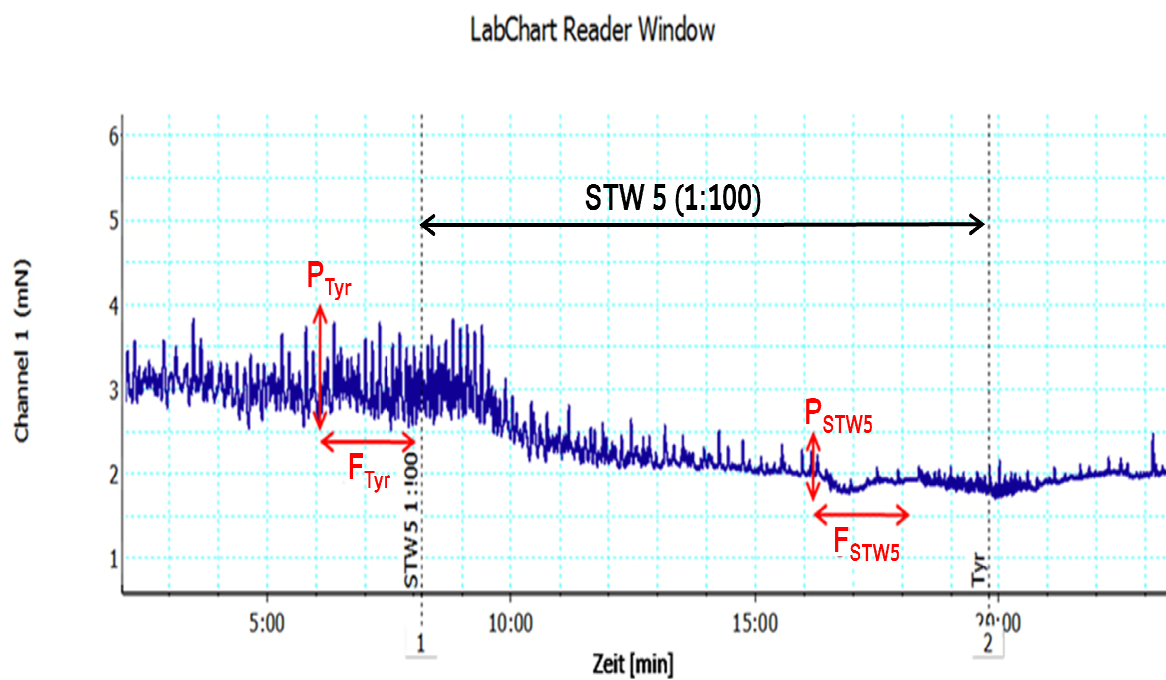


Abb. 6: Applikation von STW 5 (1:100 in Tyrode-Lösung verdünnt). Ausgewertet wurden Amplitude P_{Tyr} (= 100 %), Frequenz F_{Tyr} (= 100 %) sowie P_{STW} und F_{STW} . Beispiel einer Originalregistrierung.

Um Lösungsmittelleffekte auszuschließen, wurden Kontrollversuche mit sämtlichen Lösungsmitteln, die Verwendung gefunden haben, durchgeführt.

3.4.3 Einfluss der Extrakte auf durch Kaliumchlorid und Acetylcholin stimulierte Kontraktionen der Ileumpräparate

Um weitere Informationen über die Wirkmechanismen der pflanzlichen Extrakte zu erhalten, wurden auch Untersuchungen mit Kaliumchlorid (KCl) [90 mM] bzw. Acetylcholin (ACh) [100 μ M] als Stimulantien der Ileumpräparate durchgeführt.

Dazu wurde zunächst die Wirkung von KCl bzw. ACh auf die spontane Rhythmik des Darms untersucht: Das Stimulanz wurde über 10 Minuten appliziert und wie bereits beschrieben Amplitude P und Frequenz F in Minute neun und zehn ausgewertet. Zusätzlich wurde der Anstieg des Tonus T als maximale Amplitude ausgewertet (Abb. 7, 8).

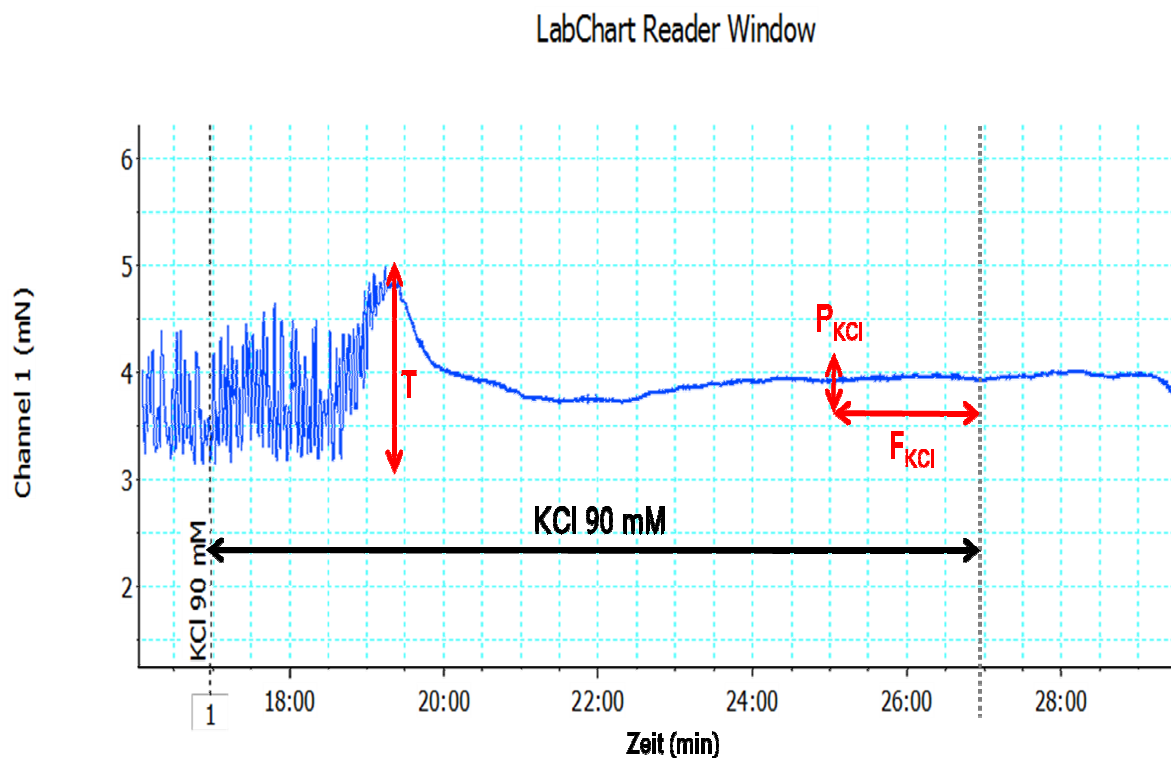


Abb. 7: Stimulation eines Präparates mit KCl [90 mM]. Ausgewertet wurden die Parameter initiale Kontraktion T, Amplitude P_{KCl} und Frequenz F_{KCl} . Beispiel einer Originalregistrierung.

LabChart Reader Window

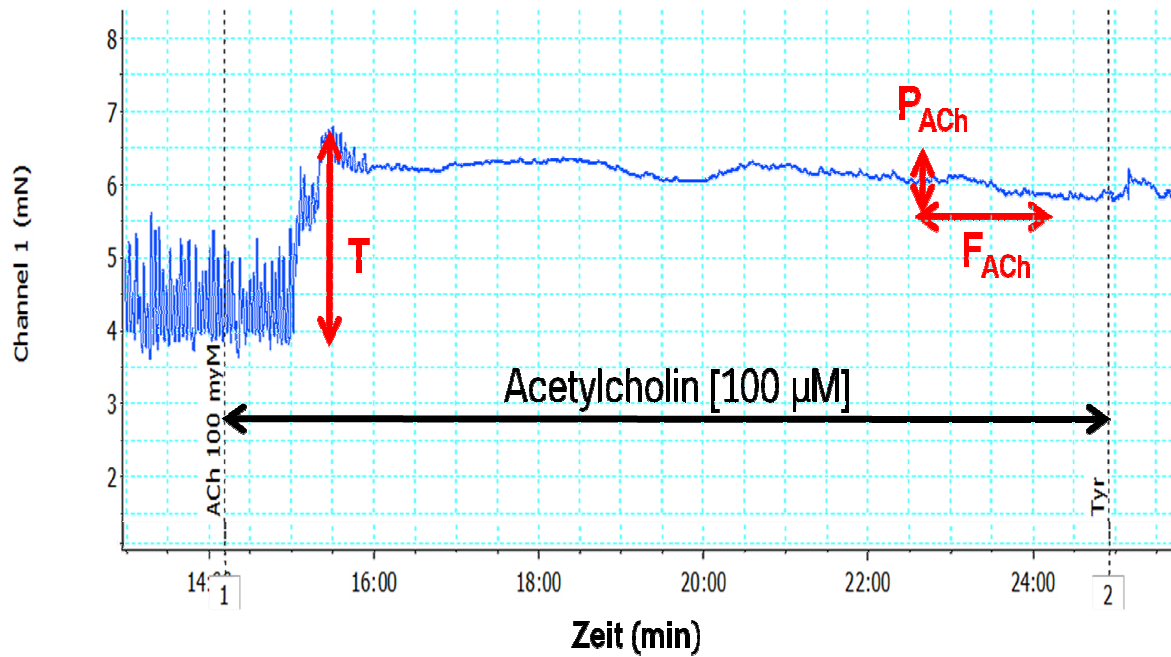


Abb. 8: Stimulation eines Präparates mit ACh [100 μ M]. Ausgewertet wurden die Parameter tonische Kontraktion T, Amplitude P_{ACh} und Frequenz F_{ACh} . Beispiel einer Originalregistrierung.

Um die Effekte der Extrakte bzw. Substanzen auf diese induzierten Kontraktionen zu ermitteln, wurde die Testlösung für 10 Minuten zunächst allein appliziert, direkt im Anschluss für weitere 10 Minuten zusammen mit KCl bzw. ACh (Abb. 9).

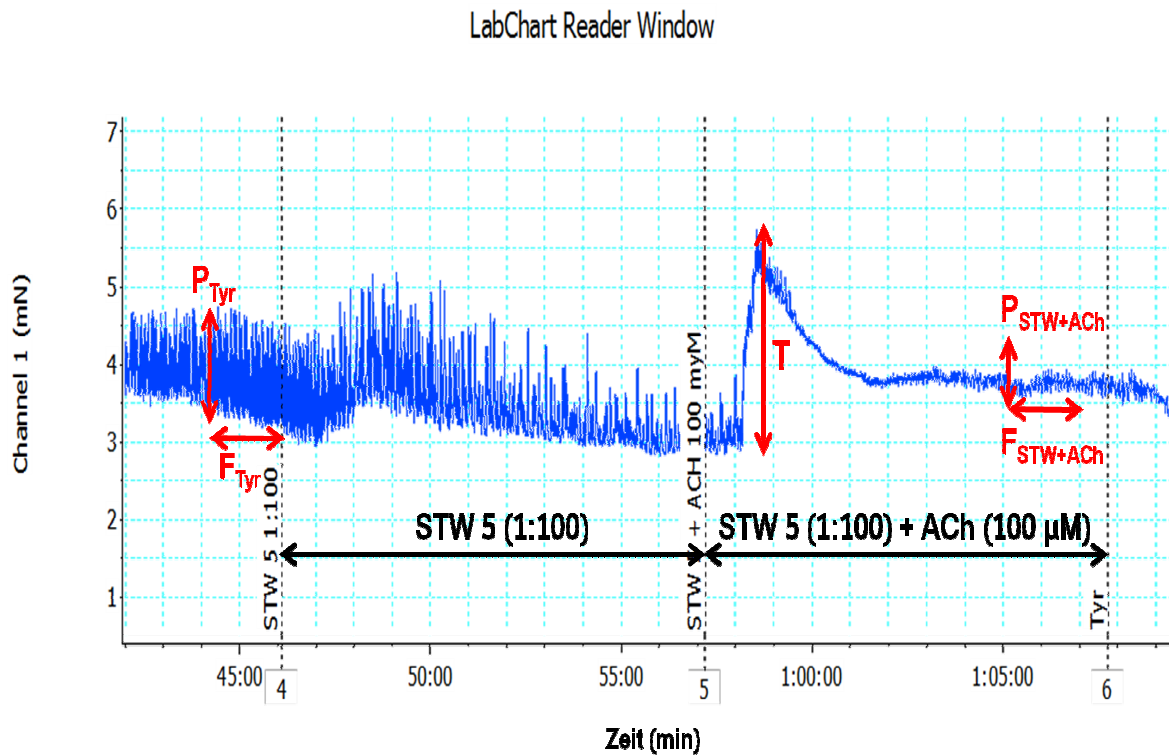


Abb. 9: Applikation einer Testlösung (STW 5 [10 μ l/ml]) und anschließende Stimulation mit ACh [100 μ M]. Ausgewertet wurden Amplituden P_{Tyr} (=100 %), $P_{STW+ACh}$ und T sowie die Frequenzen F_{Tyr} (=100 %) und $F_{STW+ACh}$. Beispiel einer Originalregistrierung.

3.5 Statistik

Für die Darstellung der Ergebnisse wurden generell Mittelwerte (MW) \pm Standardabweichung (SD) berechnet und meist relativ in Bezug auf die jeweilige Kontrolle angegeben.

Die statistische Auswertung wurde unter Annahme einer Normalverteilung der Messwerte vorgenommen.

Die Radikalmessungen der Einzelextrakte sowie der verschiedenen Substanzen wurden einer Varianzanalyse (ANOVA) für unabhängige Stichproben in GraphPad Instat 3 unterzogen.

Für die Kontraktionsmessungen der Einzelextrakte erfolgte ein Vergleich der Mittelwerte für abhängige Stichproben durch zweiseitigen t-test in Excel.

Die Kontraktionsmessungen der verschieden konzentrierten Substanzen wurden durch Varianzanalysen (ANOVA) für abhängige Stichproben mit GraphPad Instat 3 ausgewertet.

Das Signifikanzniveau wurde auf $*p < 0,05$ festgelegt, in Einzelfällen konnte noch $**p < 0,01$ angegeben werden (vgl. Ergebnisteil).

4 Ergebnisse

4.1 Radikalfangende Eigenschaften von STW 5 und seinen Komponenten

4.1.1 Charakterisierung der Histamin-induzierten Radikalbildung des Ileums

Bei den Untersuchungen ein darmassoziiertes Modell für oxidativen Stress zu finden, zeigte sich zunächst, dass bei Verwendung von Präparaten des intakten Ileums mittels Luminol-verstärkter Chemilumineszenz keine Radikalbildung detektierbar war. Auch nach Zugabe von Histamin konnte die ROS-Produktion an diesen Präparaten nicht gesteigert werden.

Erst nach Dissektion der Darmwand in die verschiedenen Schichten konnte in der Tela submucosa die Radikalproduktion durch Histamin stimuliert werden.

4.1.1.1 Stimulation der Radikalproduktion von Tela submucosa durch Histamin

Eine beispielhafte Darstellung der Chemilumineszenzreaktion ist in Abb. 10 zu sehen: Der Reaktionsverlauf zeigt, dass auch bei Tela submucosa ohne Histamin keine basale Radikalproduktion nachgewiesen werden kann. Erst nach Zusatz des Amins erfolgte ein sehr schneller, starker Anstieg der CL, dem meist eine initial stärkere, später langsamere Abnahme folgte.

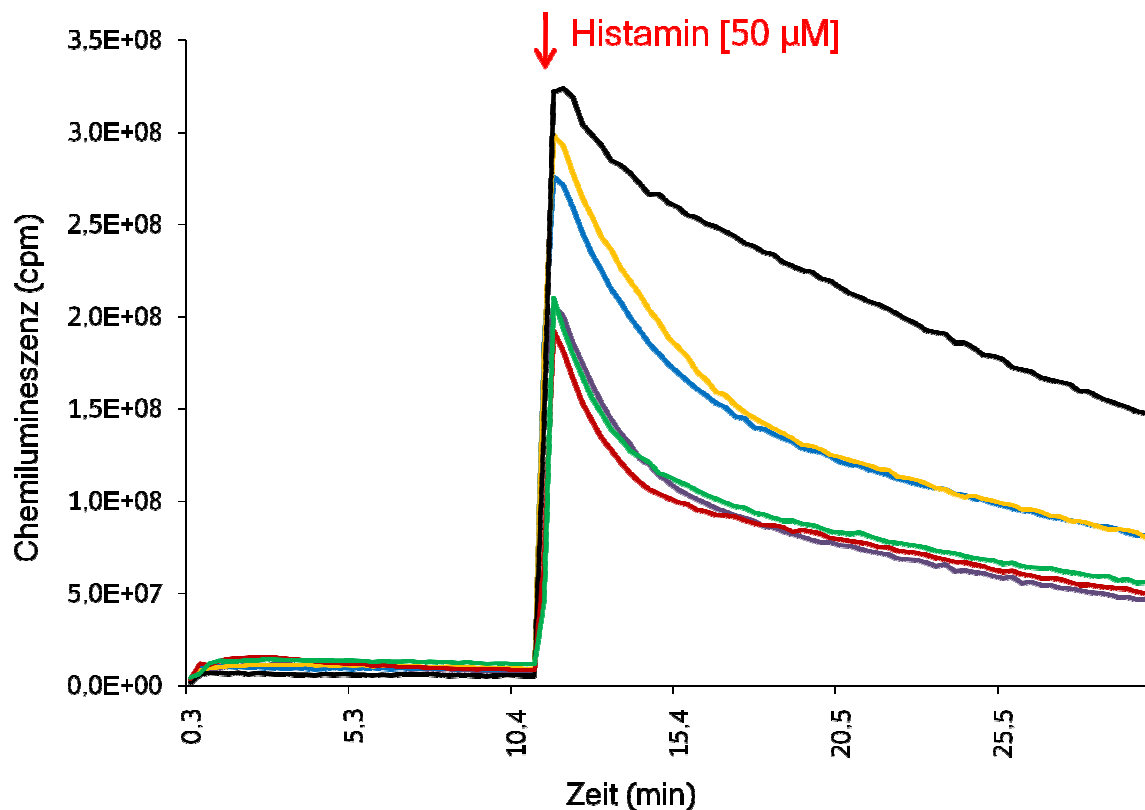


Abb. 10: Stimulation von 6 Ileumpräparaten einer Maus mit Histamin [50 µM]. Originalregistrierung.

Zur Erstellung der Dosis-Wirkungsbeziehung wurden Histamin-Konzentrationen bis 100 µM eingesetzt. Das Ergebnis ist in Abb. 11 dargestellt und zeigt eine Sättigung ab ca. 50 µM Histamin, während bei 1 µM praktisch keine Reaktion messbar war.

Für alle weiteren Versuche wurde [50 µM] als Standardkonzentration von Histamin gewählt.

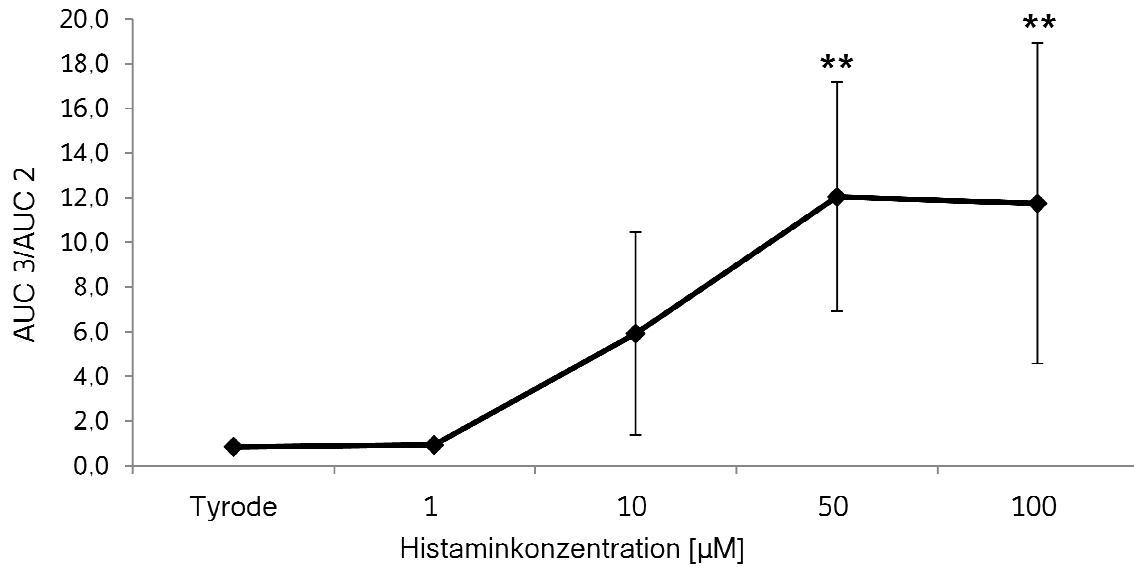


Abb. 11: Dosis-Wirkungskurve von Histamin. MW \pm SD, n = 10 pro Konzentration. Signifikanzen bezogen auf Tyrode-Lösung; **p < 0,01.

Diese Radikalbildung konnte durch das Antioxidans Trolox™ gehemmt werden, wobei der Effekt erst bei einer Konzentration von 20 µM signifikant war (Abb. 12).

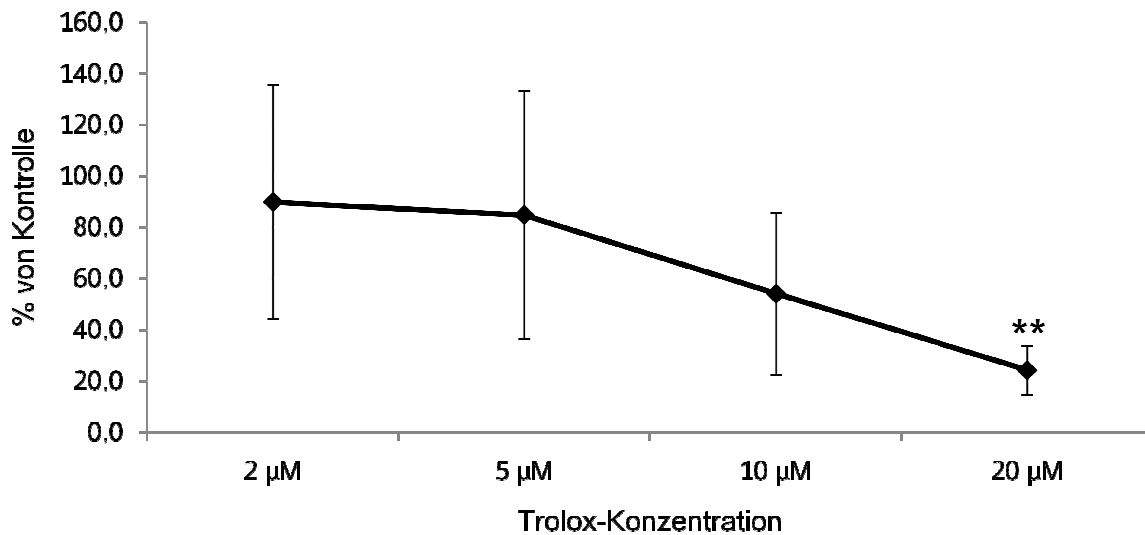


Abb. 12: Dosisabhängige Wirkung von Trolox™ auf die Stimulation mit Histamin [50 µM] = 100 %. MW \pm SD, n = 20 pro Konzentration. Signifikanzen bezogen auf Histamin; **p < 0,01.

4.1.1.2 Korrelation von Gewebe-Masse und Ausmaß der Radikalproduktion

Um die Abhängigkeit der Radikalproduktion von der eingesetzten Gewebemenge zu untersuchen, wurde von insgesamt 68 Präparaten aus 20 Tieren nach der CL-Reaktion die Trockenmasse bestimmt. Berechnet wurde AUC 2 nach Histaminstimulation und diese bezogen auf das jeweilige Trockengewicht. Die Wertepaare sind in Abb. 13 dargestellt, ihre Korrelation wurde mit einer Ausgleichsgeraden berechnet. Schon der Mittelwert von $49 \cdot 10^9 \pm 5,70 \cdot 10^9$ cpm/mg zeigt, dass eine sehr große Streuung auftritt, der Regressionskoeffizient $R^2=0,09$ belegt, dass keine signifikante Korrelation besteht. Daraus kann geschlossen werden, dass die Radikalbildung nicht homogen in der Darmwand erfolgt, sondern eher diskrete Zentren dafür verantwortlich sind.

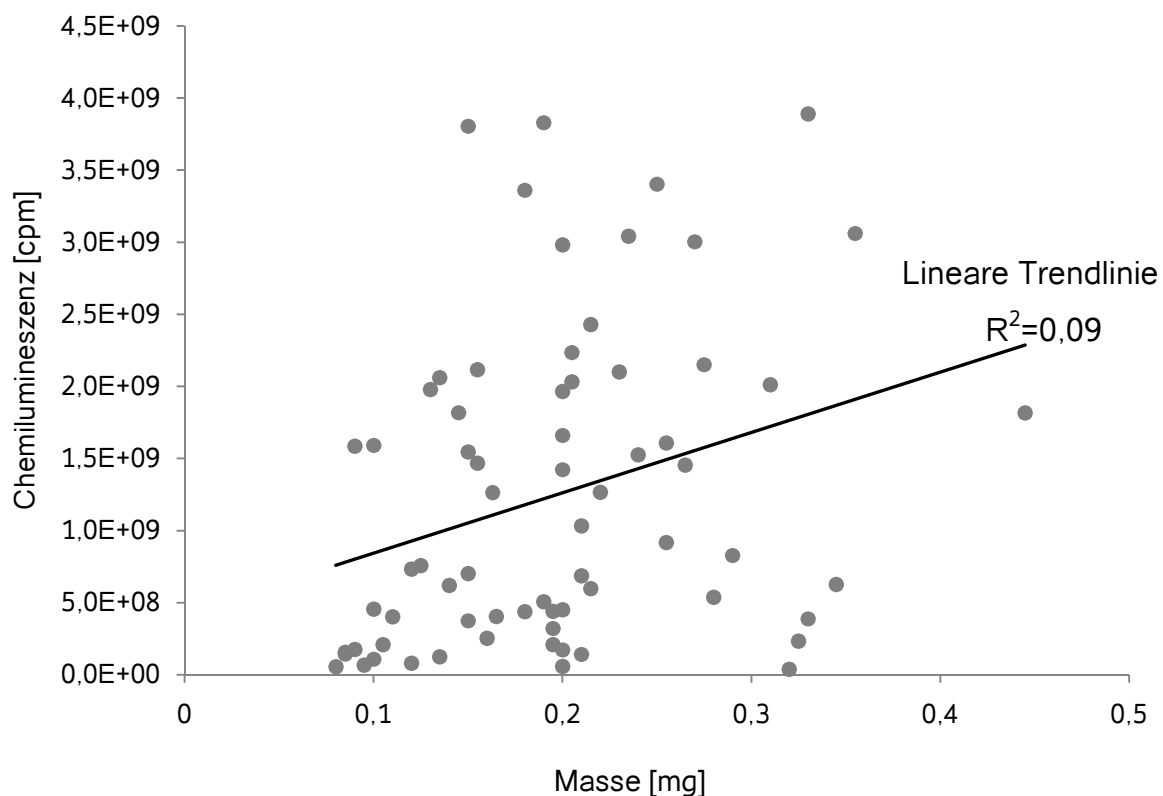


Abb. 13: Korrelation von Gewebemasse und Radikalproduktion nach Stimulation mit Histamin [50 μ M], n = 68. Trendlinie linear berechnet; $y = 4,18 \cdot 10^9 x + 4,25 \cdot 10^8$; $R^2 = 0,09$.

4.1.1.3 Messungen mit dem CL-Indikator Lucigenin

Weiterführende Versuche zur Lokalisation von radikalbildenden Zellen sind in Kap. 4.1.4.2 beschrieben, hier sollte durch Verwendung des Indikators Lucigenin der Frage nachgegangen werden, ob der Nachweis der Radikale intra- oder extrazellulär erfolgt. Die Ergebnisse sind in Abb. 14 und 15 dargestellt und zeigen, dass mit dem zellimpermeablen Lucigenin praktisch keine Detektion möglich ist, dass also Radikalbildung und Nachweis intrazellulär erfolgten.

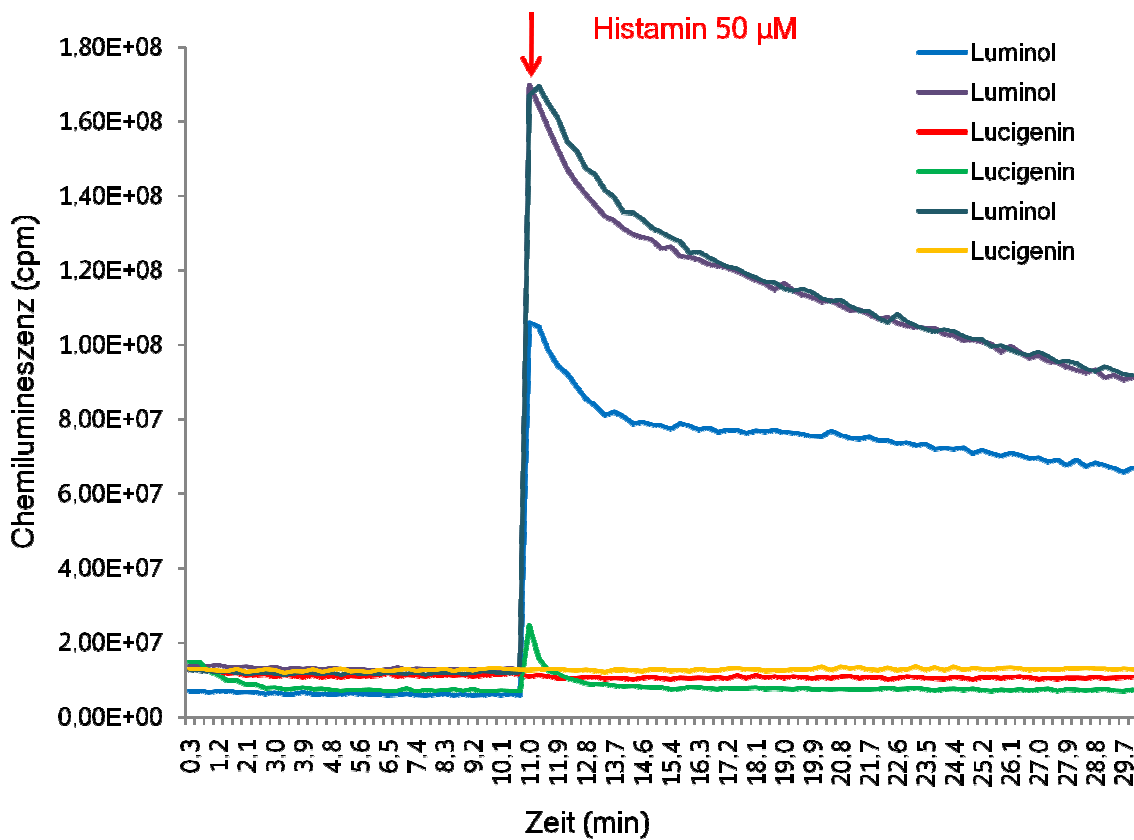


Abb. 14: Stimulation von 6 Ileumpräparaten einer Maus mit Histamin [50 µM]; jeweils drei Messungen mit Luminol und Lucigenin als Detektor. Originalregistrierung.

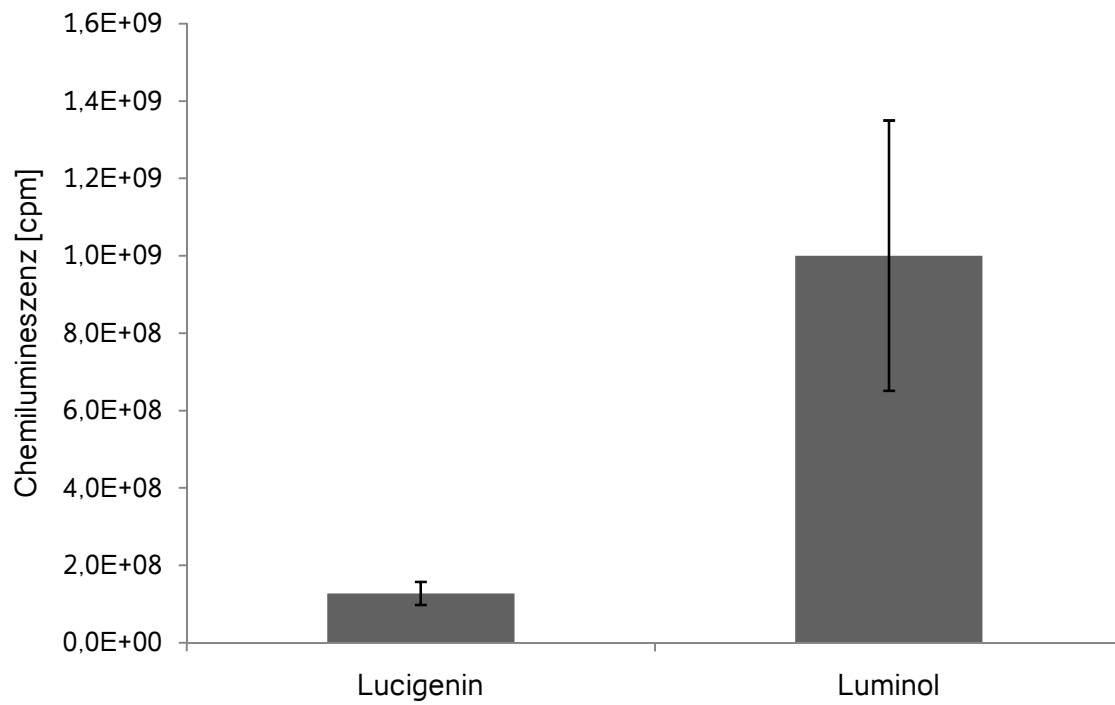


Abb. 15: Histamin-stimulierte Radikalproduktion, Vergleich der CL-Messung mit Lucigenin [98 μM] bzw. Luminol [113 μM]. MW \pm SD, n = 20 pro Indikator.

4.1.1.4 Messungen in kaliumreicher Tyrode-Lösung

Um den Einfluss des Membranpotentials auf die Radikalproduktion zu untersuchen, wurden die Versuche auch in KCl-angereicherter Tyrode-Lösung (KCl [90 mM]) durchgeführt (Abb. 16).

Der Vergleich der Messungen in physiologischer Tyrode-Lösung und in Kalium-angereicherter Tyrode-Lösung ergab keinen signifikanten Unterschied in der durch Histamin [50 μ M] stimulierten Radikalproduktion, tendenziell war das Ausmaß etwas geringer (Abb. 17). Daraus kann geschlossen werden, dass eine Depolarisation des Membranpotentials keinen Einfluss auf die Stimulation mit Histamin hat.

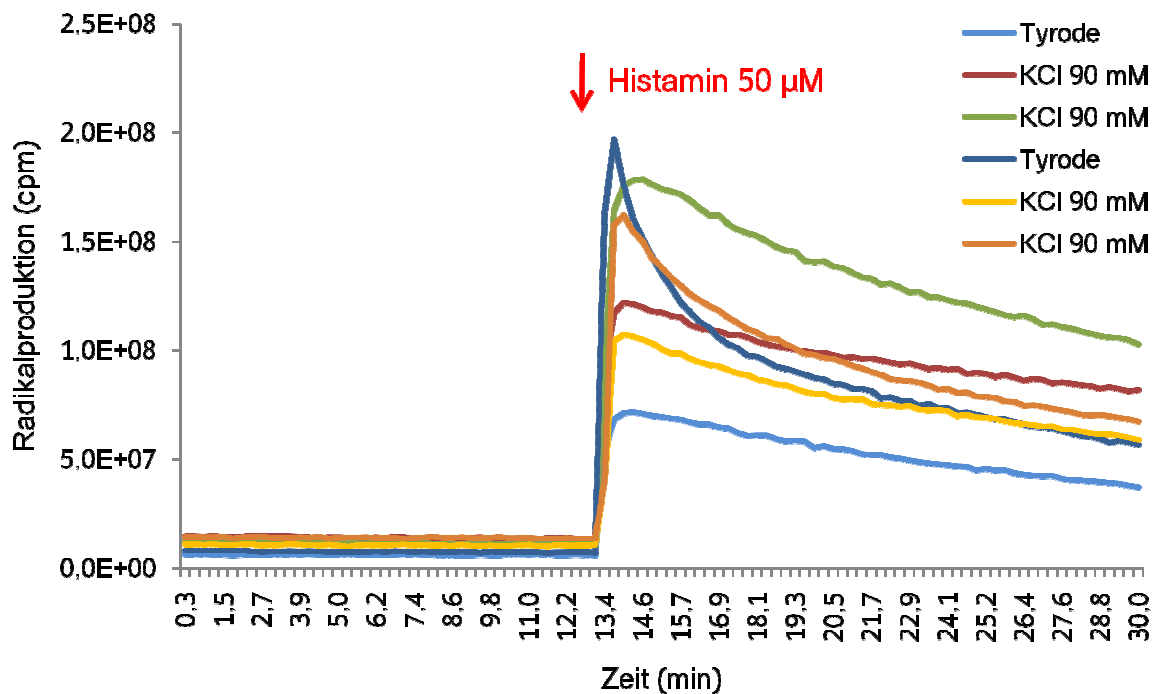


Abb. 16: Stimulation von 6 Ileumpräparaten einer Maus mit Histamin [50 μ M]; zwei Präparate in physiologischer Tyrode-Lösung, vier Präparate in KCl-angereicherter Tyrode-Lösung. Originalregistrierung.

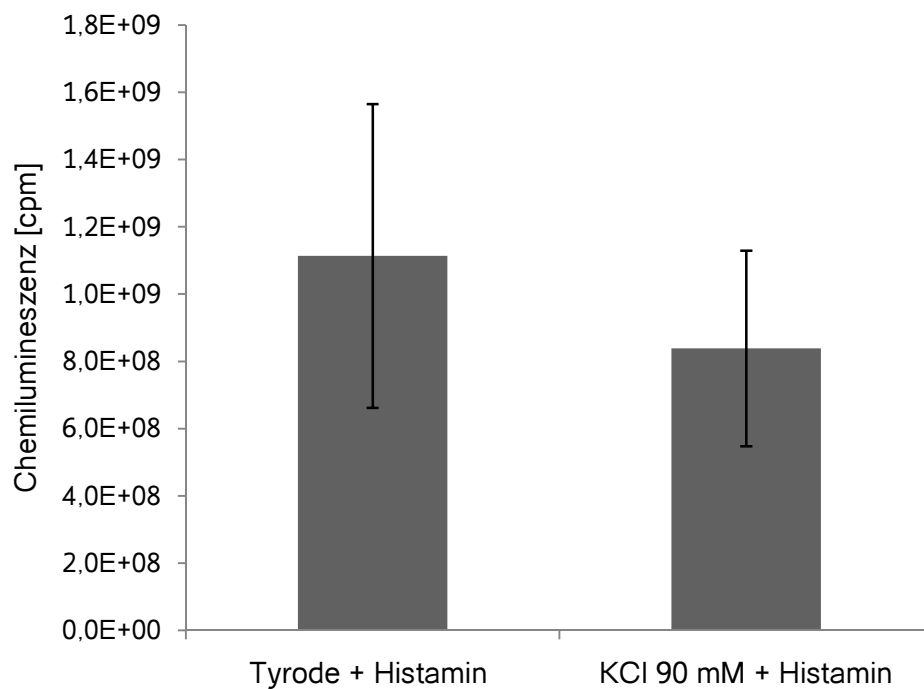


Abb. 17: Histamin-stimulierte Radikalproduktion, Vergleich der CL-Messung in physiologischer Tyrode-Lösung und in KCl-angereicherter Tyrode-Lösung (KCl [90 mM]). MW \pm SD, n = 12 pro Lösung.

4.1.1.5 Einfluss von Histaminrezeptor-Antagonisten auf die Histaminstimulation

Die Histamin-Stimulation konnte durch den H₃-Antagonisten Clobenpropit im untersuchten Konzentrationsbereich [0,01 - 1 µM] signifikant um ca. 90 % vermindert werden. Deutlich weniger wirksam war der H₁-Antagonist Ppyrilaminmaleat, durch ihn wurde eine Hemmung von ca. 50 % erreicht, doch war dieser Effekt in Konzentrationen von 0,01 µM - 1 mM nicht signifikant. Der H₂-Antagonist Famotidin war bei 10 µM noch völlig unwirksam. Ob die bei den hohen Konzentrationen [100 µM, 1 mM] beobachteten hemmenden Wirkungen auf spezifische Wechselwirkungen mit dem Rezeptormolekül zurückzuführen sind, ist eher unwahrscheinlich.

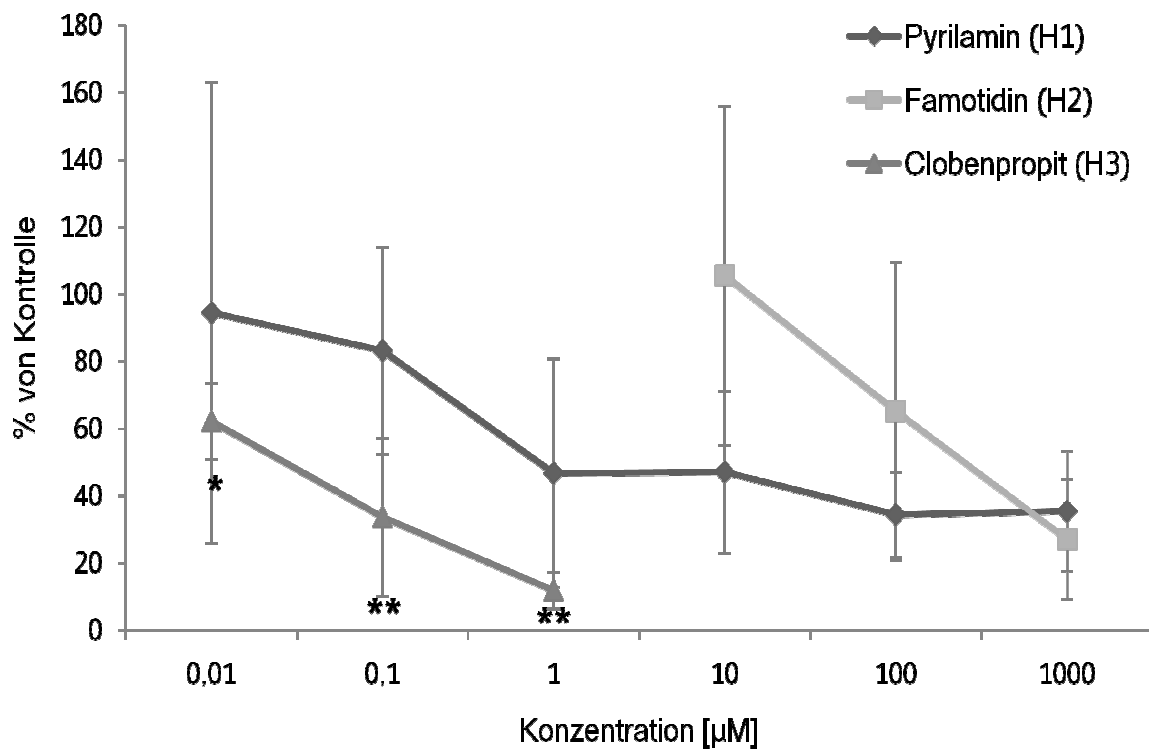


Abb. 18: Dosisabhängige Wirkung des H₁-Antagonisten Ppyrilaminmaleat, des H₂-Antagonisten Famotidin und des H₃-Antagonisten Clobenpropit auf die Stimulation mit Histamin [50 µM] = 100 % (logarithmische Darstellung). MW ± SD, n(Ppyrilamin) = 15, n(Famotidin) = 9, n(Clobenpropit) = 25. Signifikanzen bezogen auf Histamin; *p < 0,05, **p < 0,01.

4.1.2 Effekte von STW 5 und seinen Einzelextrakten auf die durch Histamin stimulierte Radikalproduktion

STW 5 sowie sämtliche Einzelextrakte konnten die Histamin-initiierte Radikalproduktion dosisabhängig hemmen (Abb. 19). Der stärkste Effekt wurde mit Pfefferminz-, der schwächste mit Schöllkrautextrakt beobachtet.

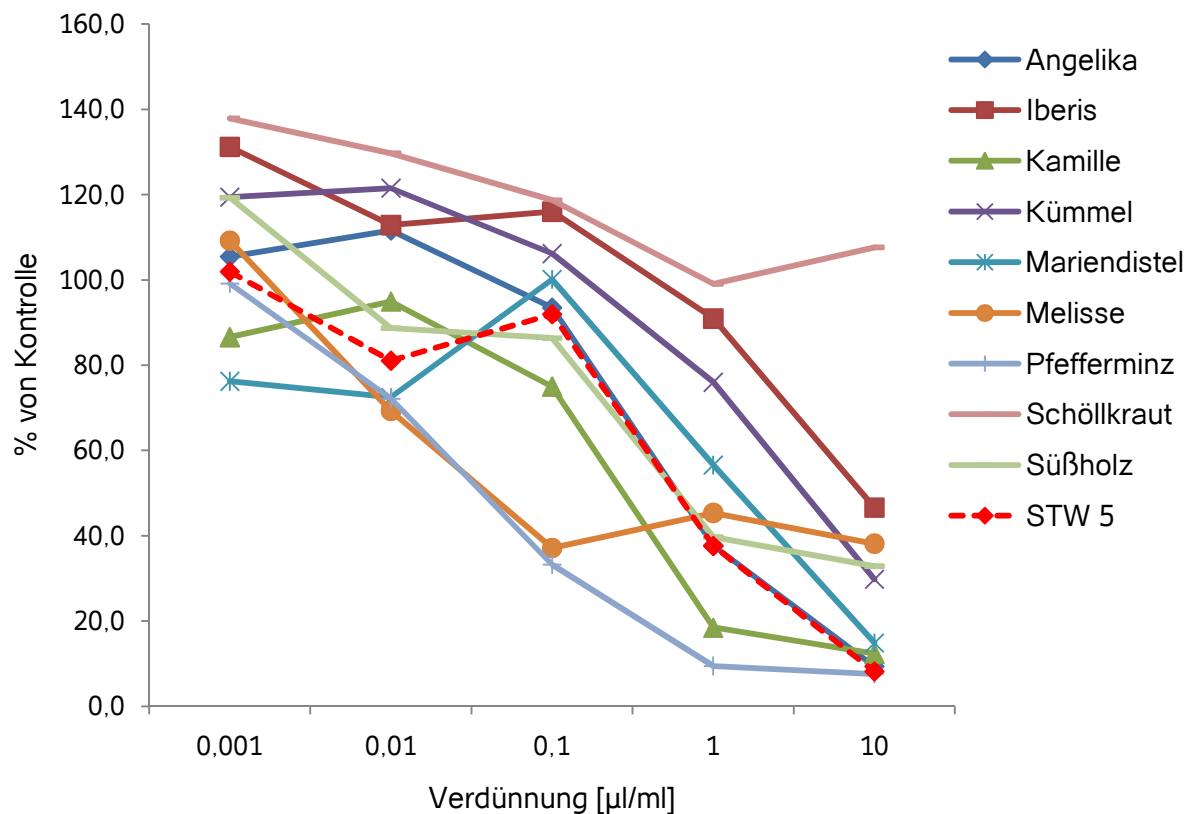


Abb. 19: Dosisabhängige Wirkung von STW 5 und den Einzelextrakten auf die Stimulation mit Histamin [50 µM]; bezogen auf Histamin = 100 %. MW, n = 5 pro Konzentration.

Abb. 20 hebt die signifikanten Effekte der einzelnen Extrakte hervor: in der höchsten Konzentration [10 µl/ml] führten Angelika- und Pfefferminzextrakt zu einer Hemmung von über 90 %, Kamillen-, Mariendistel- und Süßholzwextrakt reduzierten die Radikalbildung um knapp 85 %. *Iberis*- und Kümmelwextrakt schwächten den Histamineffekt um ca. 70 % ab. Die Mischung STW 5 inhibierte die Radikalproduktion um ca. 90 %. Ähnliche Verhältnisse zeigten sich im nächsten Verdünnungsschritt [1 µl/ml]: Pfefferminzextrakt reduzierte die Radikalproduktion am stärksten. Kamillen- und Melissenwextrakt wirkten ebenfalls stark hemmend, gefolgt von Angelika- und Süßholzwextrakt. STW 5 reduzierte die Radikalbildung um die Hälfte. Alle weiteren Extrakte schwächten die Radikalbildung tendenziell ab. Das zum Vergleich eingesetzte Trolox™ hemmte bei 20 µM die Radikalproduktion um ca. 80 %.

Für STW 5 wurde, unter Annahme additiver Effekte der Einzelextrakte, die theoretische Hemmung der Radikalproduktion berechnet, die tatsächlich gemessene war deutlich stärker.

Für weitere Verdünnungen wurden keine signifikanten Effekte mehr gemessen.

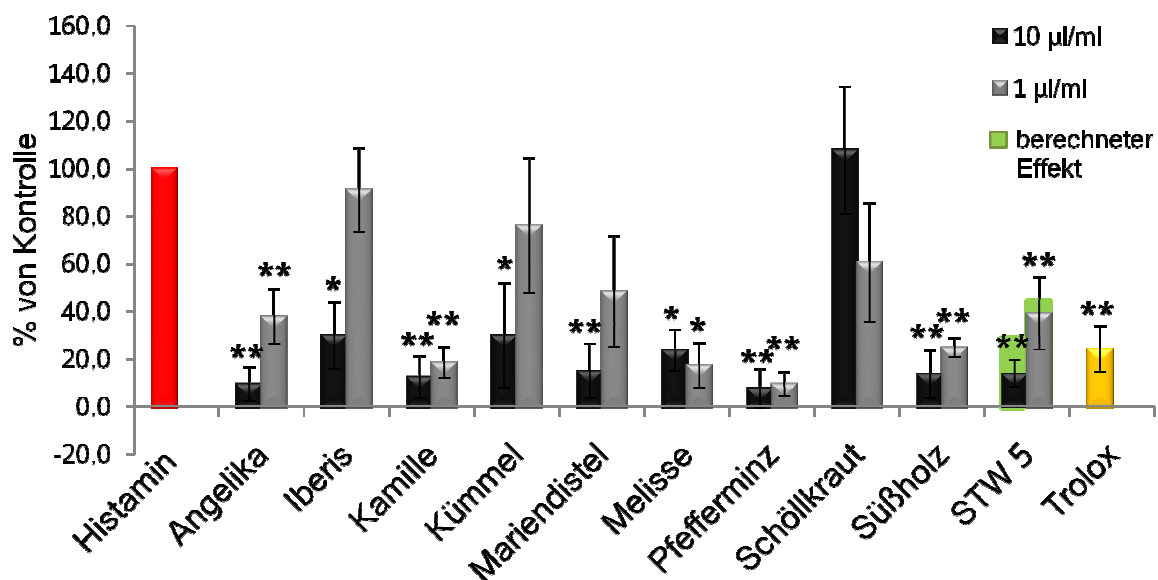


Abb. 20: Wirkung von STW 5 und den Einzelextrakten [10 µl/ml, 1 µl/ml] auf die Stimulation mit Histamin [50 µM] = 100 %, Trolox™ [20 µM] zum Vergleich. MW ± SD, n(STW 5, Extrakte) = 5, n(Trolox™) = 4. Signifikanzen bezogen auf Histamin; *p < 0,05, **p < 0,01.

4.1.3 Effekte von ausgewählten Substanzen auf die durch Histamin stimulierte Radikalproduktion

Von den ausgewählten Substanzen Kämpferol, Kaffeesäure, Chlorogensäure, Rosmarinsäure und Bisabolol konnte Kaffeesäure in allen untersuchten Konzentrationen [1 – 20 µM] die Wirkung von Histamin reduzieren bzw. in der höchsten Konzentration [20 µM] fast unterbinden (Abb. 21). Ebenfalls sehr gute Effekte zeigte Chlorogensäure, die über die ganze Konzentrationsreihe eine signifikante Schwächung der Radikalbildung bewirkte, während Kämpferol sie nur in den beiden hohen Konzentrationen [10, 20 µM] hemmen konnte. Bisabolol hatte keinen signifikanten Einfluss auf die durch Histamin stimulierte Radikalproduktion. Das Antioxidans Trolox™ konnte erst bei 20 µM eine signifikante Hemmung der Radikalgenese bewirken.

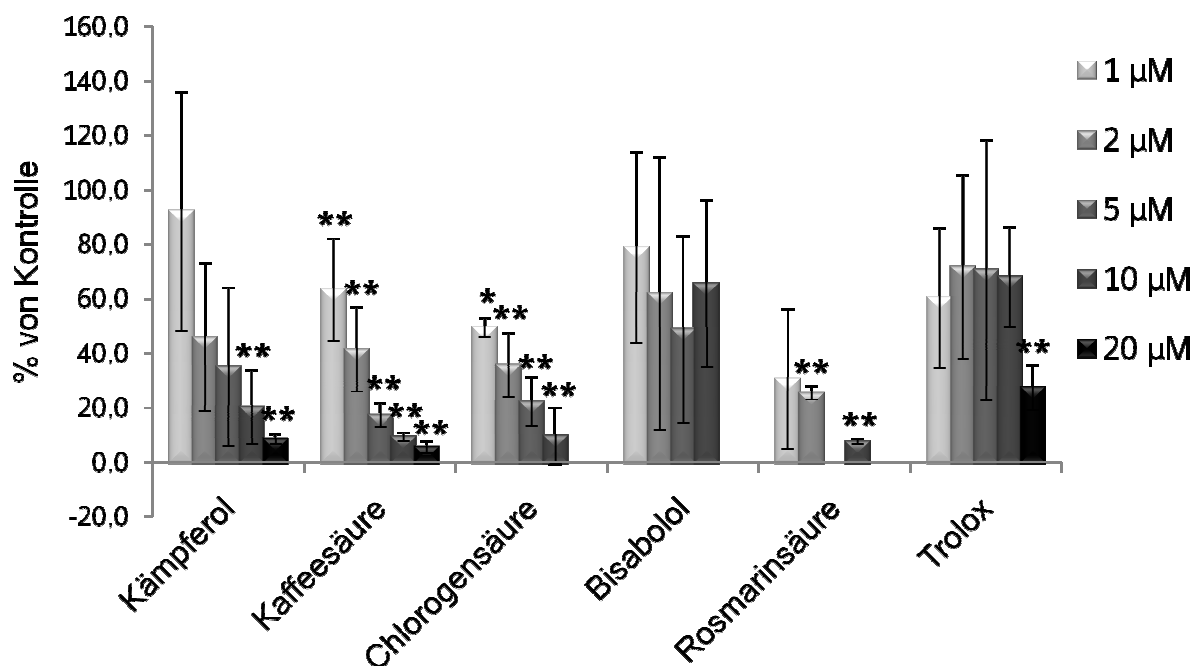


Abb. 21: Dosisabhängige Wirkung von chemisch definierten Substanzen [1 - 20 µM] auf die Stimulation mit Histamin [50 µM] = 100 %, Trolox™ zum Vergleich. MW ± SD, n = 20 pro Konzentration. Signifikanzen bezogen auf Histamin; *p < 0,05, **p < 0,01.

4.1.4 Histologische Charakterisierung der Darmpräparate

Um einen Überblick über die Struktur der untersuchten Darmpräparate zu erhalten und evtl. radikalproduzierende Zellen, d.h. Leukozyten, aufzuspüren, wurden von histologischen Schnitten folgende Färbungen und immunohistochemische Markierungen angefertigt.

4.1.4.1 Hämatoxylin-Eosin-Färbungen (HE-Färbung)

Durch diese Standardfärbung lassen sich Zellkerne bzw. DNA durch Hämatoxylin blauviolett, Cytoplasmaproteine durch Eosin rötlich darstellen.

Untersucht wurde intaktes Ileum sowie die durch die Präparation abgetrennte Tela submucosa und Tunica muscularis. Nach Entfernung der Muskelschicht wurden sowohl an der Schleimhaut als auch an der Muskelschicht die HE-Färbung durchgeführt (Abb. 22a-c; L = Lumen, S = Serosa).

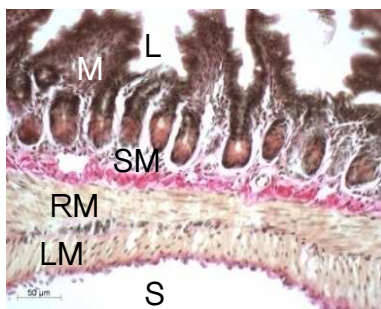


Abb. 22a: intaktes Ileum

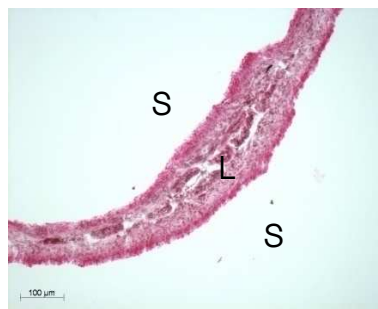


Abb. 22b: präpariertes Ileum (Tela submucosa)

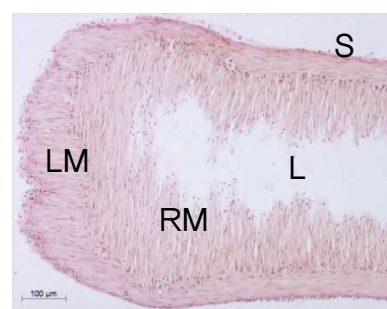


Abb. 22c: Tunica muscularis (Längs- und Ringmuskulatur)

Abb. 22: Histologie der Ileumpräparate nach HE-Färbung und verschiedenen präparativen Aufarbeitungen (a-c). L = Lumen, LM = Längsmuskulatur, M = Mucosa, RM = Ringmuskulatur, S = Serosa, SM = Submucosa; Maßstab entsprechend Markierung.

Abb. 22a zeigt einen Ausschnitt des intakten Ileums im Querschnitt. Das Lumen ist ausgekleidet mit dem sehr dunkel gefärbten Schleimhautepithel (Lamina epithelialis mucosae) der Mucosa, deren Zotten- und Kryptenstruktur gut erhalten ist. Unter der Mucosa liegt die hellere, lockere Submucosa (Tela submucosa). Eine sehr dichte, schmale Bindegewebsschicht trennt die Submucosa von der Muskelschicht (Tunica muscularis), deren Ring- und Längsmuskulatur deutlich zu erkennen sind.

In Abb. 22b sind Mucosa und Muskulatur entfernt, im Querschnitt der Tela submucosa ist das Lumen durch die Präparation kollabiert. Ganz schwach sind in der Mitte des Schnittes noch Reste der Zotten zu erkennen. Das Präparat schließt mit einer dichten Bindegewebsschicht ab.

In Abb. 22c fehlt die komplette Schleimhaut. Im Querschnitt der verbleibenden Tunica muscularis ist zum Lumen hin die Ringmuskulatur zu sehen, zur Serosa hin die Längsmuskulatur.

Die Färbungen bestätigen, dass durch die Präparation der Gewebe zur Radikalmessung die Mucosa und Muskulatur entfernt und die Tela submucosa für die Messung verwendet wurde.

4.1.4.2 Immunohistochemische Färbungen: CD-Markierungen

Die dargestellte HE-Färbung diente einer ersten histologischen Übersicht. Genauere Unterscheidung verschiedener Zelltypen, beispielsweise anhand der Form der Zellkerne, war kaum möglich. Besser eignen sollten sich hierfür immunohistochemische Marker.

Diese Färbungen wurden mit Darmpräparaten von Tieren durchgeführt, welche in einem parallelen Test nach Stimulation mit Histamin [50 µM] deutlich Radikale produzierten.

Um Leukozyten in der Tela submucosa zu identifizieren, wurde zum einen ein CD4-Marker verwendet (Abb. 23a + b). Das CD4-Epitop befindet sich vor allem auf T-Helferzellen, aber auch auf Makrophagen und Monozyten. Des Weiteren kam ein CD8-Marker zum Einsatz, der spezieller nur cytotoxische T-Zellen hervorheben sollte (Abb. 24a + b), während ein CD68-Marker Makrophagen markieren sollte (Abb. 25a + b). CD31 ist ein Oberflächenprotein, was vorwiegend auf Endothelzellen exprimiert wird (Abb. 26a + b).

(Der Balken entspricht stets 100 µm. L = Lumen, S = Serosa; in den präparierten Schnitten ist keine eindeutige Orientierung möglich.)

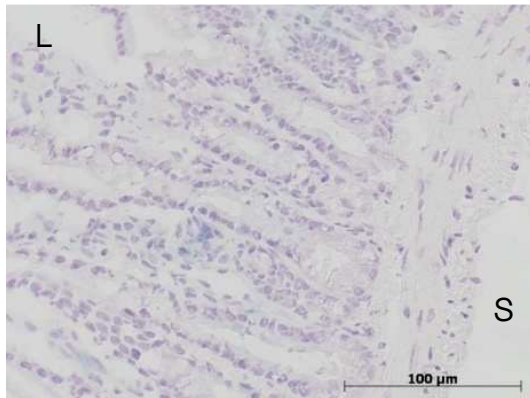


Abb. 23a: CD4-Markierung von intaktem Ileum

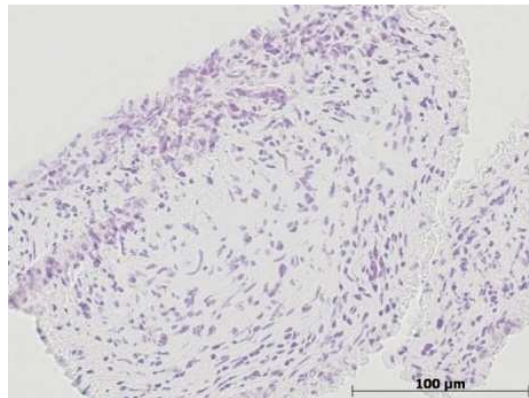


Abb. 23b: CD4-Markierung von präpariertem Ileum (Tela submucosa)

Abb. 23: Immunohistochemische Markierung von unbehandeltem sowie von nach Kap. 3.1.1 vorbereitetem Ileumpräparat mit anti-CD4-Antikörpern (a + b). L = Lumen, S = Serosa, Maßstab entsprechend Markierung.

Abb. 23a zeigt, dass in der Mucosa des intakten Ileums in geringer Zahl CD4-tragende Leukozyten mit dieser Methode markiert werden konnten, im präparierten Gewebe (Abb. 23b) konnten keine CD4-positiven Zellen detektiert werden.

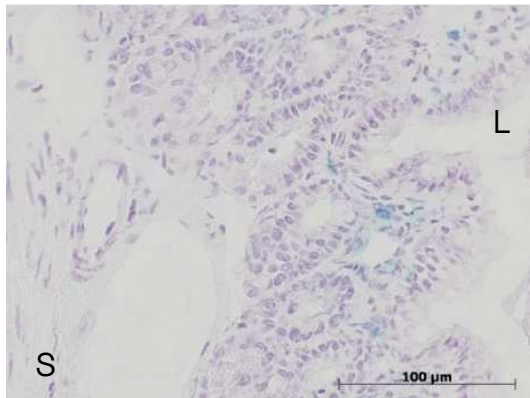


Abb. 24a: CD8-Markierung von intaktem Ileum

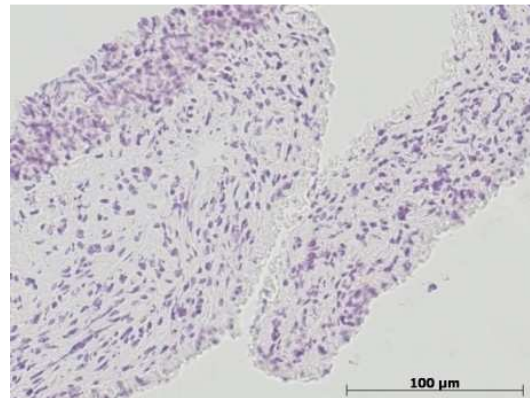


Abb. 24b: CD8-Markierung von präpariertem Ileum (Tela submucosa)

Abb. 24: Immunohistochemische Markierung von intaktem sowie von nach Kap. 3.1.1 vorbereitetem Ileumpräparat mit anti-CD8-Antikörpern (a + b). L = Lumen, S = Serosa, Maßstab entsprechend Markierung.

In Abb. 24a sind CD8-positive cytotoxischen T-Zellen zu sehen, die im intakten Ileum in der Mucosa angefärbt wurden und zahlreicher vorhanden sind als die CD4-positiven Zellen. Auch hier konnten im präparierten Schnitt keine Markierungen gefunden werden (Abb. 24b).

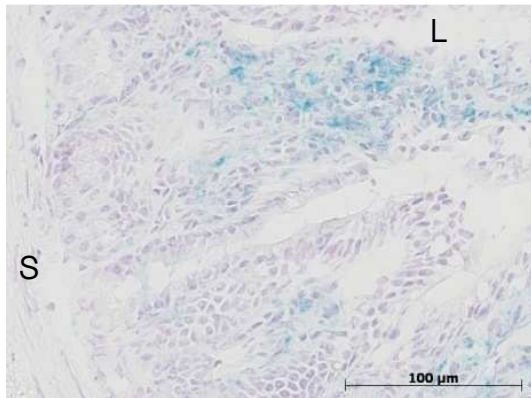


Abb. 25a: CD68-Markierung von intaktem Ileum

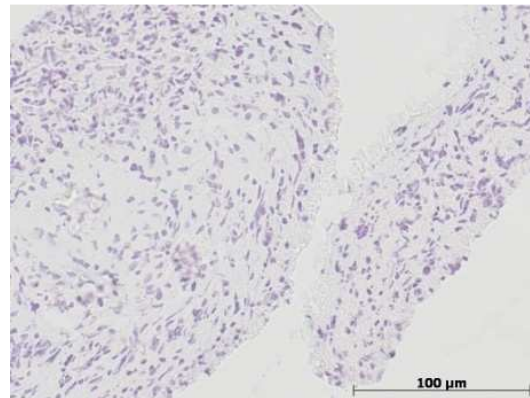


Abb. 25b: CD68-Markierung von präpariertem Ileum (Tela submucosa)

Abb. 25: Immunohistochemische Markierung von intaktem Ileum sowie von Tela submucosa mit anti-CD68-Antikörpern (a + b). L = Lumen, S = Serosa, Maßstab entsprechend Markierung.

Die CD68-tragenden Zellen in Abb. 25a sind Monozyten, Makrophagen sowie neutrophile und basophile Granulozyten. Sie wurden im intakten Ileum sehr zahlreich in der Mucosa gefärbt, während im präparierten Ileum keine Markierungen nachgewiesen werden konnten (Abb. 25b).

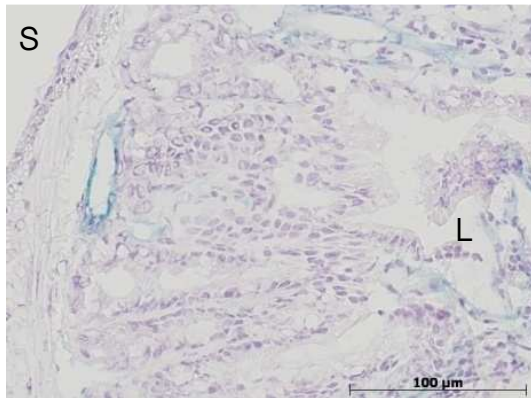


Abb. 26a: CD31-Markierung von intaktem Ileum

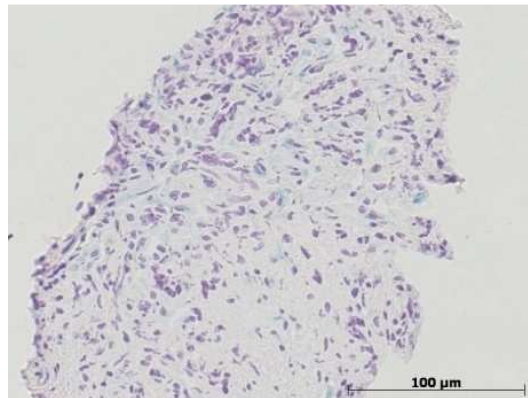


Abb. 26b: CD31-Markierung von präpariertem Ileum (Tela submucosa)

Abb. 26: Immunohistochemische Markierung von intaktem Ileum sowie von Tela submucosa mit anti-CD31-Antikörpern (a + b). L = Lumen, S = Serosa, Maßstab entsprechend Markierung.

CD31 befindet sich auf Zellen wie Monozyten, Blutplättchen, Granulozyten, einigen T-Zellen und Endothelzellen. Im intakten Schnitt in Abb. 26a sind zwei Blutgefäße zu erkennen, sowie einige solitäre Zellen in Mucosa bzw. Submucosa. Im präparierten Schnitt wurden ebenfalls einige Zellen markiert, es lässt sich allerdings nicht sagen, um welchen Zelltyp es sich genau handelt (Abb. 26b).

4.1.4.3 Immunohistochemische Färbungen: alpha-Aktin-Färbung (α A-Färbung)

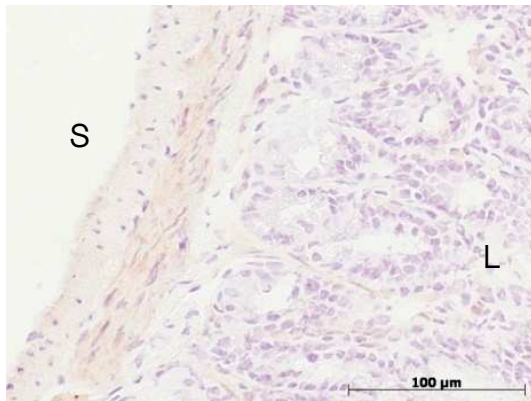


Abb. 27a: α -Aktin-Färbung von intaktem Ileum

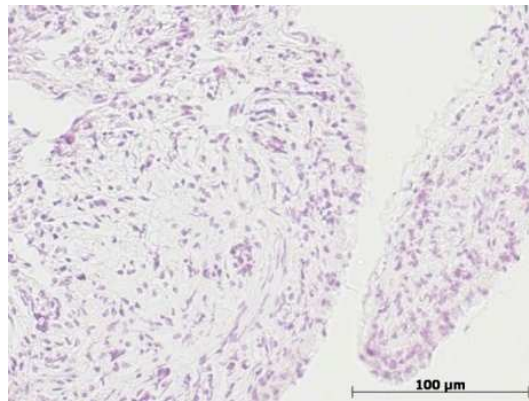


Abb. 27b: α -Aktin-Färbung von präpariertem Ileum (Tela submucosa)

Abb. 27: Immunohistochemische Markierung von intaktem Ileum sowie von Tela submucosa mit anti- α -Aktin-Antikörpern (a + b). L = Lumen, S = Serosa, Maßstab entsprechend Markierung.

α -Aktin kommt in allen Zellen als Bestandteil des Cytoskeletts vor, in glatter Muskulatur überwiegt jedoch α_2 -Aktin als wichtige Komponente des kontraktiven Apparates. Am intakten Ileum (Abb. 27a) wurden Ring- und Längsmuskulatur rötlich gefärbt, durch die Aufbereitung für die Radikalmessung fehlen die Muskelzellen in der Tela submucosa (Abb. 27b).

Die beschriebenen immunohistologischen Untersuchungen haben also nur bedingt Aufschluss über die Präsenz von Leukozyten in der Tela submucosa gebracht, sodass alternative Methoden zur Charakterisierung der Immunzellen eingesetzt werden sollten.

4.2 Kontraktionsmodulierende Eigenschaften von STW 5 und seinen Komponenten

Die Ileumpräparate kontrahierten unter den experimentellen Bedingungen *in vitro* spontan mit einer mittleren Frequenz (F_{Tyr}) von $19,8 \pm 3,5 \text{ min}^{-1}$ und einer mittleren Amplitude (P_{Tyr}) von $1,8 \pm 0,4 \text{ mN}$, ausgewertet aus 120 Präparaten (n) von 60 Tieren. Diese peristaltische Aktivität konnte bis zu 8 Stunden aufrecht erhalten werden.

Zunächst sollen die als Kontrollversuche durchgeführten Messungen mit den pflanzlichen Extrakten und ausgewählten Inhaltsstoffen an spontanen Kontraktionen dargestellt werden.

4.2.1 Effekte von STW 5, seinen Einzelextrakten sowie ausgewählten Inhaltsstoffen auf die spontane Peristaltik

STW 5 und die Einzelextrakte in der Verdünnung [10 $\mu\text{l/ml}$] konnten mit Ausnahme von *Iberis*-, Kümmel- und Schöllkraut-Extrakt die Amplitude signifikant vermindern, wobei Pfefferminz- und Kamillenextrakt den stärksten Effekt zeigten (Abb. 28).

In den im Bezug auf STW 5 anteilig eingesetzten Konzentrationen (vgl. Kapitel 2.3) hatten Mariendistel-, Pfefferminz- und Süßholzwurzelextrakt nur noch eine abschwächende signifikante Wirkung auf die Amplitude. Kümmelextrakt vergrößerte die Amplitude in dieser Verdünnung sogar (Abb. 28). Auch das zum Vergleich eingesetzte Anticholinergikum *N*-Butylscopolamin-Bromid (BSC) [10 μM] verminderte die Amplitude signifikant.

Die Frequenz der spontanen Kontraktionen wurde von keinem der pflanzlichen Extrakte signifikant beeinflusst, auch (BSC) [10 μM] konnte die Frequenz der Spontanperistaltik nicht verändern.

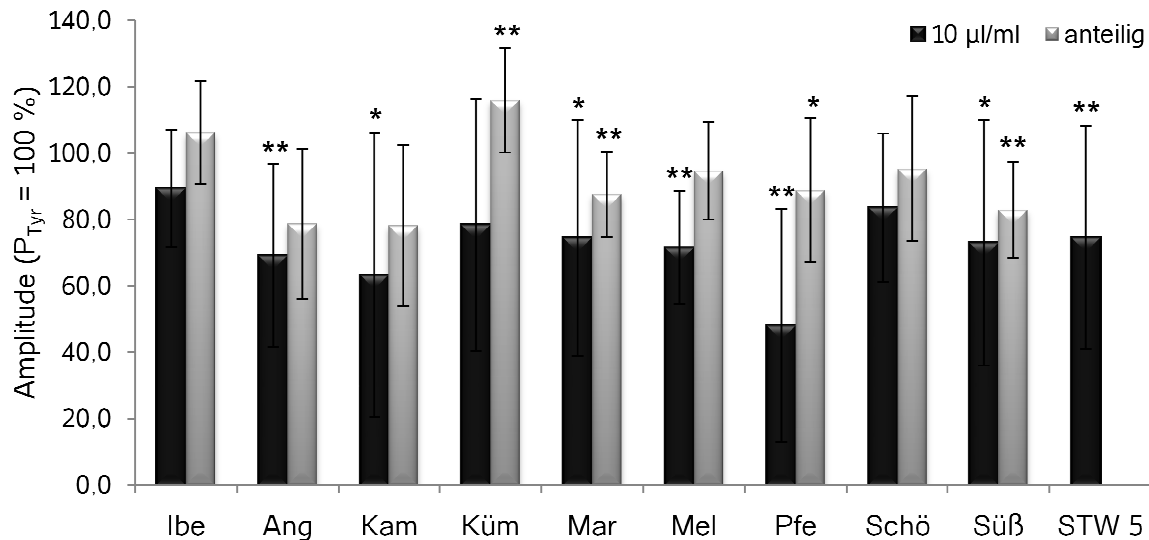


Abb. 28: Effekte von STW 5 und seinen Extrakten in der Verdünnung [10 µl/ml] sowie in den der Komposition entsprechenden Anteilen auf die Amplitude P der Spontanperistaltik (bezogen auf $P_{Tyr} = 100\%$). BSC [10 µM] als Vergleichssubstanz. MW \pm SD, n = 10 pro Extrakt. Signifikanzen bezogen auf P_{Tyr} ; *p < 0,05, **p < 0,01.

Von den ausgewählten Inhaltsstoffen Bisabolol, Carvon, Chlorogensäure, Citral, Citronellal, Kämpferol, Kaffeesäure, Limonen, Menthol, Menthon und Rosmarinsäure hatte keine in der niedrigsten untersuchten Konzentration [100 µM] einen signifikanten Effekt auf die Amplitude (Abb. 29). In den höheren Konzentrationen [300, 500 µM] reduzierte Bisabolol die Amplitude am stärksten, etwas schwächer Citral und Citronellal. Carvon und Rosmarinsäure konnten ebenfalls in beiden Konzentrationen die Amplitude signifikant reduzieren, gleiches gilt in geringerem Maße für Menthol. Kämpferol hatte nur in der Konzentration [25 µM] einen hemmenden Effekt auf die Amplitude, während Chlorogensäure, Kaffeesäure, Limonen und Menthon keinen nennenswerten Effekt aufwiesen.

Die Frequenz F der spontanen Kontraktionen wurde durch Bisabolol in der Konzentration [500 μM] um 82,0 % ($40,5, \pm 16,1 \text{ min}^{-1}$) gegenüber F_{Tyr} signifikant erhöht, durch Citral in gleicher Konzentration um 43,7 % ($25,4 \pm 7,5 \text{ min}^{-1}$) (nicht dargestellt). Alle anderen Substanzen hatten im untersuchten Konzentrationsbereich keinen Einfluss auf die Frequenz.

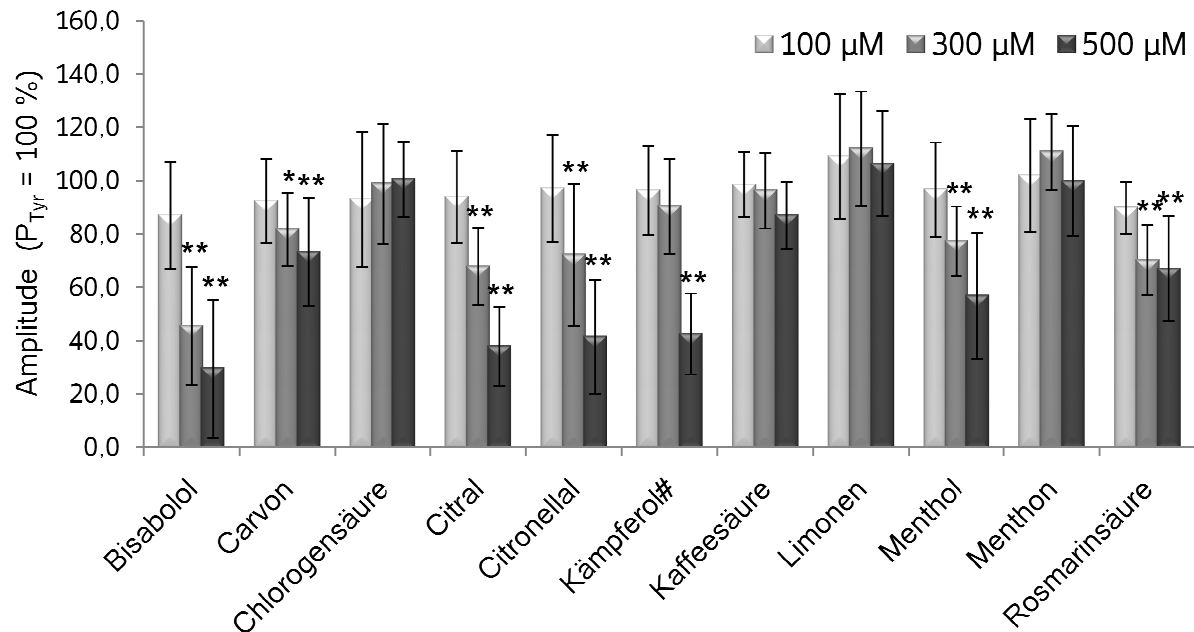


Abb. 29: Konzentrationsabhängige Effekte der Substanzen [100 – 500 μM] auf die Amplitude der Spontanperistaltik P (bezogen auf $P_{\text{Tyr}} = 100\%$). $\text{MW} \pm \text{SD}$, $n = 10$ pro Konzentration. Signifikanzen bezogen auf P_{Tyr} ; * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$.

#Kämpferol in den Konzentrationen (von links nach rechts) 2,5; 5; 25 μM .

Vergleicht man nun die Extrakte [10 $\mu\text{l/ml}$] mit den zugehörigen Substanzen in der jeweils entsprechenden Konzentration im Bezug auf die Amplitude (Abb. 30), so wird deutlich, dass die Extrakte stärker wirksam sind als die Substanzen, von denen keine signifikante Effekte erreichen konnte. So erübrigt sich auch der Vergleich im Bezug auf die Frequenz, da sich weder die Einzelextrakte noch die Substanzen in der Konzentration [100 μM] signifikant auf die Frequenz der spontanen Peristaltik auswirkten.

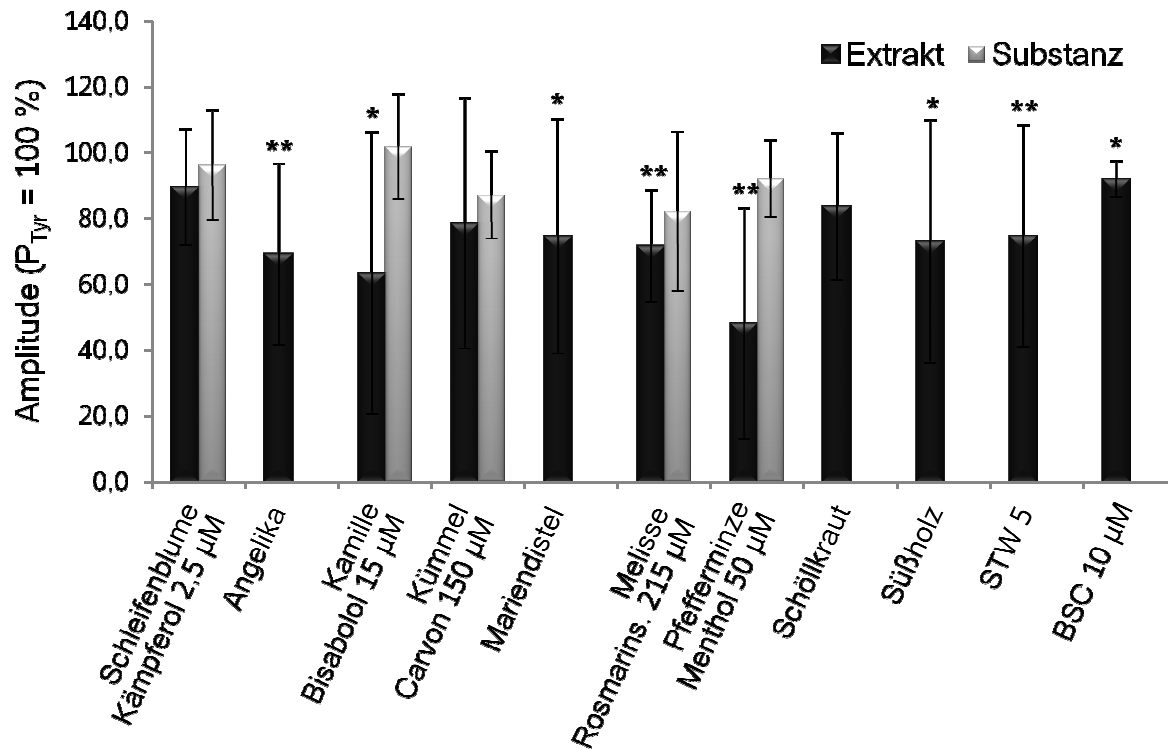


Abb. 30: Effekte von STW 5, seinen Einzelextrakten und darin enthaltenen Substanzen auf die Amplitude der Spontanrhythmik (bezogen auf $P_{\text{Tyr}} = 100\%$). Extrakte [10 $\mu\text{l}/\text{ml}$], Substanzen entsprechend der Konzentration im jeweiligen Extrakt, BSC [10 μM] als Vergleichssubstanz. MW \pm SD, n = 10 pro Lösung. Signifikanzen bezogen auf P_{Tyr} ; *p < 0,05, **p < 0,01.

4.2.2 Effekte von STW 5, seinen Einzelextrakten sowie ausgewählten Inhaltsstoffen auf induzierte Kontraktionen

In zwei modellhaften Versuchsreihen mit unphysiologisch hohen Agonistenkonzentrationen sollte nun untersucht werden, inwieweit die pflanzlichen Extrakte auch unter diesen Bedingungen kontraktionsmodulierende Effekte aufweisen.

4.2.2.1 Stimulation der Ileumpräparate durch Kaliumchlorid [90 mM]

Die Applikation von KCl [90 mM] führte zu einer tonischen Kontraktion, die nach einer initialen, verstärkten phasischen Amplitude T_{KCl} in einer schwächeren Grundspannung mit Verlust der spontanrhythmischen Aktivität resultierte (Abb. 31).

Im Vergleich zur Peristaltik während Tyrodelösung-Perfusion wurde die Frequenz auf $52,7 \pm 3,7 \text{ min}^{-1}$ (275 %) erhöht, die Amplitude auf $0,05 \pm 0,02 \text{ mN}$ (ca. 5 %) reduziert. Die initiale Kontraktion T_{KCl} betrug $2,7 \pm 0,9 \text{ mN}$ (240 % von P_{Tyr}), ausgewertet an 40 Präparaten von 20 Tieren.

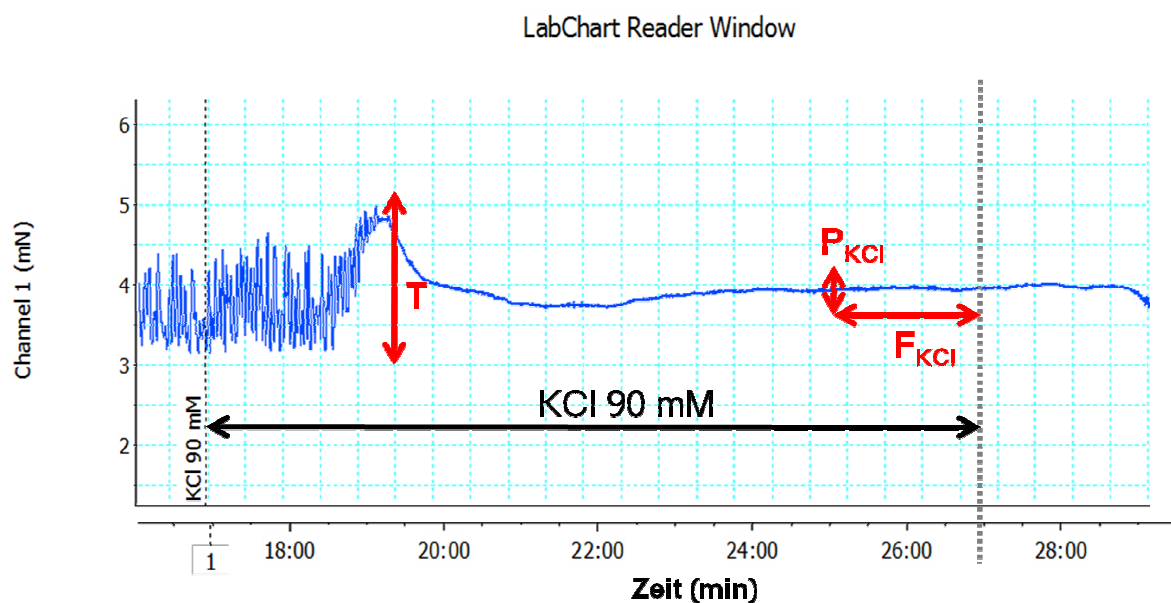


Abb. 31: Effekt von KCl [90 mM] auf die Spontanperistaltik. Ausgewertet wurden Kontraktion T_{KCl} im Maximum, Amplitude P_{KCl} und Frequenz F_{KCl} in Minute neun und zehn. Nach einer Originalregistrierung.

Die initiale Kontraktion T konnte durch zwei Extrakte sowie STW 5 signifikant abgeschwächt werden (Abb. 32): durch Angelika- und Pfefferminzextrakt wurde T um ca. 60 % bzw. 90 % von T_{KCl} vermindert.

Kämpferol [25 μ M] und Bisabolol [100 μ M] waren die einzigen Substanzen, die einen signifikanten Effekt auf die Kontraktion hatten. Sie reduzierten T_{KCl} um 170 % bzw. 150 %. Auch die Vergleichssubstanz BSC [10 μ M] verminderte T_{KCl} signifikant (Abb. 32).

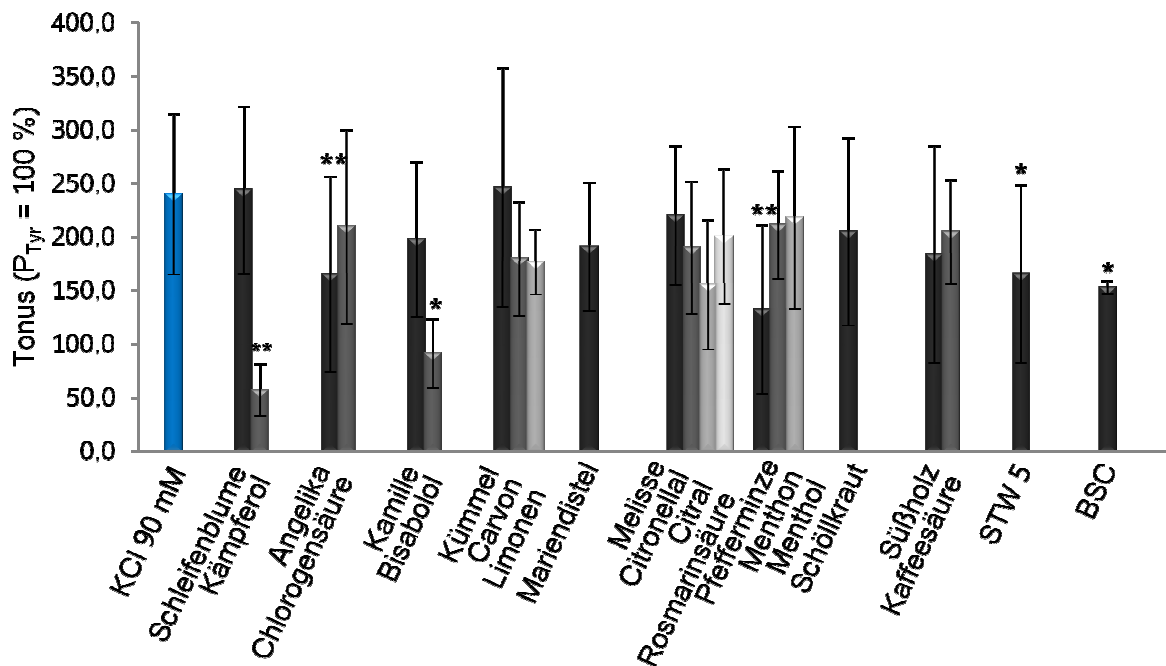


Abb. 32: Effekte von STW 5, seinen Einzelextrakten und darin enthaltenen Substanzen auf die Kontraktion T der durch KCl [90 mM] stimulierten Präparate (bezogen auf $P_{Tyr} = 100\%$). STW 5 und Extrakte [10 μ l/ml], Substanzen [100 μ M], #Kämpferol [25 μ M]; BSC [10 μ M] als Vergleichssubstanz. MW \pm SD, n = 10 pro Extrakt/Substanz. Signifikanzen bezogen auf $T_{(KCl)}$; *p < 0,05; **p < 0,01.

4.2.2.2 Stimulation der Ileumpräparate durch Acetylcholin [100 μM]

Die Applikation des Neurotransmitters ACh [100 μM] führte an den Ileumpräparaten zu einer initialen tonischen Kontraktion T_{ACh} von ca. 240 % ($P_{\text{Tyr}} = 100\%$) und einer im Vergleich zur Spontanrhythmik um ca. 85 % verminderten Amplitude P_{ACh} (Abb. 33). Die Frequenz F_{ACh} war um 80 % höher als F_{Tyr} , wurde ebenso wie P_{ACh} in allen weiteren Messungen aber nicht ausgewertet.

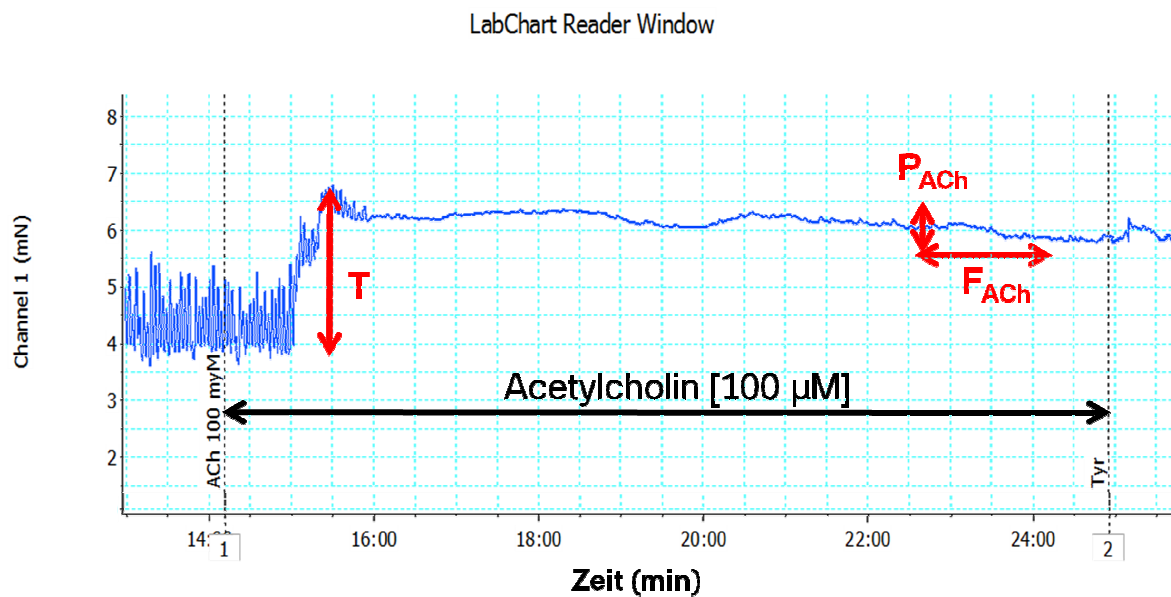


Abb. 33: Effekt von ACh [100 μM] auf die Spontanperistaltik. Ausgewertet wurden Tonus T_{ACh} im Maximum, Amplitude P_{ACh} und Frequenz F_{ACh} in Minute neun und zehn. Nach einer Originalregistrierung.

Die tonische Kontraktion T_{ACh} konnte nur durch STW 5 signifikant reduziert werden, alle anderen Extrakte hatten keinen signifikanten Einfluss (Abb. 34).

Die ausgewählten Inhaltsstoffe, die in Konzentrationen eingesetzt wurden, die der im Extrakt entsprechen, konnten T im Vergleich zu T_{ACh} nicht signifikant beeinflussen, lediglich das zum Vergleich eingesetzte Anticholinergikum Butylscopolamin [10 μM] konnte T_{ACh} hemmen.

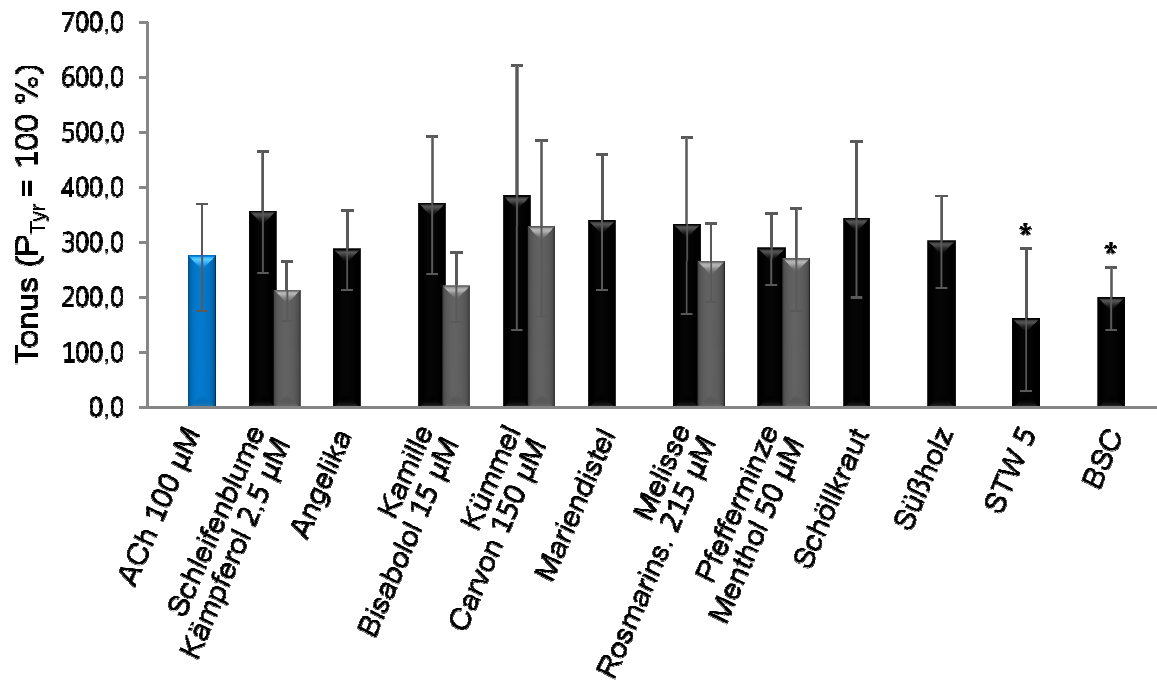


Abb. 34: Effekte von STW 5, seinen Einzelnextrakten und darin enthaltenen Substanzen auf die tonische Kontraktion T der durch ACh [100 µM] stimulierten Präparate (bezogen auf $P_{Tyr} = 100\%$). STW 5 [10 µl/ml], Extrakte anteilig, Substanzen entsprechend den Konzentrationen im Extrakt; BSC [10 µM] als Vergleichssubstanz. MW ± SD, n = 10 pro Extrakt/Substanz. Signifikanzen bezogen auf T_{ACh} ; *p < 0,05; **p < 0,01.

5 Diskussion

5.1 RDS, oxidativer Stress, Entzündung und Histamin

5.1.1 RDS – funktionelle oder entzündliche Erkrankung?

Die Vielfältigkeit der Symptome, an denen Patienten mit RDS leiden, findet sich auch in dessen multifaktorieller Pathogenese. Trotz intensiver Studien sind bisher keine klar definierbaren Mechanismen bekannt, die dem RDS zugrunde liegen.

Zu den möglichen Ursachen des RDS zählen „externe“ Faktoren wie Nahrungsmittelunverträglichkeiten und Veränderungen der Darmflora (Codling et al, 2010; Barbara et al, 2008) sowie Infektionen des Gastrointestinaltraktes, die das Risiko, ein RDS zu entwickeln, 5-10fach erhöhen (Halvorson et al, 2006; Spiller and Campbell, 2006).

Als „interne“ Ursachen können zum einen Vorgänge angesehen werden, die die Darmwand selbst betreffen, d. h. die gestörte intestinale Motilität kann z. B. durch Veränderungen der neuronalen Transmitterfreisetzung (Talley, 2006) oder durch subklinische inflammatorische Prozesse bedingt werden (Collins et al, 2001), die später genauer erläutert werden sollen.

Die für das RDS typische Hypersensitivität kann zum anderen aber auch auf Störungen in allen Ebenen der neuronalen Kommunikation beruhen (Barbara et al, 2004b) und über eine erhöhte Aktivität kurzer und langer Reflexbögen wiederum zu Störungen der Peristaltik führen (Gebhart, 2000). Darüber hinaus spielen emotionale Umstände wie beispielsweise Stress eine Rolle, da der Darm über das autonome Nervensystem mit dem limbischen System und dem Hypothalamus bidirektional in Verbindung steht (Talley, 2006). Des Weiteren scheint auch eine genetische Prädisposition vorzuliegen, die entsprechenden Gene sind jedoch nicht eindeutig identifiziert (Talley, 2009).

Das RDS ist einerseits definiert als funktionelle Erkrankung, der kein organischer Befund zugrunde liegen soll. Entsprechend wird sie durch Ausschluss anderer Erkrankungen an Hand einem vorliegenden Symptomenkomplex diagnostiziert.

Andererseits wird immer deutlicher, dass den funktionellen Störungen durchaus auch histologische Veränderungen zugrunde liegen können.

Das Immunsystem, dessen zelluläre Komponenten zu etwa 70-80 % im Darm lokalisiert sind (Gustav et al, 2006), rückte in den letzten Jahren zunehmend als mögliche pathophysiologische Komponente des RDS in den Fokus und stellt einen neueren Ansatzpunkt für mechanistische Untersuchungen dar.

So beschreiben verschiedene Studien erhöhte Zahlen von intestinalen mucosalen Mastzellen und T-Lymphozyten in Colon-Biopsien von RDS-Patienten (Chadwick et al, 2002; O'Sullivan et al, 2000; Weston et al, 1993). Barbara et al (2004a) haben festgestellt, dass bei RDS-Patienten Mastzellen einen höheren Aktivierungsgrad aufweisen und besonders nah an Nervenendigungen lokalisiert sind. Diese Phänomene korrelieren direkt mit der Schwere der Symptome. Eine stärkere Freisetzung von Entzündungsmediatoren wie Histamin und Tryptase wurde ebenfalls in dieser Studie bestätigt. Cremon et al. (2009) konnten in 50 % der RDS-Patienten über 70 % mehr intestinale mucosale Immunzellen zählen als bei den gesunden Probanden.

Neben den Untersuchungen zu T-Lymphozyten wurden auch B-Zellen genauer fokussiert. In Blutproben von RDS-Patienten wurde anhand der Expression von IgG-Antikörpern auf der Zelloberfläche ein höherer Aktivierungsgrad der B-Zellen gefunden (Öhman et al, 2009).

Außer diesen zellulären Parametern gibt es auch Hinweise auf Veränderungen, die den humoralen Anteil des Immunsystems betreffen.

Bei RDS-Patienten wurden erhöhte Serumspiegel von IgG-Antikörpern gegen bestimmte Nahrungsmittelantigene nachgewiesen, während keine veränderten Werte für IgE-Antikörper gefunden wurden (Zuo et al, 2007).

Ebenso wurden erhöhte Werte verschiedener Zytokine wie TNF- α , IL-1 β , IL-6, IL-10 und IL-12 im Serum von RDS-Patienten gemessen (Liebregts et al, 2007; O'Mahony et al, 2005).

Diese Veränderungen des Immunsystems weisen deutlich auf die Bedeutung von Inflammation in der Pathogenese des RDS hin. Klar abzugrenzen von diesen Mechanismen sind Erkrankungen wie Colitis ulcerosa oder Morbus Crohn. Hier sind die entzündlichen Reaktionen wesentlich stärker ausgeprägt und gehen mit teils massiven Veränderungen des Darmwandaufbaus, im Speziellen der Mucosa, einher. Diese strukturelle Komponente ist beim RDS *per definitionem* ausgeschlossen.

5.1.2 Modelle zur Untersuchung der Pathogenese des RDS

Aufgrund der beschriebenen Befunde kann man also davon ausgehen, dass das Immunsystem an pathophysiologischen Vorgängen des RDS in Form von verschiedenen Entzündungsmediatoren und -zellen beteiligt ist, und es stellt sich die Frage, inwieweit an Modellsystemen weitere Erkenntnisse gewonnen werden können.

Für die genannten inflammatorischen Entitäten wie Morbus Crohn oder Colitis ulcerosa sind schon eine Vielzahl an experimentellen Modellen etabliert, die auch Untersuchungen im Initialstadium der Inflammation erlauben (Wirtz and Neurath, 2000). Neben selektierten Zuchtlinien sowie genetisch veränderten Versuchstieren, die jeweils spontan entzündliche Geschehen entwickeln, sind besonders gut Entzündungsmodelle etabliert, bei denen inflammatorische Prozesse durch verschiedene chemische Substanzen induziert werden.

Prominentes Beispiel ist die Induktion von inflammatorischen Ereignissen im Darm durch *in vivo* Instillation von Tri-Nitro-Benzolsulfonsäure (TNBS), die durch Kontaktsensibilisierung eine IgG-vermittelte Entzündung im Gewebe auslöst (Strober and Fuss, 2006). Die Veränderungen der Darmwand manifestieren sich je nach Protokoll (Tierlinie, Applikationsdauer) akut in einer lokal begrenzten Nekrose (Elson et al, 1995) aufgrund von Entzündungsreaktionen (Michael et al, 2009), aber auch chronisch durch Infiltration von Entzündungszellen sowie in der Freisetzung charakteristischer proinflammatorischer Zytokine (IL-1 β , IL-6, TNF- α) und Enzyme wie der Myeloperoxidase (Kirkova et al, 2007).

Die genannten Modelle sind jedoch zur Untersuchung der subklinischen inflammatorischen Prozesse, die möglicherweise an der Pathogenese des RDS

beteiligt sind, kaum geeignet, da sie mit weitreichenden morphologischen Veränderungen einhergehen.

Der Überblick über die entsprechende Literatur, auch mit Hilfe von „pubmed“ und „medline“ aus den Jahren 1990 bis heute zeigt, dass es kaum Publikationen zu relevanten Modellen des RDS gibt.

In der vorliegenden Arbeit wurde daher versucht, ein neues Modell zu entwickeln, wobei die Frage im Vordergrund stand, inwieweit *in vitro* durch Histamin eine allergisch-entzündliche Reaktion, im Besonderen oxidativer Stress, induziert werden kann.

Die grundlegenden Befunde, die zu dieser Arbeitshypothese geführt haben, sollen nochmals kurz dargestellt werden: in Colonbiopsien von RDS-Patienten wurde eine stärkere Infiltration von Mastzellen in der Mucosa gefunden. Darüber hinaus weisen diese Mastzellen einen erhöhten Aktivierungsgrad auf (Barbara et al, 2004a). Aktivierte Mastzellen wiederum setzen Histamin frei, welches neutrophile Granulozyten zur Produktion von ROS anregt (Benbarek et al, 1999). Aus erhöhten Mastzell-Zahlen bei RDS-Patienten folgt eine erhöhte Freisetzung von Entzündungsmediatoren wie Histamin (Barbara et al, 2004a).

Histamin ist ein biogenes Amin, das als Gewebshormon und Neurotransmitter seine Wirkungen über G-gekoppelte Rezeptoren (H_1 , H_2 , H_3 , H_4) vermittelt. Im Darm befindet es sich in den Granula von Mastzellen und basophilen Granulozyten (Rangachari, 1992), die vorwiegend in der Tela submucosa angesiedelt sind.

Die Freisetzung von Histamin aus Mastzellen führt im Gastrointestinaltrakt über Bindung an H_1 -Rezeptoren zu einer verstärkten Flüssigkeitssekretion und zur Kontraktion der glatten Muskulatur (Rangachari, 1992). Speziell am humanen ENS wurde Histamin als excitatorischer Transmitter beschrieben, wobei alle 4 Rezeptorsubtypen beteiligt sind (Breunig et al, 2007). Diese Wirkung von Histamin trägt zum Zusammenspiel von Immunsystem und dem ENS bei, da Mastzellen besonders häufig in der Nähe von Neuronen angesiedelt sind (Barbara et al, 2004a) und Histamin selbst direkt die Motilität beeinflussen kann (Cao et al, 2004).

Im Folgenden sollen nun die Untersuchungen diskutiert werden, mit denen das Histamin-Modell charakterisiert wurde.

5.1.3 Histamin-induzierte ROS-Sekretion als Modell für RDS

In ersten Versuchen mit intakten Ileumpräparaten konnte im Biolumat mittels Luminol-verstärkter Chemilumineszenz keine signifikante Radikalbildung nachgewiesen werden. Auch die Zugabe von Histamin hatte keine Auswirkung auf die Radikalbildung.

Um eventuelle Diffusionsbarrieren zu beseitigen, wurde daher die Wand des Ileums mit leicht reproduzierbaren Arbeitsschritten in einzelne Schichten aufgetrennt. So ergaben sich drei histologisch verschiedene Präparate: die Mucosa mit Submucosa, die durch stumpfe Präparation aus dem Lumen „geschabt“ wurden; die Tunica muscularis, die von der Serosa her vom Ileumpräparat abpräpariert wurde; und schließlich die letzte verbleibende mittlere Schicht, die Tela submucosa. Bestätigt wurde die Identität dieser histologischen Kompartimente durch die HE-Färbungen der einzelnen Präparate, die später diskutiert werden sollen.

Wurde nun die Radikalproduktion untersucht, so produzierten alle drei Präparate in Tyrode-Lösung lediglich eine sehr geringe, basale Menge ROS. Wurde zu den jeweiligen Geweben Histamin zugegeben [1-100 μM], so führte dies bei Präparaten der Tela submucosa dosisabhängig zu einem deutlichen Anstieg der Radikalbildung. Die Präparate von Mucosa und Tunica muscularis konnten mit Histamin nicht zur Radikalbildung stimuliert werden.

Die anschließend für weitere Versuche gewählte Histaminkonzentration von 50 μM entspricht durchaus pathophysiologischen Bedingungen; in entzündlichen Geweben wurden lokal Histaminkonzentrationen bis 1 mM gemessen (Benbarek et al, 1999).

Durch die beschriebene Präparation des Darmgewebes scheinen also die Strukturen, die für die ROS-Freisetzung verantwortlich sind, erst für Histamin zugänglich gemacht zu werden.

Um zu zeigen, dass der Anstieg der CL durch enzymatische Aktivität zustande kommt, wurden parallel zum Standardversuch Ileumpräparate untersucht, die vor der Messung mit Hitze denaturiert wurden. Aus der Tatsache, dass nach dieser Behandlung der Gewebe keine induzierte ROS-Produktion gemessen werden

konnte, kann man schließen, dass das vitale Darmgewebe ursächlich für die ROS-Produktion verantwortlich ist.

Zur weiteren Charakterisierung des Histamin-Modells wurde untersucht, ob ein Zusammenhang zwischen der Gewebemasse und dem Anstieg der Radikalproduktion besteht. Durch Bestimmung des Regressionskoeffizienten R^2 wurde deutlich, dass keine Korrelation zwischen der Masse des Präparates und der Radikalproduktion besteht. Vorläufige Daten (hier nicht dargestellt) zeigen, dass die unterschiedliche Intensität der Radikalproduktion aufgrund einer Regionalverteilung zustande kommt. Es wurden aufeinanderfolgende Ringpräparate desselben Darms verglichen, die Unterschiede in der Radikalmenge waren erheblich. Die Radikale scheinen also von Zellen oder Enzymen des Darms gebildet zu werden, die nicht gleichmäßig über den Darm verteilt sind. Das wäre eine plausible Erklärung für sehr große Standardabweichungen innerhalb desselben Tieres.

Bei der Messung der CL mit Luminol kann nicht unterschieden werden, ob die Radikale extra- oder intrazellulär entstehen. Um diese Frage für die durch Histamin induzierten Radikale zu klären, wurde Luminol in den Ansätzen zur CL-Messung durch Lucigenin ersetzt. Aufgrund seiner positiven Ladung ist Lucigenin impermeabel und reagiert nur mit extrazellulären Radikalen unter Emission von Licht. Luminol hingegen ist ungeladen, es kann sowohl mit extra- als auch mit intrazellulären Radikalen reagieren. Aus dem Vergleich der Messungen mit Lucigenin und Luminol kann geschlossen werden, dass die Radikale hauptsächlich intrazellulär gebildet werden und dort reagieren.

Weiter wurde untersucht, welche Rolle das Membranpotential und die neuronale Aktivität des ENS in der Reaktion auf Histamin spielen. Hierfür wurde der Kaliumgehalt der physiologischen Tyrode-Lösung auf 90 mM erhöht, was zu einer Depolarisation der Zellmembran führt. In Neuronen wird so die Weiterleitung von Aktionspotentialen verhindert, in glatten Muskelzellen die cytoplasmatische Calciumkonzentration erhöht.

In Abhängigkeit der Kaliumkonzentration konnte kein signifikanter Unterschied im Ausmaß der Radikalproduktion gefunden werden, was deutlich macht, dass die

ROS-Produktion unabhängig von Aktivierung von Neuronen und glatter Muskulatur ist.

Untersuchungen der Wirkung verschiedener Histamin-Rezeptor-Antagonisten (H_1 , H_2 , H_3) sollten den Mechanismus der Stimulation durch Histamin weiter aufklären. Clobenpropit, ein Antagonist am H_3 -Rezeptor, konnte die Radikalproduktion signifikant unterdrücken, während Pyrilamin-Maleat (H_1) diese zwar um ca. die Hälfte reduzieren konnte, doch erreichte dieser Effekt keine statistische Signifikanz. Famotidin (H_2) hatte nur in sehr hohen Konzentrationsbereichen Einfluss auf die Radikalproduktion. Möglicherweise wird die Stimulation der Radikalgenese also im Wesentlichen über H_3 -Rezeptoren vermittelt.

Schließlich stellte sich die Frage, welche Zellen letzten Endes die Radikale generieren.

Typischerweise werden besonders viele Radikale in Phagozyten (Makrophagen und Granulozyten) generiert. Daher lag es nahe, Leukozyten in den präparierten Geweben nachzuweisen, zumal es bereits Untersuchungen zu antioxidativen Effekten von STW 5 und seinen Komponenten an isolierten Leukozyten gibt (Germann, 2005). In der Literatur wird beschrieben, dass Immunzellen in allen Schichten der Darmwand zu finden sind, speziell auch in der Tela submucosa.

Zum Nachweis wurden immunohistochemische Markierungen mit Anti-CD-Antikörpern gegen die vier verschiedene Epitope CD4, CD8, CD31 und CD68 durchgeführt, wobei besonders Makrophagen mit CD4 und CD68 markiert werden können.

Im nativen, unpräparierten Ileum konnten in Mucosa und Submucosa einige CD4-, CD8- und zahlreiche CD68-positive Zellen nachgewiesen werden. Auch mit dem Anti-CD31-Antikörper konnten hier zahlreiche Zellen markiert werden, unter anderen auch Endothelzellen zweier Blutgefäße. Außer den Endothelzellen trugen auch Monozyten, Thrombozyten, Granulozyten und einige T-Zellen das CD31-Epitop. Eine weitere Spezifizierung der markierten Zellen im Anschluss an die Detektion erfolgte jedoch nicht.

In Präparaten der Tela submucosa konnten lediglich einige wenige CD31-positive Zellen gefunden werden, alle anderen Epitopnachweise verliefen an diesen Präparaten negativ.

Es wäre etwas voreilig festzustellen, dass keine Leukozyten in den Tela submucosa-Präparaten vorhanden waren. Es könnte sein, dass die CD-Antigene sehr schnell internalisiert bzw. verändert werden, sodass die spezifischen Antikörper nicht mehr die exakte Struktur zur Bindung vorfinden. Die durchgeführten Färbungen konnten also nicht klären, welche zellulären Komponenten für die ROS-Bildung verantwortlich sind.

Obwohl der enzymatische oder zelluläre Mechanismus der Histamin-stimulierten ROS-Produktion noch weiter geklärt werden muss, könnte er doch einen wichtigen Schritt in der Pathogenese des RDS darstellen, über den die Wirkung von Histamin mit der Entzündungsreaktion verbunden ist. Anhand dieses für den Darm relevanten Modelles sollte daher im Folgenden überprüft werden, inwieweit die in anderen Systemen beschriebenen antioxidativen Eigenschaften von STW 5 auch hier zu beobachten sind.

5.1.4 Effekte von STW 5, seinen Einzelextrakten sowie ausgewählten Inhaltsstoffen auf die durch Histamin stimulierte Radikalproduktion

Unter der Annahme, dass die Histamin-stimulierte Radikalproduktion als darmwandbezogenes *in vitro* Modell für das RDS angesehen werden kann, lag es nahe, die radikalfangenden Eigenschaften von STW 5 und seinen Extrakten hieran zu überprüfen. Sie wurden bereits an verschiedenen chemischen bzw. zellulären Modellen demonstriert (Germann, 2005; Schempp et al, 2006), jedoch nicht an Darmgewebe direkt.

STW 5 und alle konstituierenden pflanzlichen Extrakte konnten den Anstieg der Radikalproduktion dosisabhängig [0,001 - 10 µl/ml] vermindern bzw. völlig unterbinden. Den stärksten antioxidativen Effekt zeigte Pfefferminz, gefolgt von Melisse, Kamille und Süßholz, alle vier wirkten stärker antioxidativ als die Mischung STW 5. Die schwächsten radikalfangenden Eigenschaften zeigte Schöllkraut. Diese Reihenfolge deckt sich mit den Ergebnissen von Germann, Pfefferminz war auch in chemischen und zellulären *in vitro* Modellen der am stärksten antioxidative Extrakt (Germann et al, 2006).

Bei pflanzlichen Auszügen, die chemische Vielstoffgemische darstellen, stellt sich die Frage, ob der Effekt eines Extraktes durch einen einzelnen Inhaltsstoff zustande kommen könnte oder aber mehrere zur Wirkung beitragen. Für weiterführende Versuche haben wir aus einigen Extrakten Inhaltsstoffe ausgewählt, von denen teilweise die Konzentration im Extrakt bzw. in STW 5 bekannt war und/oder die aufgrund ihrer chemischen Struktur radikalfangende Eigenschaften besitzen sollten (vgl. Kap. 5.2.1, Tab. 4).

Aus dem Melissenextrakt wurde bspw. das Phenylpropanderivat Rosmarinsäure untersucht, deren Konzentration im Extrakt [20 mM] beträgt und die bereits in wesentlich geringerer Konzentration [$> 2 \mu\text{M}$] gleich starke antioxidative Effekte hatte (76,3 % Hemmung durch Melissenextrakt [10 µl/ml], 74,6 % Hemmung durch Rosmarinsäure [2 µM]). In diesem Beispiel könnte also Rosmarinsäure allein für die radikalfangende Wirkung des Extraktes verantwortlich sein. Ähnlich verhält es sich mit dem Flavonoid Kämpferol aus *Iberis amara*, dessen Konzentration im Extrakt [230 µM, als Glycosid] ungefähr die gleiche radikalfangende Wirkung hat wie der

Extrakt selbst (64,9 % Hemmung durch Kämpferol [5 μ M], 70,1 % Hemmung durch *Iberis amara* [10 μ l/ml]).

Die ebenfalls untersuchte Kaffeesäure und ihr Ester, die Chlorogensäure, sind quasi ubiquitär in fast allen Pflanzen vorkommende Phenolcarbonsäuren, es gab hier keine Anhaltspunkte bezüglich analytischer Daten.

Beide Substanzen zeigten im gesamten untersuchten Konzentrationsbereich [1 - 20 μ M] signifikante radikalfangende Eigenschaften und waren somit wesentlich stärker wirksam als das zum Vergleich eingesetzte Trolox™.

Bisabolol, das in Kamillenextrakt mit einem Gehalt von [1,5 mM] vorkommt, zeigte keinerlei antioxidative Eigenschaften. Dies war aufgrund der chemischen Struktur auch nicht zu erwarten.

Trotz dieser sehr guten radikalfangenden Wirkungen der chemisch definierten Inhaltsstoffe wird deutlich, dass die Extrakte als Vielkomponentengemische meist wirksamer sind. Dies kann zum einen auf der Tatsache beruhen, dass viele Inhaltsstoffe der einzelnen Extrakte antioxidative Eigenschaften besitzen und sich deren Effekte addieren. Möglicherweise tragen auch Substanzen zur Wirkung bei, die noch nicht identifiziert sind bzw. noch nicht auf radikalfangende Eigenschaften untersucht wurden.

Zum anderen scheint hier das Prinzip des Synergismus zu greifen, das beschreibt, dass die Wirkung eines Extraktes über die Summe der Wirkungen seiner Einzelbestandteile hinausgeht (Williamson, 2001). Die Tatsache, dass die Mischung STW 5 eine größere tatsächliche radikalfangende Kapazität besitzt (86,3 % Hemmung für [10 μ l/ml]) als sich rechnerisch aus den Messungen der Einzelextrakte ergeben würde (72,7 % für [10 μ l/ml]), deutet auf supraadditive Effekte der Gesamtmischung hin.

In anderen Testsystemen konnten bereits antioxidative Eigenschaften von STW 5 sowie seinen Komponenten beschrieben werden.

In chemischen Untersuchungen wie dem Zerfall von AAPH und der enzymatischen Radikalbildung durch die Xanthinoxidase (Germann, 2005) zeigten STW 5 und alle

Einzelextrakte gute radikalfangende Eigenschaften, am stärksten waren in beiden Reaktionen wie in dem in dieser Arbeit vorgestellten Histamin-Modell Pfefferminz und Melisse sowie STW 5, den schwächsten Effekt zeigte der Extrakt aus *Iberis amara*. Diese Reihenfolge konnte auch in einem zellulären Modell (Lungenmakrophagen) bestätigt werden, während in einer Untersuchung mit Buffy-Coat-Zellen Kamillenextrakt die stärkste antioxidative Wirkung hatte, gefolgt von Pfefferminz und Melisse.

Diese Befunde stimmen mit den in dieser Arbeit vorgestellten überein, es gibt jedoch auch kontroverse Ergebnisse:

Schempp et al (2006) untersuchten die Effekte von STW 5 und den Einzelextrakten in diversen Testsystemen ebenfalls auf ihre radikalfangenden Eigenschaften. Interessanterweise war der Frischpflanzenextrakt aus *Iberis amara*, der in allen bisher dargestellten Testsystemen keinen Einfluss auf die Radikalbildung hatte, in der MPO-katalysierten Reaktion der wirksamste, auch Kamille, Süßholz- und Melisse wirkten antioxidativ, während Pfefferminz in diesem Versuch prooxidative Wirkung zeigte.

Aus diesen Daten kann man schließen, dass die antioxidativen Wirkungen eines Extraktes nicht vollständig durch ein einziges Modell beschrieben werden können, es sollten immer verschiedene Untersuchungen zur Charakterisierung herangezogen werden, um eine möglichst umfassende Beschreibung der Eigenschaften zu erhalten.

5.2 RDS und gestörte Darmmotilität

Einige Symptome des RDS wie Völlegefühl, Krämpfe, Diarrhöe, Obstipation und Erbrechen sind auf eine gestörte Motilität des Ileums zurückzuführen. Es ist allerdings noch nicht bekannt, welche pathophysiologischen Mechanismen diesen Veränderungen zugrunde liegen (Thompson, 2008). Eine Ursache sind möglicherweise Störungen der neuronalen Transmission. Durch die Transmitter Kaliumchlorid und Acetylcholin sollte in unserem Modell eine pathologisch stark ausgeprägte Kontraktion ausgelöst und die Effekte von STW 5, seinen Extrakten und ausgewählten Inhaltsstoffen darauf untersucht werden.

Zunächst wurden die pflanzlichen Extrakte bezüglich ihrer Effekte auf die spontane Motilität getestet.

5.2.1 Effekte von STW 5, seinen Einzelextrakten sowie ausgewählten Inhaltsstoffen auf spontane rhythmische Kontraktionen

Es konnte gezeigt werden, dass STW 5 und die enthaltenen Extrakte konzentrationsabhängig die Amplitude der Spontanperistaltik vermindern; die einheitlich applizierte Konzentration der Extrakte von [10 µl/ml] zeigte erwartungsgemäß einen deutlicheren Effekt als die in der Mischung tatsächlich vorliegenden Konzentrationsverhältnisse [0,5 – 2 µl/ml]. Eine Ausnahme stellte der Kümmelextrakt in der anteilig eingesetzten Konzentration [1 µl/ml] dar; hier wurde die Amplitude signifikant vergrößert.

Betrachtet man die Ergebnisse der Extrakte, sowohl in der einheitlichen Konzentration als auch in den der Mischung entsprechenden Konzentrationen, zeigt sich, dass die Mischung STW 5 selbst stets einen größeren hemmenden Effekt auf die Amplitude hat als die Summe der Effekte aller Einzelextrakte. Auch in diesem Modell tragen also, wie bereits bei den Messungen der antioxidativen Eigenschaften der Extrakte, synergistische Mechanismen zur Wirkung der Mischung STW 5 bei.

Um der Frage nachzugehen, ob die Effekte der einzelnen Extrakte einem bestimmten Inhaltsstoff zugeordnet werden können, wurden auch hier verschiedene bekannte Stoffe ausgewählt und untersucht: Menthon, Chlorogensäure, Kämpferol,

Kaffeesäure, Citronellal, Citral, Limonen, Bisabolol, Rosmarinsäure, Carvon und Menthol. (Tab. 4).

Extrakt	Inhaltsstoff	Gehalt im Extrakt	Gehalt in STW 5	Literatur zu spasmolytischer Aktivität
Pfefferminz	Menthon	k. A.	k.A.	Taylor, 1985
	(-)-Menthol	4,16 mM	0,20 mM	k. A.
Kamille	α -Bisabolol	1,47 mM	0,29 mM	Ammon und Kaul, 1992
Melisse	(-)-Citronellal	k. A.	k.A.	Reiter et al, 1985
	Citral	k. A.	k.A.	Reiter et al, 1985
	Rosmarinsäure	21,45 mM	2,15 mM	Ersoy et al, 2008
Kümmel	R-(+)-Limonen	k. A.	k.A.	Reiter et al, 1985
	(+)-Carvon	15,64 mM	1,5 mM	k. A.
Angelika	Chlorogensäure	k. A.	k.A.	Trute et al, 1996
<i>Iberis amara</i>	Kämpferol	0,24 mM	0,03 mM	Trute et al, 1996
Diverse	Kaffeesäure	k. A.	k.A.	Trute et al, 1996

k.A. = keine Angaben

Tab. 4: Ausgewählte Inhaltsstoffe mit Gehaltsangaben aus der Analytik der Firma Steigerwald Arzneimittel GmbH, sowie Literaturangaben, die die spasmolytischen Effekte der Inhaltsstoffe beschreiben.

In der kleinsten untersuchten Konzentration [100 μ M] konnte keine der Substanzen die Amplitude der Spontanperistaltik signifikant beeinflussen. Bisabolol, Carvon, Citral, Citronellal sowie Menthol und Rosmarinsäure verminderten die Amplitude signifikant lediglich in den beiden höheren Konzentrationen [300, 500 μ M].

Da für einzelne Inhaltsstoffe Gehaltsangaben bezüglich der entsprechenden Extrakte vorlagen, war es möglich, einen direkten Vergleich der Wirkungen auf die Amplitude der Spontanmotilität anzustellen. Man kann aus den Ergebnissen schließen, dass die Wirkung eines Extraktes nicht durch die Wirkung einzelner Komponenten zustande kommt.

5.2.2 Effekte von STW 5, seinen Einzelextrakten sowie ausgewählten Inhaltsstoffen auf durch Membran-Depolarisation induzierte Kontraktionen

In den hier vorgestellten Untersuchungen wurde KCl [90 mM] zur Stimulation der Darmpräparate verwendet, um die Kontraktionen auf nicht-intrinsischem Weg einzuleiten: KCl depolarisiert sämtliche Nervenzellmembrane, was an allen Neuronen einmalig zu einem Aktionspotential und in der Folge an den Muskelzellen zu einer einzelnen, synchronen Kontraktion führt. Die Repolarisation und somit die Wiedererregbarkeit der Zellen ist aufgrund der hohen KCl-Konzentration nicht möglich.

Zusätzlich führt die erhöhte KCl-Konzentration in den Muskelzellen zu einer dauerhaften Öffnung spannungsabhängiger Calcium-Kanäle, diese wiederum zu einem anhaltenden Calcium-Strom aus dem Sarkoplasmatischen Retikulum ins Cytosol. Der hohe intrazelluläre Calciumspiegel führt letztlich zu einer Dauerkontraktion der glatten Muskulatur.

Im Versuch führte die Applikation von KCl [90 mM] zu einer initialen phasischen Kontraktion, die im weiteren Verlauf in einer abgeschwächten Dauerkontraktion der Präparate resultierte, es konnte kaum noch periodische Motilität registriert werden. Die Frage nach den Effekten von STW 5, den Einzelextrakten sowie den einzelnen Inhaltsstoffen auf diese durch KCl stimulierte Kontraktion stellte sich letztlich bezüglich des initialen Tonus.

STW 5 sowie die Extrakte von Angelika und Pfefferminz [10 µl/ml] konnten die initiale Kontraktion signifikant reduzieren, bei den Einzelsubstanzen waren Kämpferol [25 µM] und Bisabolol [100 µM] signifikant hemmend wirksam. Das Anticholinergikum Butylscopolamin [10 µM] war ebenfalls hemmend wirksam. Da die Effekte der Extrakte nicht mit den wirksamen Einzelsubstanzen zusammenhängen, kann man annehmen, dass zur Wirkung des jeweiligen Extraktes mehrere Inhaltsstoffe beitragen, also ein Synergismus vorliegt.

Wie bereits erläutert stimuliert die KCl-induzierte Depolarisation die Kontraktion der glatten Muskulatur über spannungsabhängige Calciumkanäle unabhängig von weiteren Rezeptoren. Da die spasmolytischen Wirkungen der pflanzlichen Extrakte trotz anhaltender Applikation von KCl zu beobachten waren, könnte der Mechanismus der spasmolytischen Effekte in der Interaktion von STW 5 mit Enzymen der Calcium-Signalkaskade innerhalb der glatten Muskelzellen vermittelt werden.

5.2.3 Effekte von STW 5, seinen Einzelextrakten sowie ausgewählten Inhaltsstoffen auf durch Acetylcholin stimulierte Kontraktionen

Bei der Steuerung der intestinalen Motilität spielt neben anderen Neurotransmittern Acetylcholin (ACh) eine zentrale Rolle. ACh ist Signalüberträger an sympathischen und parasympathischen präganglionären, sowie an parasympathischen postganglionären Synapsen. Im ENS führt ACh zu einer pharmako-mechanischen Kopplung: über G-gekoppelte muskarinerge Rezeptoren (M_3) werden intrazelluläre Calciumspiegel erhöht, was zu einer erhöhten Frequenz und einem erhöhten Tonus der gastrointestinalen Motilität führt.

Um eine starke pathophysiologische Kontraktion zu simulieren, wurde ACh in der pharmakologischen Konzentration von [100 μ M] eingesetzt. Dies führte an den Ileumpräparaten zu einer tonischen Kontraktion, die über den gesamten Applikationszeitraum auf einem konstanten Maximum gehalten wurde, die ursprüngliche spontane Peristaltik kam zum Erliegen. Auch in dieser Versuchsreihe wurde die Auswertung des Tonus als aussagekräftiges Ergebnis angegeben.

STW 5 konnte als einziger pflanzlicher Extrakt den Tonus signifikant vermindern, der zum Vergleich eingesetzte, an muskarinergen Rezeptoren kompetitive Antagonist *N*-Butylscopolamin hatte nur geringe hemmende Wirkung. Die anteilig eingesetzten Einzelextrakte hatten unter diesen Bedingungen keine signifikanten kontraktionsmodulierenden Wirkungen. Die ausgewählten Inhaltsstoffe konnten den Peak der durch ACh [100 μ M] stimulierten Kontraktion nicht wesentlich beeinflussen.

Untersuchungen zu spasmolytischen Eigenschaften von STW 5 und den Einzelextrakten wurden von Hagelauer am Ileum der Maus durchgeführt (Hagelauer 2007). Dort wurde gezeigt, dass die Mischung STW 5 sowie Pfefferminz - und Mariendistelextrakt [10 µl/ml] hemmend auf die durch ACh [10 µM] stimulierte tonische Kontraktion wirkten, aber auch auf durch Prostaglandin F_{2α}, Substanz P und Neurotensin induzierte Kontraktionen.

Auch am Meerschweinchen-Ileum konnten *in vitro* nach Stimulation mit ACh die spasmolytischen Eigenschaften von STW 5 beschrieben werden (Ammon et al, 2006), STW 5 und Pfefferminz zeigten die stärkste Hemmung der Kontraktion, *Iberis amara* zeigte hingegen eine tonisierende Wirkung.

Ebenfalls am Meerschweinchen-Darm konnten Histamin-stimulierte Kontraktionen durch STW 5 und seine Komponenten mit Ausnahme von Mariendistel, Schöllkraut und *Iberis amara* gehemmt werden (Heinle et al, 2006).

Im vorangegangenen Abschnitt konnte aufgezeigt werden, dass die spasmolytischen Effekte von STW 5 und seinen Einzelextrakten unabhängig von der Art des Stimulus wirksam sind. Dies lässt schlussfolgern, dass die pflanzlichen Extrakte intrazellulär in die Calcium-Signalkaskade eingreifen oder ihre Wirkung direkt an den kontraktile Einheiten der glatten Muskelzellen entfalten.

Mit KCl bzw. ACh konnten an diesem Modell zwei mögliche pathophysiologische Prozesse simuliert werden, die zu den Symptomen des RDS führen könnten. An ihnen wurde gezeigt, dass STW 5, seine Extraktkomponenten sowie isolierte Inhaltsstoffe sowohl unter physiologischen, als auch unter pathophysiologischen Bedingungen spasmolytisch auf die Motilität des Ileums wirken und somit einen Beitrag zur therapeutischen Wirksamkeit von STW 5 leisten können.

6 Zusammenfassung

Das Reizdarmsyndrom (RDS) gehört zu den häufigsten gastrointestinalen Erkrankungen in der Bevölkerung westlicher Länder. Die Symptome dieser funktionellen Erkrankung wie Völlegefühl, abdominale Schmerzen und Störungen der Darmentleerung werden vor allem durch eine gestörte Motilität verursacht, doch ist deren Pathogenese noch nicht eindeutig geklärt. Neben Störungen von motorischen Funktionen des Darms, des enterischen Nervensystems und einer erhöhten Sensitivität intestinaler Afferenzen sind inflammatorische Prozesse und in diesem Zusammenhang reaktive Sauerstoffspezies wichtige Aspekte der multifaktoriellen Pathogenese.

In der Therapie des Reizdarmsyndroms haben Phytotherapeutika einen hohen Stellenwert. Ein für diese Indikation klinisch gut etabliertes Arzneimittel ist STW 5 (Iberogast[®]), das in dieser Arbeit zum einen auf radikalfangende bzw. antioxidative, zum anderen auf kontraktionsmodulierende Effekte hin untersucht werden sollte.

Da es derzeit noch kein valides *in vitro* Modell für das RDS gibt, sollte zunächst ein Solches für intestinalen oxidativen Stress entwickelt werden. Dabei gingen wir davon aus, dass Histamin ein wichtiger Mediator in der Pathogenese des RDS ist und untersuchten, inwieweit dieses die Radikalproduktion von Ileumpräparaten *in vitro* stimulieren kann. Es zeigte sich, dass die ileale Darmwand *per se* nur eine minimale, durch Luminol-verstärkte Chemilumineszenz messbare Produktion von reaktiven Sauerstoffspezies (ROS) aufwies, die bei intakten Präparaten nicht stimulierbar war. Wurde allerdings die Darmwand weiter in die verschiedenen Schichten disseziert, so war vor allem in der Tela submucosa in Gegenwart von Histamin eine dosisabhängige Steigerung der Radikalproduktion zu finden.

Die weitere Charakterisierung ergab, dass diese Radikalproduktion durch das Antioxidans Trolox[™] sowie den H₃-Rezeptorantagonisten Clobenpropit dosisabhängig gehemmt werden konnte. H₁ und H₂-Antagonisten waren deutlich weniger effektiv. Messungen mit dem zellimpermeablen CL-Indikator Lucigenin legen nahe, dass die Radikalbildung intrazellulär erfolgte. Versuche, bei denen durch

Verwendung von KCl-reicher Tyrode-Lösung das Membranpotential der Zellen depolarisiert wurde, weisen darauf hin, dass neuronale Tätigkeit oder potentialgesteuerte Kanäle nicht beteiligt sind. Daraus, dass keine Korrelation von Trockengewicht und entsprechender Radikalproduktion der einzelnen Präparate festgestellt werden konnte, kann geschlossen werden, dass eine sehr inhomogene Verteilung der ROS-Produktion in der Darmwand vorliegt.

Bei der Frage nach der Quelle für die reaktiven Sauerstoffspezies standen aufgrund ihrer physiologischen Funktion Leukozyten im Fokus. Durch immunohistochemische Markierungen der Oberflächenproteine CD4, CD8, CD31 und CD68 sollte Aufschluss über ihre Identität und Verteilung in der Submucosa des Ileums gegeben werden. Im Gegensatz zu intakten Ileumpräparaten, wo zahlreiche Zellen mit den jeweiligen Antigenen in der Tela submucosa gefunden wurden, war die Nachweisreaktion in Präparaten der isolierten Tela submucosa negativ. Zur Definition der Radikalquelle sind also weiterführende Untersuchungen notwendig.

Obwohl also die mechanistischen Grundlagen dieses neuen Modelles nicht genau geklärt sind, sollten STW 5 und seine Einzelextrakte hier an diesem Modell auf ihre antioxidativen Eigenschaften untersucht werden.

Es zeigte sich, in Kongruenz mit Untersuchungen zu antioxidativen Eigenschaften von STW 5 durch Germann (2005), dass alle Extrakte sowie die Mischung STW 5 die Radikalproduktion konzentrationsabhängig verringern konnten; besonders stark wirkten Pfefferminz-, Kamillen- und Melissenextrakt, Schöllkraut wirkte relativ schwach. An diesem Modell, wie auch an anderen, wurde ein typischer Synergismus gefunden, trotzdem wurde exemplarisch der in der Pharmakognosie wichtigen Frage nachgegangen, inwieweit einzelne Inhaltsstoffe für die Wirkung eines Extraktes verantwortlich sein können.

Potenteste radikalfangende Substanzen waren die zu den Hydroxycimtsäuren gehörende Kaffeesäure sowie deren Ester Chlorogensäure und Rosmarinsäure, die in vielen Pflanzen vorkommen und bereits in sehr geringen Konzentrationen die Radikalgeneration abschwächen konnten. Bisabolol aus Kamillenextrakt hingegen zeigte keinerlei antioxidative Eigenschaften.

Die radikalfangende Wirkung mancher Extrakte ist also durch bekannte Antioxidantien erklärbar, bei anderen sind offensichtlich noch weitere, bisher nicht identifizierte Substanzen wirksam.

Neben der Untersuchung der antioxidativen Eigenschaften der pflanzlichen Extrakte, die durchaus auch zu der therapeutischen Wirkung von STW 5 beitragen können, sollte in einer zweiten Versuchsreihe der Frage nachgegangen werden, inwieweit auch Effekte auf eine gestörte Motilität zu finden sind. Dazu sollte im Organbad, das unter isometrischen Bedingungen die Messung der Kontraktionskräfte von Darmpräparaten erlaubt, die möglichen Auswirkungen auf durch Kaliumchlorid-Depolarisation bzw. Applikation einer erhöhten Acetylcholin-Konzentration im Vergleich zur Spontanrhythmik erfasst werden.

Ausgehend von dem schon früher erhobenen Befund, dass STW 5 die Spontanrhythmik hemmt und damit spasmolytisch wirkt, konnte dieser Effekt zunächst bestätigt werden, allerdings wurden hier die eingesetzten Konzentrationen der Einzelextrakte dem tatsächlichen Mischungsverhältnis in STW 5 angepasst, d.h. auf den entsprechenden Anteil verringert. Selbst unter diesen Bedingungen zeigten neben STW 5 Pfefferminz, Mariendistel und Süßholz hemmende Wirkung, während Kümmel in dieser größeren Verdünnung eine prokinetische Wirkung hatte.

Ausgewählte Inhaltsstoffe der verschiedenen Extrakte verminderten in pharmakologischen Konzentrationen die Amplitude der Spontanmotilität lediglich tendenziell. Zur spasmolytischen bzw. prokinetischen Wirkung des jeweiligen Extraktes scheinen also synergistische Effekte beizutragen, die weiterer Klärung bedürfen.

Die Stimulation der Darmwand mit 90 mM Kaliumchlorid-Tyrode-Lösung führte zu tonischen Kontraktionen mit Abnahme der peristaltischen Oszillationen, wobei sich allerdings die Kontraktionskraft nach einem initialen phasischen Peak auf einem verminderten Plateau einpendelte.

Die Effekte von STW 5 und seinen Einzelextrakten zeigten sich vor allem in einer Verminderung der Peakhöhe, wobei STW 5, Pfefferminz und Angelika am stärksten wirksam waren. Von den untersuchten Einzelsubstanzen waren vor allem Kämpferol

und Bisabolol hemmend wirksam, ebenso das zum Vergleich eingesetzte *N*-Butylscopolamin in einer Konzentration von 10 μ M.

Diese beobachteten Befunde sind vermutlich auf eine Calcium-antagonistische Wirkung der Einzextrakte bzw. Einzelsubstanzen zurückzuführen.

In der zweiten Versuchsreihe, bei der die Ileumpräparate mit 100 μ M Acetylcholin stimuliert wurden, zeigte sich, dass STW 5 und Butylscopolamin tendenziell kontraktionshemmend wirkten, die Einzextrakte dagegen keine signifikanten Effekte aufwiesen.

Generell belegen die Befunde der vorliegenden Arbeit, dass Phytotherapeutika vielfältige pharmakologische Optionen aufweisen und daher in der Therapie multifaktorieller Erkrankungen, speziell beim RDS, gut geeignet sind.

7 Literaturverzeichnis

Akbar A, Walters JR, Ghosh S (2008): Review article: visceral hypersensitivity in irritable bowel syndrome: molecular mechanisms and therapeutic agents. *Aliment Pharmacol Ther*; 30: 423-435.

Akiho H, Deng Y, Blennerhassett P, Kanbayashi H, Collins SM (2005): Mechanisms underlying the maintenance of muscle hypercontractility in a model of postinfective gut dysfunction. *Gastroenterology*; 129(1): 131-141.

Ammon HPT, Kaul R (1992): Pharmacology of chamomile and its components. *Deutsche Apotheker Zeitung*; 123(41), Suppl 27: 3-26.

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

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

Barbara G, Stanghellini V, de Giorgio R, Cremon C, Cottrell GS, Santini D, Pasquellini G, Morselli-Labate AM, Grady EF, Bunnet NW, Collins SM and Corinaldesi R (2004a): Activated mast cells in proximity to colonic nerves correlate with abdominal pain in irritable bowel syndrome. *Gastroenterology*; 126: 693-702.

Barbara G, De Giorgio R, Stanghellini V, Cremon C, Salvioli B, Corinaldesi R (2004b): New pathophysiological mechanisms in irritable bowel syndrome. *Aliment Pharmacol Ther*; 20 Suppl. 2: 1-9.

Barbara G, Stranghellini V, Cremon C, de Giorgio R, Gargano L, Cogliandro R, Pallotti F, Corinaldesi R (2008): Probiotics and irritable bowel syndrome: rationale and clinical evidence for their use. *J Clin Gastroenterol* 42; Suppl. 3: Pt 2: 214-217.

Benbarek H, Mouithys-Mickalad A, Deby-Dupont G, Deby C, Grulke S, Nemmar A, Lamy M, Serteyn D (1999): High concentrations of histamine stimulate equine polymorphonuclear neutrophils to produce reactive oxygen species. *Inflamm Res*; 48(11): 594-601.

Breunig E, Michel K, Zeller F, Seidl S, v.Weyhern C, Schemann M (2007): Histamine excites neurones in the human submucosa plexus through activation of H1, H2, H3 and H4 receptors. *J Physiol*; 583(2): 731-742.

Camilleri M, Andresen V (2009): Current and novel therapeutic options for irritable bowel syndrome management. *Dig Liver Dis*; 41(12): 854-862.

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

Cerutti PA (1994): Oxy-radicals and cancer. *Lancet*; 344: 862-863.

Chadwick V, Chen W, Shu D, Paulus B, Bethwaite P, Tie A, Wilson I (2002): Activation of the Mucosal Immune System in Irritable Bowel Syndrome. *Gastroenterol*; 122: 1778-1783

Chisolm GM, Steinberg D (2000): The oxidative hypothesis of atherogenesis: an overview. *Free Radic Biol Med*; 28: 1815-1826.

Codling C, O'Mahony L, Shanahan F, Quigley EM, Marchesi JR (2010): A molecular analysis of fecal and mucosal bacteria communities in irritable bowel syndrome. *Digestive Diseases & Sciences*; 55(2): 392-397.

Collins SM, Piche T, Rampal P (2001): The putative role of The putative role of inflammation in the irritable bowel syndrome. *Gut*; 49: 743-745.

Cremon C, Gargano L, Morselli-Labate AM, Santini D, Cogliandro RF, de Giorgio R, Stanghellini V, Corinaldesi R, Barbara G (2009): Mucosal immune activation in irritable bowel syndrome: gender dependence and association with digestive symptoms. *Am J Gastroenterol*; 104: 392-400.

Dalle-Donne I, Rossi R, Colombo R, Giustarini D, Milzani A (2006): Biomarkers of oxidative damage in human disease. *Clin Chem*; 52: 601-623.

Drossman DA, Dumitrascu DL (2006): ROME III: New standard for functional gastrointestinal disorders. *J Gastrointest Liver Dis*; 15: 237-241.

Ersoy S, Orhan I, Turan NN, Sahan G, Ark M, Tosun F (2008): Endothelium-dependent induction of vasorelaxation by *Melissa officinalis* L. ssp. *officinalis* in rat isolated thoracic aorta. *Phytomedicine*; 15(12): 1087-1092.

Ford AC, Talley NJ, Schoenfeld PS, Quigley EM, Moayyedi P (2009): Efficacy of antidepressants and psychological therapies in irritable bowel syndrome: systematic review and meta-analysis. *Gut*; 58: 367-378.

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

- Germann I (2005): Charakterisierung der radikalfangenden Eigenschaften pflanzlicher Entzündungshemmer. Dissertation der Fakultät für Chemie und Pharmazie der Eberhard Karls Universität Tübingen.
- 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*; 13, Suppl 5: 45-50.
- Graf BA, Milbury PE, Blumberg JB (2005): Flavonols, flavones, flavanones, and human health: epidemiological evidence. *J Med Food*; 8 (3): 281-290.
- Grisham MB (1994): Oxidants and free radicals in inflammatory bowel disease. *Lancet*; 344: 859-861.
- Gundermann KJ, Vinson B, Hänicke S (2004): Das Reizmagensyndrom bei Kindern: Eine retrospektive Studie mit einem Phytopharmakon. *Päd*; 10: 1-6.
- Gustav D, Deuse U, Michalsen A (2006): Chronische Erkrankungen integrativ. Konventionelle und komplementäre Therapie, Urban & Fischer, München.
- 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, Gutteridge J (2007): Free radicals in biology and medicine. Oxford University Press, New York.
- Halvorson HA, Schlett CD, Riddle MS (2006): Postinfectious irritable bowel syndrome – a meta-analysis. *Am J Gastroenterol*; 101: 1894-1899.
- Heinle H, Hagelauer D, Pascht U, Kelber O, Weiser D (2006): Intestinal spasmolytic effects of STW 5 (Iberogast®) and its components. *Phytomedicine*; 13, Suppl 5: 75-79.
- 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.

Kapeller J, Houghton LA, Mönnikes H, Walstab J, Möller D, Bönisch H, Burwinkel B, Autschbach F, Funke B, Lasitschka F, Gassler N, Fischer C, Whorwell PJ, Atkinson W, Fell C, Büchner KJ, Schmidtman M, van der Voort I, Wisser AS, Berg T, Rappold G, Niesler B (2008): First evidence for an association of a functional variant in the microRNA-510 target site of the serotonin receptor-type 3E gene with diarrhea predominant irritable bowel syndrome.

Hum Mol Genet; 17: 2967-2977.

Kirkova M, Kesiova M, Konstantinova S, Alexandrova A, Petrov L, Tsvetanova E, Todorov S (2007): In vivo effects of amtolmetin guacyl on lipid peroxidation and antioxidant defence systems in different models of gastrointestinal injury.

Auton Autacoid Pharmacol 27(1): 63-70.

Klein-Galczinsky C, Sassin I (1999): Anwendungsbeobachtung zur Wirksamkeit und Verträglichkeit von Iberogast in der Therapie des Colon irritabile. Phytotherapie an der Schwelle zum neuen Jahrtausend (Abstracts); 125: (P25).

Kohen R, Nyska A (2002): Oxidation of biological systems: oxidative stress phenomena, antioxidants, redox reactions, and methods for their qualification.

Toxicol Pathol; 30: 620-650.

Laufer S (2002): Biochemie und Mediatoren der Entzündung. In Laufer S, Gay S, Brune K (Hrsg.): Rheumatische Erkrankung und Entzündung.

Georg Thieme Verlag Stuttgart, 17-57.

Liebregts T, Adam B, Bredack C, Roth A, Heinzl S, Lester S, Downie-Doyle S, Smith E, Drew P, Talley NJ, Holtmann G (2007): Immune activation in patients with irritable bowel syndrome. Gastroenterology; 132(3): 913-920.

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

Mayer EA, Naliboff BD, Chang L, Coutinho SV (2001): Stress and irritable bowel syndrome. Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol; 280: G519-524.

Madisch A, Holtmann G, Plein K, Hotz J (2004): 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.

Magder S (2006): Reactive oxygen species: toxic molecules or spark of life?

Crit Care; 10: 208.

McFarland LV, Dublin S (2008): Meta-analysis of probiotics for the treatment of irritable bowel syndrome. World J Gastroenterol; 14: 2650-2661.

Michael S, Kelber O, Hauschildt S, Spänel-Borowski K, Nieber K (2009): Inhibition of inflammation-induced alterations in rat small intestine by the herbal preparations STW 5 and STW 6. *Phytomedicine*; 16: 161-171.

Michael S (2008): Untersuchungen zum Einfluss von Adenosinrezeptorliganden und des Pflanzenextraktes STW 5 auf Entzündungsprozesse am Dünndarm der Ratte. Dissertation der Fakultät für Biowissenschaften, Pharmazie und Psychologie der Universität Leipzig

Monographie der Kommission E Angelikawurzel (1990): Monographie der Kommission E des BGA. Angelikawurzel. Bundesanzeiger (01.06.1990).

Monographie der Kommission E Kamillenblüten (1990): Monographie der Kommission E des BGA. Kamillenblüten. Bundesanzeiger (13.03.1990).

Monographie der Kommission E Kümmel (1990): Monographie der Kommission E des BGA. Kümmel. Bundesanzeiger (01.02.1990).

Monographie der Kommission E Mariendistel Früchte (1986): Monographie der Kommission E des BGA. Mariendistel Früchte. Bundesanzeiger (13.03.1986).

Monographie der Kommission E Melissenblätter (1990): Monographie der Kommission E des BGA. Melissenblätter. Bundesanzeiger (13.03.1990).

Monographie der Kommission E Pfefferminzblätter (1990): Monographie der Kommission E des BGA. Pfefferminzblätter. Bundesanzeiger (13.03.1990).

Monographie der Kommission E Schöllkraut (1985): Monographie der Kommission E des BGA. Schöllkraut. Bundesanzeiger (15.05.1985).

Monographie der Kommission E Süßholzwurzel (1991): Monographie der Kommission E des BGA. Süßholzwurzel. Bundesanzeiger (21.09.1991).

Murphy KM, Travers P, Walport M., Seidler L, Haüßer-Siller I (2009): *Janeway Immunologie*. Spektrum Akademischer Verlag Heidelberg, 7. Auflage.

Öhman L, Lindmark AC, Isaksson S, Posserud I, Strid H, Sjövall H, Simren M (2009): B-cell activation in patients with irritable bowel syndrome (IBS). *Neurogastroenterol Motil*; 21(6): 644-650.

O'Mahony L, McCarthy J, Kelly P, Hurley G, Luo F, Chen K et al (2005): Lactobacillus and bifidobacterium in irritable bowel syndrome: symptom responses and relationship to cytokine profiles. *Gastroenterology*; 128: 541-551.

- O'Sullivan M, Claton N, Breslin NP, Harman I, Bountra C, McLaren A (2000): Increased mast cells in the irritable bowel syndrome. *Neurogastroenterol Motil*; 12(5): 449-57.
- Piconi L, Quagliario L, Ceriello A (2003): Oxidative stress in diabetes. *Clin Chem Lab Med*; 41: 1144-1149.
- Rahimi R, Nikfar S, Rezaie A, Abdollahi M (2009): Efficacy of tricyclic antidepressants in irritable bowel syndrome: a meta-analysis. *World J Gastroenterol*; 15: 1548-1553.
- Rangachari PK (1992): Histamine: mercurial messenger in the gut. *Am J Physiol*. 262(1Pt1):G1-G13.
- Reichling J, Saller R (2002): *Iberis amara L.* (Bittere Schleifenblume) – Profil einer Heilpflanze. *Forsch Komplementärmed Klass Naturheilk*; 9, Suppl 1: 21-33.
- Reiter M, Brandt W (1985): Relaxant effects on tracheal and ileal smooth muscles of the guinea pig. *Arzneimittel-Forschung*; 35(1A): 408-414.
- Rösch W, Vinson B, Sassin I (2002): A randomized clinical trial comparing the efficacy of a herbal preparation STW 5 with the prokinetic drug cisapride in patients with dysmotility type of functional dyspepsia. *Z Gastroenterol*; 40: 401-408.
- Saito YA, Mitra N, Mayer EA (2010): Genetic approaches to functional gastrointestinal disorders. *Gastroenterology*; 138: 1276-1285.
- Schempp H, Weiser D, Kelber O, Elstner EF (2006): Radical scavenging and anti-inflammatory properties of STW 5 and its components. *Phytomedicine*; 13, Suppl 5: 36-44.
- Siems W, Krämer K, Grune T (Hrsg.) (2005): *Oxidativer Stress und Pharmaka*. GOVI-Verlag Pharmazeutischer Verlag GmbH, Eschborn,
- Spiller R, Garsed K (2009): Postinfectious irritable bowel syndrome. *Gastroenterology*; 136(6): 1979-1988.
- Strober W, Fuss IJ (2006): Experimental models of mucosal inflammation. *Adv Exp Med Biol*; 579: 55-97.
- Talley NJ (2006): Irritable bowel syndrome. *Intern Med J*; 36: 724-728.
- Talley NJ (2009): Pathogenesis of irritable bowel syndrome: are genes a SERT-ainty? *J Clin Gastroenterol*; 43: 902-904.

- Taylor BA (1985): Mechanism by which peppermint oil exerts relaxant effect on gastrointestinal smooth muscle. *J Pharm Pharmacol*; 37 (Suppl): 104.
- Thompson WG (2006): Understanding the irritable gut. The functional gastrointestinal disorders. McLean, Virginia, Degnon Associates Inc.
- Tieu K, Ischiropoulos H, Przedborski S (2003): Nitric oxide and reactive oxygen species in Parkinson's disease. *IUBMB Life*; 55: 329-335.
- Trute A, Gross J, Mutschler E, Nahrstedt A (1996): *In vitro* antispasmodic compounds of the dry extract obtained from *Hedera helix*. *Planta medica*; 63: 125-129.
- Voss H, Herrlinger R (1974): Taschenbuch der Anatomie II. Gustav Fischer Verlag Stuttgart, 15. Auflage; S. 61.
- Wagner H (2006): Multitarget therapy – the future for more than just functional dyspepsia. *Phytomedicine*; 13, Suppl 5: 122-129.
- Wegener T, Wagner H (2006): The active components and the pharmacological multi-target principle of STW 5 (Iberogast). *Phytomedicine*; 13, Suppl 5: 20-35.
- Weston AP, Biddle WL, Bhatia PS, Miner PB (1993): Terminal ileal mucosal mast cells in Irritable Bowel Syndrome. *Dig Dis Sci*; 38: 1590-5
- Whorwell PJ (2007): The growing case for an immunological component to irritable bowel syndrome. *Clin Exp Allergy*; 37: 805-807.
- Williamson EW (2001): Synergy and other interactions in phytomedicines. *Phytomedicine*; 8(5): 401-409.
- Wirtz S, Neurath MF (2000): Animal models of intestinal inflammation: new insights into the molecular pathogenesis an immunotherapy of inflammatory bowel disease. *Int J Colorectal Dis*; 15: 144-160.
- Wood JD (2004): Enteric neuroimmunophysiology and pathophysiology. *Gastroenterology*; 127: 635-657.
- Zuo XL, Li YQ, Li WJ, Guo YT, LU XF, Li JM, Desmond PV (2007): Alterations of food antigen-specific serum immunoglobulins G and E antibodies in patients with irritable bowel syndrome and functional dyspepsia. *Clin Exp Allergy*; 37: 823-830.

Danksagung

Am Ende dieses „Werkes“ ist es höchste Zeit, mich bei den vielen, vielen, die zum Gelingen dieser Arbeit auf vielfältige Weise beigetragen haben, zu bedanken.

Mein ganz besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr. Helmut Heinle für die Überlassung des interessanten Themas, die hervorragende Betreuung in allen Phasen der Arbeit, die angenehme Atmosphäre im Labor, für die Möglichkeit der Teilnahme an Kongressen und für die außergewöhnliche, stete Unterstützung beim Verfassen dieser Dissertation und darüber hinaus.

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

Der Firma Steigerwald Arzneimittel GmbH, insbesondere Herrn Dr. Olaf Kelber, danke ich für die Bereitstellung der Extrakte, für die Möglichkeit zur Teilnahme an Kongressen und die hervorragende kollegiale Zusammenarbeit.

Ein herzliches Dankeschön geht an Frau Elke Maier und ihren Kollegen der Arbeitsgruppe Prof. Dr. Klessen am Anatomischen Institut der Universität Tübingen für die geduldige Hilfsbereitschaft und Durchführung der HE-Färbungen, sowie für die Anfertigung der Fotos.

Bei der Arbeitsgruppe Prof. Dr. Ralf Kinscherf am Zentrum für Biomedizin und Medizintechnik Mannheim, Sektion Makroskopische Anatomie der Universität Heidelberg, speziell bei Silke Vorwald bedanke ich mich sehr herzlich für die Durchführung der immunohistochemischen Markierungen.

Dr. Daniela Kempe, Dr. Teresa Ackermann sowie Dr. Rexhep Rexhepaj danke ich für die zuverlässige Bereitstellung der Mäuse und ihre kollegiale Unterstützung in vielfältiger Form.

Auch bei allen anderen Mitarbeitern am Institut bedanke ich mich für ihre unkomplizierte, freundliche Hilfsbereitschaft.

Ganz ganz herzlich bedanke ich mich bei all meinen Kolleginnen für die vielen schönen Stunden im Labor, für die angenehme Atmosphäre, für die tatkräftige

Unterstützung, für das stete Interesse an meiner Arbeit und die ermutigenden Worte in schwierigen Phasen: Sophie Liske, Dr. Daniela Domke, Dr. Dayong Zhang, Dr. Vanaja Kenchappa, Karin Klein, Andrea Waible, Nina, Viktoria, Donya und Dünja. An dieser Stelle möchte ich die Kollegen und Kolleginnen aus der Apotheke des Klinikums Karlsruhe nicht vergessen, die mich eigentlich erst auf die Idee gebracht haben, diese Arbeit anzugehen, und die durch ihr reges Interesse am Fortgang der Arbeit zu meiner Motivation beigetragen haben.

Den Kollegen aus der Delphinen-Apotheke in Oberkirch danke ich für ihre spontane Flexibilität, für ihr Verständnis und ihre Unterstützung in jeder Hinsicht.

Die letzten Zeilen sind denen gewidmet, ohne die ich nie den Mut aufgebracht hätte, diese Dissertation anzugehen: allen voran meinen Eltern, die mir so Vieles ermöglicht haben und mich stets rückhaltlos unterstützen und ermutigen; meinen Geschwistern, die durch ihr Interesse und ihren Zuspruch zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben; und schließlich meinem Mann Frank, der mit Loyalität und grenzenloser Nachsicht die Arbeit an dieser Dissertation begleitet hat.

Meine akademischen Lehrer

Prof. Dr. Dr. K. Aktories

Prof. Dr. A. Bechthold

Dr. P. Bisel

Dr. H. Bochow

Prof. Dr. A.-W. Frahm

Prof. Dr. L. Hein

Dr. G. Isele

Prof. Dr. R. Jackisch

Prof. Dr. M. Jung

Prof. Dr. M. Kist

Prof. Dr. N. Klugbauer

Dr. U. Linder

Prof. Dr. I. Merfort

Prof. Dr. D. Meyer

Dr. G. Modjesch

Prof. Dr. M. Müller

Prof. Dr. M. Plehn

Prof. Dr. R. Schubert

Prof. Dr. K. Starke

Prof. Dr. R. Süß

Prof. Dr. B. Szabo

Dr. F.-J. Volk

Dr. R. Wallmichrath

Dr. G. Weitnauer

Prof. Dr. B. Wunsch

Lebenslauf

Persönliche Daten

Name Katrin Maria Merkel, geb. Wald
Geburtstag 17.11.1981 in Achern
Seit 2009 verheiratet mit Frank Merkel, eine Tochter

Ausbildung

1988 – 1992 Schloßbergschule, Kappelrodeck
1992 – 2001 Gymnasium Heimschule Lender, Sasbach

Okt. 2001 – Apr. 2006 Studium der Pharmazie an der
Albert-Ludwigs-Universität, Freiburg

Mai 2006 – Okt. 2006 1. Praktikumshalbjahr in der Apotheke des
Städt. Klinikums, Karlsruhe

Nov. 2006 – Apr. 2007 2. Praktikumshalbjahr in der Delphinen-Apotheke,
Oberkirch

06. Juni 2007 Approbation als Apothekerin

Berufliche Tätigkeit

Juni 2007 – Aug. 2009 Delphinen-Apotheke, Oberkirch
Okt. 2007 – Feb. 2009 Lehrtätigkeit an der Schule für Logopädie der
Universität Tübingen

Sept. 2007 – Feb. 2010 Anfertigung der Dissertation „Wirkungen von
pflanzlichen Extrakten auf murines Ileum:
Untersuchungen zum Reizdarmsyndrom an *in vitro*
Modellen“ unter der Anleitung von Herrn Prof. Dr. H.
Heinle am Physiologischen Institut der Eberhard Karls
Universität, Tübingen

Aug. 2009 – Sept. 2010 Elternzeit, Fertigstellung der Dissertation