

II. Medizinische Klinik und Poliklinik der  
Technischen Universität München  
Klinikum rechts der Isar  
(Leitung: Univ.-Prof. Dr. R. M. Schmid)

**Einfluss von Thujonen und Omeprazol auf die Aktivität der  
glatten Muskelzelle im Ileum der Ratte**

**Stefan Huhnstock**

Vollständiger Abdruck der von der Fakultät für Medizin  
der Technischen Universität München zur Erlangung des akademischen Grades  
eines

**Doktors der Medizin**  
genehmigten Dissertation.

Vorsitzender : Univ.- Prof. Dr. D. Neumeier

Prüfer der Dissertation :

1. apl. Prof. Dr. H.- D. Allescher
2. Univ.- Prof. Dr. M. Ebert

Die Dissertation wurde am 08.04.2009 bei der Technischen Universität München  
eingereicht und durch die Fakultät für Medizin am 24.03.2010 angenommen.

**Meinen Eltern gewidmet**

# Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung.....	6
2	Material und Methoden.....	8
2.1	Versuchstiere.....	8
2.2	Versuchsanordnung.....	8
2.3	Versuchsdurchführung.....	10
2.3.1	Einfluss auf den Basaltonus die Ruheaktivität der Muskelstreifen.....	10
2.3.2	Einfluss auf die pharmakologisch stimulierten Muskelstreifen.....	10
2.3.3	Einfluss auf den elektrisch stimulierten Muskelstreifen.....	11
2.3.4	Einfluss auf den elektrisch stimulierten Muskelstreifen unter nicht- adrenergen, nicht- cholinergen Bedingungen.....	12
2.3.5	Einfluss auf die elektrisch induzierte Relaxation unter nicht- adrenergen, nicht- cholinergen Bedingungen.....	12
2.4	Datenauswertung.....	13
2.5	Verwendete Substanzen.....	14
2.6	Statistik.....	15
3	Ergebnisse.....	16
3.1	Charakterisierung der beobachteten Ergebnisse.....	16
3.1.1	Basalaktivität.....	16
3.1.2	Einfluss auf den pharmakologisch stimulierten Muskelstreifen.....	17
3.1.3	Wirkung der elektrisch induzierten Feldstimulation auf den in vitro Muskelstreifen.....	18
3.1.4	Einfluss der elektrischen Feldstimulation auf den unter NANC Bedingungen mit Serotonin vorkontrahierten in- vitro Muskelstreifen.....	23
3.2	Thujone.....	24
3.2.1	Wirkung auf den Basaltonus und die Ruheaktivität der Muskelstreifen.....	24
3.2.2	Einfluss auf die pharmakologisch stimulierten Muskelstreifen.....	25
3.2.3	Wirkung auf die elektrisch induzierte Kontraktion.....	27
3.2.4	Wirkung auf die elektrisch induzierte Kontraktion unter nicht adrenergen, nicht cholinergen Bedingungen.....	31
3.2.5	Einfluss auf die elektrisch induzierte Relaxation unter nicht adrenergen, nicht cholinergen- Bedingungen.....	33

3.3	GABA- erge Substanzen .....	35
3.3.1	Einfluss auf die pharmakologisch stimulierten Muskelstreifen .....	35
3.3.2	Wirkung auf die elektrisch induzierte Kontraktion .....	36
3.3.3	Wirkung auf die elektrisch induzierte Kontraktion unter nicht adrenergen, nicht cholinergen Bedingungen .....	37
3.3.4	Einfluss auf die elektrisch induzierte Relaxation unter nicht adrenergen, nicht cholinergen- Bedingungen .....	38
3.4	Omeprazol .....	40
3.4.1	Wirkung auf den Basaltonus und die Ruheaktivität der Muskelstreifen .....	40
3.4.2	Einfluss auf die pharmakologisch stimulierten Muskelstreifen .....	41
3.4.3	Wirkung auf die elektrisch induzierte Kontraktion .....	41
3.4.4	Wirkung auf die elektrisch induzierte Kontraktion unter nicht adrenergen, nicht cholinergen Bedingungen .....	42
3.4.5	Einfluss auf die elektrisch induzierte Relaxation unter nicht adrenergen, nicht cholinergen- Bedingungen .....	43
4	Allgemeine Diskussion .....	45
4.1	Die glatte Muskulatur des Dünndarms.....	45
4.1.1	Struktur der glatten Muskulatur .....	45
4.1.2	Mobilisation des kontraktiven Aktivators Calcium .....	46
4.1.3	nervale Regulation der glatten Muskulatur durch den Myenterischen Plexus	47
4.2	Die Thujone .....	50
4.2.1	Biochemie und Struktur der Thujone.....	51
4.2.2	Interaktion von Thujon mit verschiedenen Rezeptoren.....	52
4.2.3	Medizinische Bedeutung von Thuja occidentalis und Artemisia absinthium	56
4.3	Omeprazol .....	57
4.3.1	Physiko- chemische Eigenschaften .....	57
4.3.2	Wirkungsweise des Protonenpumpeninhibitors Omeprazol.....	59
4.3.3	Klinische Relevanz.....	60
5	Spezielle Diskussion .....	62
5.1	Die Thujone .....	62
5.1.1	Direkter Einfluss auf die glatte Muskelzelle.....	62

5.1.2	Wirkung auf die pharmakologisch vorstimulierte Muskulatur .....	63
5.1.3	Einfluss auf die elektrisch induzierte, cholinerge Kontraktion .....	65
5.1.4	Wirkung auf die elektrisch induzierte Kontraktion unter nicht adrenergen, nicht cholinergen Bedingungen .....	68
5.1.5	Einfluss auf die elektrisch induzierte Relaxation .....	69
5.2	Omeprazol .....	70
5.2.1	Direkter Einfluss auf die glatte Muskelzelle .....	70
5.2.2	Einfluss auf die pharmakologisch vorstimulierte Muskulatur .....	71
5.2.3	Einfluss auf die elektrisch induzierte Kontraktion .....	73
5.2.4	Einfluss auf die elektrisch induzierte Relaxation .....	75
6	Zusammenfassung .....	76
7	Literaturverzeichnis .....	80
8	Abbildungs- und Tabellenverzeichnis .....	96
9	Abkürzungs- und Synonymverzeichnis .....	99
10	Danksagung .....	101
11	Lebenslauf .....	102

# 1 Einleitung

1991 wurde in Deutschland im Rahmen einer neuen EU Aromenverordnung ein über 70 Jahre verbotenes,alkoholisches Getränk wieder zugelassen. Absinth, das ursprünglich medizinisch verwendet wurde, fand aufgrund seiner halluzinogenen und psychotischen Wirkung vor allem um die Jahrhundertwende großen Anklang bei Künstlern, wie Oscar Wilde, Ernest Hemingway, Vincent van Gogh. Aufgrund seines berauschenden Charakters und dem damit verbundenen Suchtpotential, wurde Absinth zu Beginn des 20. Jahrhunderts in weiten teilen Europas verboten.

Seine toxische Wirkung wird dem Inhaltstoff Thujon zugeschrieben, welchen man u.a. als farbloses Öl in der Wermut Pflanze (lat. *Artemisia absinthium*) und in den Zweigen des Thuja Strauchs (lat. *Thuja orientalis*) findet. Neben der Herstellung des Likörs hat Wermut als Heilpflanze zur Behandlung von Appetitlosigkeit, Magen-, Darm- und Gallenbeschwerden stets große Bedeutung gehabt. Durch die Wiedezulassung und der damit steigenden Präsenz thujonhaltiger Getränke, sowie die Verbindung zur Heilpflanze Wermut mit Ihrer Auswirkung auf Magen und Darm, stellte sich für uns die Frage, welchen Einfluss das Hauptagens Thujon auf die Neurotransmission und Motilität des Gastrointestinaletrakts haben könnte.

Im zweiten Teil der Arbeit fokussierten wir uns auf den Wirkstoff Omeprazol, welcher als Protonenpumpeninhibitor in der Therapie verschiedener Magen- und Duodenalerkrankungen in Deutschland sehr breite Anwendung findet. Allein im Jahre 1989 wurde in Deutschland Omeprazol nach seiner Markteinführung 2570000-mal ärztlich verordnet [47]. Dabei liegt der Hauptfokus des Wirkspektrums der Substanz in der Blockade der Protonenpumpen der im Magen befindlichen Belegzellen. Die daraus resultierende Reduktion der Säurebildung im Magen ist Grundlage der Therapie mit Protonenpumpeninhibitoren. Zusätzlich wird der Einsatz der Substanz Omeprazol zu Reflux assoziierten Erkrankungen, wie z.B. der funktionellen Dyspepsie diskutiert. Eine direkte Beeinflussung der Protonenpumpeninhibitoren auf den Ort ihrer Resorption, den Dünndarm ist dabei nicht bekannt. Aus diesem Grund interessierte uns die mögliche

Wirkung des Protonenpumpeninhibitors Omeprazol auf Kontraktilität und Motilität des Dünndarms.

Die vorliegende Arbeit untersucht den Einfluss verschiedener Pharmaka, die die Muskulatur des Dünndarms beeinflussen können. Im speziellen war es unser Ziel die Wirkung von Thujon und des Protonenpumpeninhibitors Omeprazol zu untersuchen. Bei den Thujonen wird die Wirkung des synthetisch hergestellten  $\alpha$  Thujons und  $\alpha\beta$  Thujons, sowie eines natürlich vorkommenden Thujons beobachtet.

Die durchgeführten Versuche sollen dabei die folgenden Fragestellungen beantworten:

- Haben Thujone oder Omeprazol einen Einfluss auf den Basaltonus, die Kontraktionsfrequenz bzw. -amplitude der glatten Muskulatur? Können die untersuchten Stoffe dabei die Muskulatur direkt beeinflussen?
- Verändern die untersuchten Thujone und Omeprazol die Aktivität der durch Carbachol vorstimulierten Muskulatur?
- Verstärken oder hemmen Thujone oder Omeprazol die elektrisch induzierten Kontraktionen? Sind die untersuchten Substanzen in der Stärke ihrer Wirkung vergleichbar und wo liegen die Unterschiede?
- Welchen Einfluss haben die Thujone und Omeprazol unter nicht- adrenergen, nicht-cholinergen Bedingungen auf die elektrisch induzierte Relaxation der glatten Muskulatur? Ist die Ausprägung der Wirkung der einzelnen Stoffe vergleichbar oder gibt es Unterschiede zwischen den eingesetzten Gruppen?

## **2 Material und Methoden**

### **2.1 Versuchstiere**

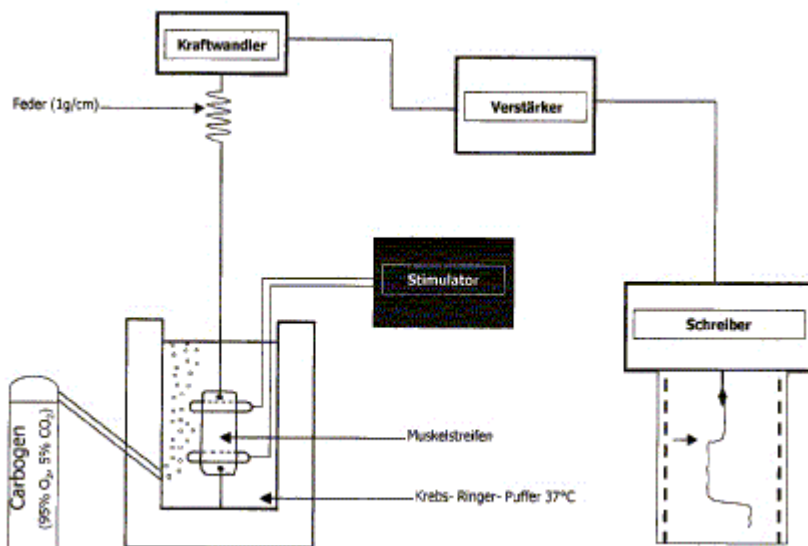
Für die Versuche wurden männliche Wistar Ratten (Charles River, Sulzfeld, Deutschland) mit einem Gewicht zwischen 200 g und 300 g verwendet. Ihre Kopf-Schwanz-Länge lag zwischen 38 cm und 41 cm. Alle Versuchstiere wurden vor den Experimenten unter standardisierten Bedingungen in einem vollklimatisierten Raum bei künstlichem Tag-Nacht-Rhythmus gehalten. Ihre Ernährung bestand aus Trockenfutter und Wasser. 12 Stunden vor Versuchsbeginn wurde das Futter abgesetzt, die Tiere hatten aber weiterhin freien Zugang zu Trinkwasser. Nach kurzer Begasung mit CO<sub>2</sub> wurden die Ratten durch intraperitoneale Injektion von Na-Phenobarbital (NarcorenR) in einer Dosierung von 100 mg/kg eingeschläfert. Es wurden vom Dünndarm sofort 20 cm des terminalen Ileums entnommen und in ein Bad mit Krebs-Ringer-Puffer (MgSO<sub>4</sub> 1,16 mM, NaCl 115,5 mM, NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 1,16 mM, Glucose 11,1 mM, NaHCO<sub>3</sub> 21,9 mM, CaCl 2,5mM, KCl 4,16 mM) eingebracht, das mit Carbogen (95% O<sub>2</sub>, 5% CO<sub>2</sub>) begast wurde. Für die Organentnahme lag eine entsprechende Genehmigung der Regierung von Oberbayern vor.

### **2.2 Versuchsanordnung**

Pro Versuchstier wurden aus dem terminalen Ileum sechs ca. 1 cm lange Streifen in longitudinaler Richtung präpariert. Das orale Ende jedes Streifens wurde durch einen nichtelastischen Faden mittels einer zirkulären Ligatur an dem Fixationshaken eines Elektrodenhalters befestigt. Der Elektrodenhalter besteht aus einem Fixationshaken und zwei Platinringeletroden (Abstand voneinander ca. 6 mm), durch die der Muskelstreifen geführt wurde. Am aboralen Ende jedes Streifens wurde mittels Durchstechungsligatur ein nichtelastischer Faden befestigt. Der Elektrodenhalter mit den Organstreifen wurde in ein doppelwandiges Bad platziert, das 4 ml Krebs-Ringer-Bikarbonat-Lösung (Krebs-Ringer- Solution, KRS) enthielt (NaCl 115,5 mM, MgSO<sub>4</sub> 1,16 mM, NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 1,16 mM, Glucose 11,1 mM, NaHCO<sub>3</sub> 21,9 mM, CaCl 2,5 mM, KCl 4,16 mM). Das Organbad



wurde durch einen umgebenden Heizkreislauf auf 37°C gehalten und der Puffer mit Carbogen (95% O<sub>2</sub>, 5% CO<sub>2</sub>) begast. Das aborale Ende der Organsegmente wurde mit einem isometrischen Kraftaufnehmer verbunden (Swegma Force Displacement Transducer SG 4-500, Swegma, Schweden). Für Versuche zur Messung der basalen Parameter ,wie zur Frequenz- und Amplitudenmessung geschah dies direkt an dem Kraftaufnehmer, die übrigen Versuche wurden jedoch unter Zwischenschaltung einer Silberfeder (D=1g/cm) durchgeführt. Die Segmente wurden derart fixiert, dass entstehende Kräfte in Richtung der longitudinalen Muskulatur registriert wurden. Bei einer Vorspannung von 40 mN wurde das System 30 min lang equilibriert. Danach spült man das Organbad mehrmals mit KRS, wobei die Spülzeit 4 min beträgt. Das jeweilige Experiment wurde mit frischem Puffer gestartet. Nach den einzelnen Versuchsabschnitten wurde das System erneut gespült. Über den Kraftaufnehmer wurden die isometrischen Kontraktionen in elektrische Spannungsänderungen umgewandelt und über einen Verstärker (Hellige GmbH, Freiburg, Deutschland) mit einem Schreiber (Rikadenki GmbH, Freiburg, Deutschland) aufgezeichnet. Jedes Segment wurde nur für ein einziges Experiment verwendet.



**Abb. 1** Schematisierte Darstellung des Versuchmodells

## **2.3 Versuchsdurchführung**

### **2.3.1 Einfluss auf den Basaltonus die Ruheaktivität der Muskelstreifen**

Die Organstreifen wurden wie in Abschnitt 2.2 beschrieben präpariert und in das Organbad eingespannt. Bei einer Vorspannung von 40 mN wurde das System zunächst 30 Minuten equilibriert. Dann wurden die Organstreifen durch die Zugabe von Carbachol 1  $\mu\text{M}$  in das Organbad vorstimuliert. Wie aus Voruntersuchungen bekannt, werden die glatten Muskelzellen dadurch direkt stimuliert. Bei Carbachol stellte sich ein stabiles Kontraktionsplateau nach 30–60 Sekunden ein. Insgesamt blieb dieses Plateau bis zu 20 min. stabil. Nach 2–3 minütiger Stimulation wurde das Organbad gründlich mit KRS ausgewaschen und 10 min. inkubiert. Dann wurden die Muskelstreifen erneut mit Hilfe von Carbachol 1  $\mu\text{M}$  stimuliert, das Plateau stabilisierte sich und nach 2–3 Minuten wurde das Behältnis wieder gespült. Im Anschluss an diesen Arbeitsschritt folgte eine 20-minütige Inkubation. Zehn Minuten vor Versuchsbeginn wurde das Organbad mit frischer Krebs-Ringer-Bikarbonat-Lösung gespült. Die einzelnen Muskelstreifen wurden ab diesem Versuchsabschnitt weder mit Hilfe von Serotonin, Carbachol oder durch elektrische Impulse stimuliert.

Die zu untersuchenden Substanzen wurden kumulativ in aufsteigender Konzentration (0,1  $\mu\text{M}$ –100  $\mu\text{M}$ ) in das Organbad appliziert. Zwischen den einzelnen Zugaben lagen immer 10 Minuten Abstand. Das Organbad wurde während des Versuchs nicht gespült. Die maximale Versuchsdauer betrug 100 Minuten.

### **2.3.2 Einfluss auf die pharmakologisch stimulierten Muskelstreifen**

Die Organstreifen wurden wie in Abschnitt 2.2 beschrieben präpariert und in das Organbad eingespannt. Bei einer Vorspannung von 40 mN wurde das System zunächst 30 Minuten equilibriert. Zehn Minuten vor Versuchsbeginn wurde das Behältnis mit frischer Krebs-Ringer-Bikarbonat-Lösung gespült. Dann wurden die Organstreifen durch die Zugabe von Carbachol 1  $\mu\text{M}$  in das Organbad vorstimuliert. Nach 2–3 minütiger Stimulation wurde das Organbad gründlich mit KRS ausgewaschen und 10 min. inkubiert. Dann wurden die Muskelstreifen erneut mit Hilfe von Carbachol 1  $\mu\text{M}$  stimuliert, das Plateau stabilisierte sich und nach 2–3 Minuten wurde das Behältnis wieder gespült. Im Anschluss an diesen Arbeitsschritt folgte eine 10-minütige Inkubation.

Insgesamt wiederholte sich der Vorgang dreimal. Bei der letzten Stimulation wurden nach Stabilisieren des Plateaus die einzelnen zu untersuchenden Pharmaka kumulativ ( $0,1 \mu\text{M}$  –  $100 \mu\text{M}$ ) im Abstand von zwei Minuten in den Puffer gegeben. Das Organbad wurde während des Versuchs nicht gespült. Die maximale Versuchsdauer in diesem Arbeitsschema betrug 50 Minuten.

### **2.3.3 Einfluss auf den elektrisch stimulierten Muskelstreifen**

Die Organstreifen wurden wie in Abschnitt 2.2 beschrieben präpariert und in das Organbad eingespannt. Bei einer Vorspannung von 40 mN wurde das System zunächst 30 Minuten equilibriert. Dann wurden die Organstreifen durch die Zugabe von Carbachol ( $1 \mu\text{M}$ ) in das Organbad vorstimuliert. Nach 2–3 minütiger Stimulation wurde das Organbad gründlich mit KRS ausgewaschen und 10 min. inkubiert. Dann wurden die Muskelstreifen erneut mit Hilfe von Carbachol  $1 \mu\text{M}$  stimuliert, das Plateau stabilisierte sich und nach 2–3 Minuten wurde das Behältnis wieder gespült. Im Anschluss an diesen Arbeitsschritt folgte eine 10-minütige Inkubation. Zehn Minuten vor Versuchsbeginn wurde das Behältnis mit frischer Krebs-Ringer-Bikarbonat-Lösung gespült. Den Experimenten zum Einfluss der Thujone auf die elektrische Kontraktion lag folgendes Stimulationsschema zugrunde:

Die Versuche gliedern sich in mehrere Stimulationsblöcke von je ca. 10 Minuten Dauer. Dabei wurde jeder Streifen alle 2,5 min 10 Sekunden lang elektrisch stimuliert mit aufsteigender Stimulationsfrequenz (40 V, 1ms Pulsdauer, 2 Hz, 4 Hz, 8 Hz, 16 Hz Stimulationsfrequenz). Zwischen den Stimulationsblöcken lagen 10-minütige Pausen in denen die KRS gewechselt wurde. Die elektrische Stimulation mit den oben genannten Stimulationsparametern resultiert in einem typisch biphasischen Kontraktionsmuster. Nach der Equilibration des Systems wurden zunächst 2 Stimulationsblöcke ohne Zusatz einer Substanz durchgeführt, dann erfolgte die Zugabe des oder der zu untersuchenden Pharmaka. Diese wurden nach der Applikation 10 min. inkubiert und anschließend folgte ein Stimulationsblock. Mit jedem Stimulationsblock wurde eine höhere Konzentration des zu untersuchenden Pharmakons ins Organbad dazugegeben ( $0,1 \mu\text{M}$  –  $100 \mu\text{M}$ ). Die maximale Versuchsdauer betrug 3 Std. 40 min. Für alle Substanzen, die elektrisch stimuliert wurden gilt das gleiche Schema.

### **2.3.4 Einfluss auf den elektrisch stimulierten Muskelstreifen unter nicht-adrenergen, nicht- cholinergen Bedingungen**

Die Versuchsdurchführung wurde wie unter dem Abschnitt 2.3.3 beschrieben durchgeführt, jedoch unter nicht- adrenergen und nicht- cholinergen Bedingungen. Durch Zugabe und 10 minütiger Inkubation von Atropin (1  $\mu\text{M}$ ) und Guanethidin (1  $\mu\text{M}$ ) vor jeder Stimulationseinheit wurde dies erreicht. Dabei blockiert Atropin das cholinerge System und Guanethidin das adrenerge System. Die maximale Versuchsdauer betrug 4 Std. 30 min.

### **2.3.5 Einfluss auf die elektrisch induzierte Relaxation unter nicht-adrenergen, nicht- cholinergen Bedingungen**

Die Organstreifen wurden wie in Abschnitt 2.2 beschrieben präpariert und in das Organbad eingespannt. Das aborale Ende der Organsegmente wurde bei diesen Versuchen über eine Feder mit dem isometrischen Kraftaufnehmer verbunden. Bei einer Vorspannung von 40 mN wurde das System zunächst 30 Minuten equilibriert. Zehn Minuten vor Versuchsbeginn wurde das Organbad mit frischer Krebs-Ringer-Bikarbonat-Lösung gespült. Bei den Experimenten zum Einfluss der Thujone und Omeprazol auf die Inhibition wurde folgendes Schema angewandt:

Nach der Equilibration und dem Pufferwechsel wurde Serotonin (1  $\mu\text{M}$ ) in das Organbad gegeben. Die dadurch ausgelöste Kontraktion ging nach ca. 1–1,5 Minuten in ein Plateau über. Nach Stabilisierung der einzelnen Plateaus wurde das Serotonin wieder ausgewaschen und 10 min. inkubiert. Auf diese Art und Weise wurden die Dünndarmstreifen zweimal stimuliert. Vor der dritten Serotoninzugabe wurden Atropin (1  $\mu\text{M}$ ) und Guanethidin (1  $\mu\text{M}$ ) 10 min. inkubiert. Im derart präparierten Organbad herrschen nun nicht adrenerge, nicht cholinerge (NANC) Bedingungen. Zusätzlich wurde die gewünschte Thujon- bzw. Omeprazolkonzentration zehn Minuten vor dem Serotonin zugegeben. Nachdem sich das Plateau eingestellt hatte, wurden die einzelnen Dünndarmstreifen jeweils 10 sek. mit aufsteigender Stimulationsfrequenz (40 V, 1ms Pulsdauer, 2 Hz, 4 Hz, 8 Hz, 16 Hz Stimulationsfrequenz) stimuliert, wobei jeder Stimulation eine Pause von 120 Sekunden folgte. Danach wurde der KRS gewechselt und 25 min. inkubiert, bevor erneut Atropin, Guanethidin und die Substanz in der nächst

höheren Konzentration zugegeben wurden und sich die elektrische Stimulation wiederholte. Untersucht wurden Konzentrationen zwischen 0,1  $\mu\text{M}$ - 100  $\mu\text{M}$ . Die maximale Versuchsdauer lag bei 5 Std. 40 min.

## **2.4 Datenauswertung**

Zur genaueren Untersuchung der Ruheaktivität wurden zwei Parameter bestimmt: Die Kontraktionsfrequenz/ min und die Kontraktionsamplitude der Muskelstreifen.

Bei der Bestimmung der Frequenz bzw. Amplitude wurde der Mittelwert aus der Anzahl bzw. der Höhe der Kontraktionen pro Minute als 100 % gewertet. Die Zugabe der einzelnen Pharmaka hatte eine Änderung dieser Kontraktionsanzahl bzw. der Amplitudenhöhe zur Folge, die in Prozent im Vergleich zu den basalen Konditionen beschrieben wurde.

Die Auswertung der durch Carbachol vorstimulierten Versuche erfolgte, indem der Mittelwert aus mehreren Höhen des stabilen Kontraktionsplateaus als 100 % gewertet wurde. Jede Änderung der Plateauhöhe durch Zugabe der Substanzen wurde in % beschrieben.

Bei der elektrischen Feldstimulation wurde der Mittelwert aus der aufgezeichneten Kontraktionshöhe der einzelnen Organstreifen als 100% gewertet. Die Zugabe der einzelnen Substanzen hatte eine Änderung dieser Kontraktionshöhe zur Folge, die in Prozent im Vergleich zu den basalen Konditionen beschrieben wurde. Diese Art der Datenauswertung wurde ebenfalls unter NANC Bedingungen angewendet.

Bei der Relaxation unter nicht- adrenergen, nicht- cholinergen Bedingungen wurden die Mittelwerte aus der Höhe (= Kraft) des stabilen Kontraktionsplateaus nach Zugabe des Serotonins als 100 % angegeben. Durch die elektrische Feldstimulation verursachten Relaxationen wurden gemessen und deren Mittelwerte wurden in Prozent im Verhältnis zum Serotoninplateau angegeben.

## **2.5 Verwendete Substanzen**

In den Versuchen wurden folgende Thujone verwendet: (-)  $\alpha$ - Thujon,  $\alpha$ ,  $\beta$ - Thujon und Thujone Standard Mixture. (alle Substanzen Sigma-Aldrich-Fluka München, Deutschland) In der vorliegenden Arbeit werden folgende Vereinfachungen vorgenommen:

- (-) $\alpha$ - Thujon wird als  $\alpha$  Thujon bezeichnet
- $\alpha$ ,  $\beta$ - Thujon wird als  $\alpha$   $\beta$  Thujon bezeichnet
- Thujone Standard Mixture wird als Mischthujon bezeichnet

Die Substanz Omeprazol wurde von der Firma Astra Zeneca (Zug, Switzerland) verwendet.

Als GABAerge (Gamma- Aminobuttersäure) Substanzen kamen der GABA- A (Gamma- Aminobuttersäure Typ A) Agonist Muscimol und der GABA A Antagonist (-)-Bicuculline Methochlorid zum Einsatz. (beide Substanzen Sigma- Aldrich, München, Deutschland)

Neurokinin [25] selektive Tachykinin Antagonisten waren:

GR 82334 = NK 1 Tachykinin Rezeptor Antagonist

SB 218795 = NK 3 Tachykinin Rezeptor Antagonist

( beide Substanzen Sigma- Aldrich München, Deutschland)

MDL 29,913 = NK 2 Tachykinin Rezeptor Antagonist ( Tocris Bioscience, Ellisville, Missouri, USA)

Weiterhin kamen Atropin, Guanethidin, Serotonin und Carbachol (alle Sigma- Aldrich München, Deutschland) zur Anwendung.

Lösung der oben genannten Stoffe:

Die Thujone wurden in 2 Tropfen Tween und anschließend tröpfchenweise in Ethanol gelöst und dann mit entmineralisiertem Wasser bis zur gewünschten Konzentration verdünnt.

SB 218795 wurde tröpfchenweise in Ethanol gelöst und verdünnt.

Die restlichen Substanzen wurden alle in entmineralisiertem Wasser gelöst.

Die Endverdünnung aller Substanzen wurde so gewählt, dass durch die Zugabe von 40 µl mit einer Eppendorf-Pipette die erwünschte Endkonzentration im Organbad erreicht wurde.

## **2.6 Statistik**

Die Daten wurden als Mittelwert ± Standardabweichung (SEM) angegeben. n steht für die Anzahl unabhängiger Experimente an unterschiedlichen Organsegmenten. Zum Vergleich der Mittelwerte wurde der Zweistichproben t-Test unter der Annahme gleicher Varianzen (Microsoft® Excel 2000, 9.0.2812) angewendet. Das Signifikanzniveau wurde auf  $p < 0,05$  festgelegt und in den Abbildungen, Tabellen und im Text entsprechend gekennzeichnet.

### 3 Ergebnisse

#### 3.1 Charakterisierung der beobachteten Ergebnisse

##### 3.1.1 Basalaktivität

In einem wie im Abschnitt 2.3.1 beschriebenen Versuchsmodell zeigte sich während der Versuchsdauer von ca. 80 min ein in der Amplitude wechselndes jedoch in der Frequenz stabiles Kontraktionsmuster (Abb. 2).

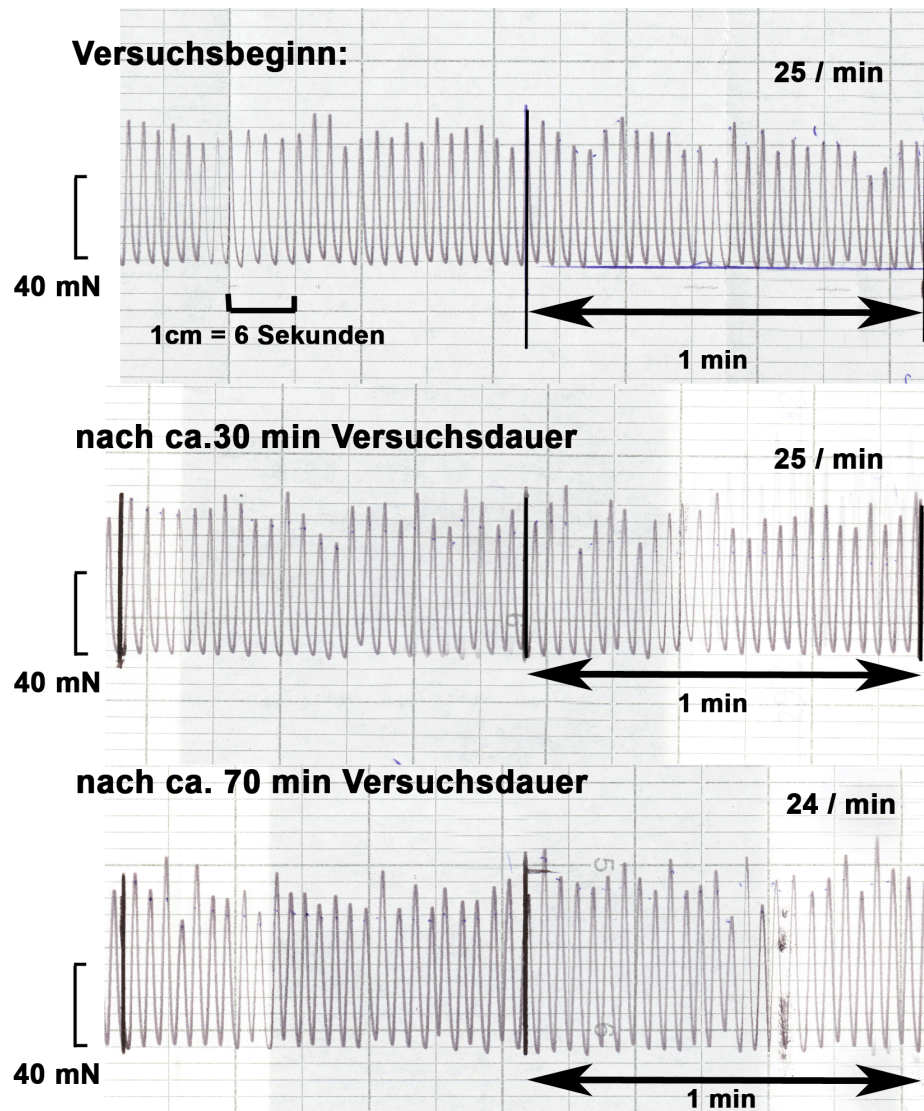


Abb. 2 Tracing eines Muskelstreifens unter basalen Konditionen



Im Mittel zeigten sich zwischen 24 und 31 Kontraktionen mit anschließender Relaxation pro Minute. Für jeden Organstreifen blieb diese Frequenz unter Standardbedingungen für die oben genannte Versuchsdauer stabil (ohne Daten).

Im Bezug zur Ausprägung der Amplitude zeigten sich im zeitlichen Verlauf, ohne eine Änderung der äußeren Bedingungen im Versuchsmodell, wechselnde Kontraktionshöhen ohne einheitliches Muster.( siehe Abb. 2).

### 3.1.2 Einfluss auf den pharmakologisch stimulierten Muskelstreifen

Carbachol bewirkt über die Bindung an muskarinergen Rezeptoren eine direkte Kontraktion der glatten Muskelzelle.

In unserem Versuchsmodell kam es nach Zugabe von Carbachol ( $1\mu\text{M}$ ) zu einer initial stark ausgeprägten Kontraktion, die nach ca. 2-3 Minuten in ein stabiles Plateau überging. Dieses Plateau war im zeitlichen Verlauf bis zu 20 Minuten konstant (vgl. hierzu Abb. 9 a). Zudem konnte eine initiale Abflachung der Amplitudengröße während der Plateauphase beobachtet werden. Nach Auswaschen des zugegebenen Carbachols (siehe Abschnitt 2.3.2) zeigte sich ein dem Ausgangswert entsprechendes Kontraktionsmuster mit normalisierten Amplitudengrößen (Abb. 3).

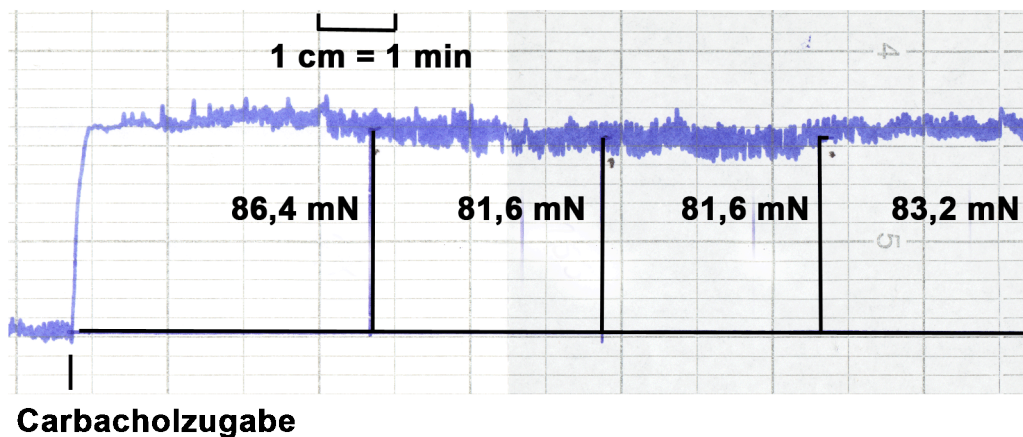


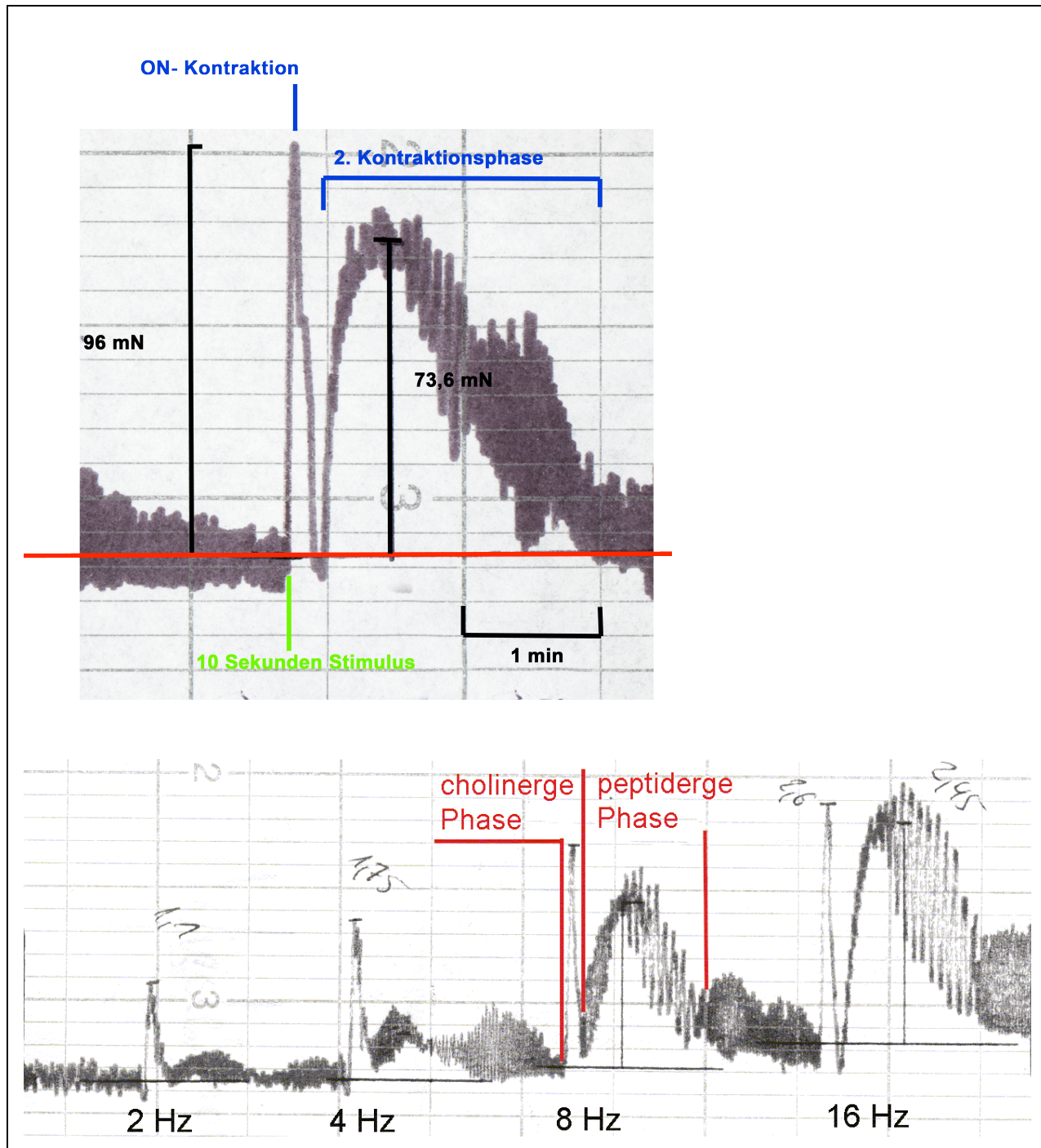
Abb. 3 Tracing eines durch Carbachol stimulierten Organstreifens

### **3.1.3 Wirkung der elektrisch induzierten Feldstimulation auf den in vitro Muskelstreifen**

Wie im Abschnitt 2.3.3 beschrieben wurden die Muskelstreifen einzeln einem elektrischen Impuls mit folgenden Charakteristika ausgesetzt: 40V, 2Hz/ 4Hz/ 8Hz/ 16Hz; 1ms Pulsdauer; 10sek. Durch diesen Impuls kam es zu einem biphasisch verlaufenden Kontraktionsmuster, welches durch eine Relaxation des Muskels deutlich separiert wurde.

Kennzeichnend für die Kontraktionen war ein während der Stimulation auftretender erster, steiler Kontraktionspeak (on- Kontraktion), der beim Abschalten des 10 sekundigen Impulses von einer Relaxation (off- Relaxation) gefolgt war. Im Anschluss dieser Relaxation kam es einer zweiten, Kontraktionsphase, welche breitbasiger und schwächerer Ausprägung war. Nach einem Zeitintervall von 3-4 Minuten kam es zur vollständigen Rückbildung der Kontraktion und es zeigte sich das Kontraktionsschema im Ausgangsniveau.

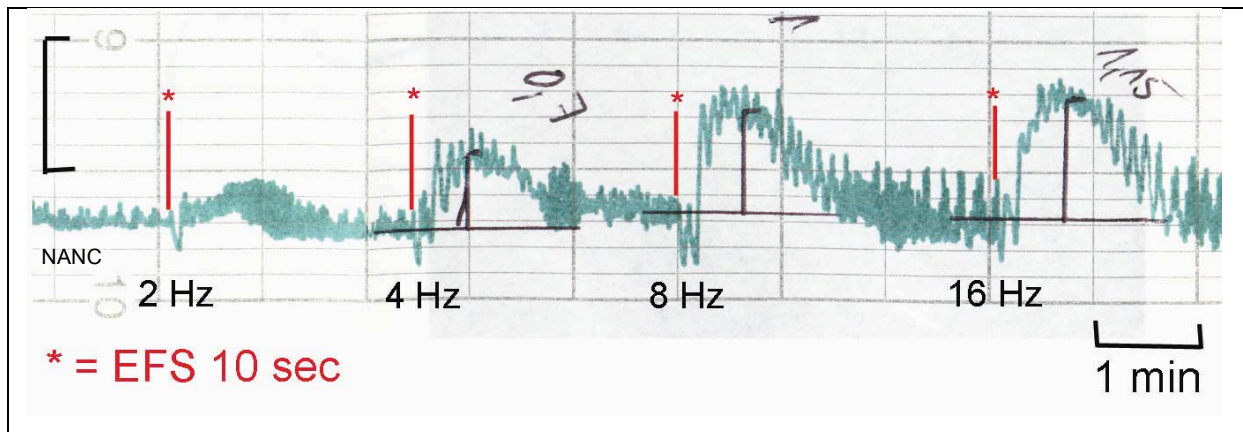
Anzumerken ist zudem, dass die Ausprägung der Kontraktion bzw. Relaxation in einem proportionalen Verhältnis zur Frequenzstärke stand (Abb. 4).



**Abb. 4** Tracingbeispiele eines durch elektrische Feldstimulation kontrahierten Muskelstreifens mit Einteilung und genauerer Definition der Kontraktionsphasen

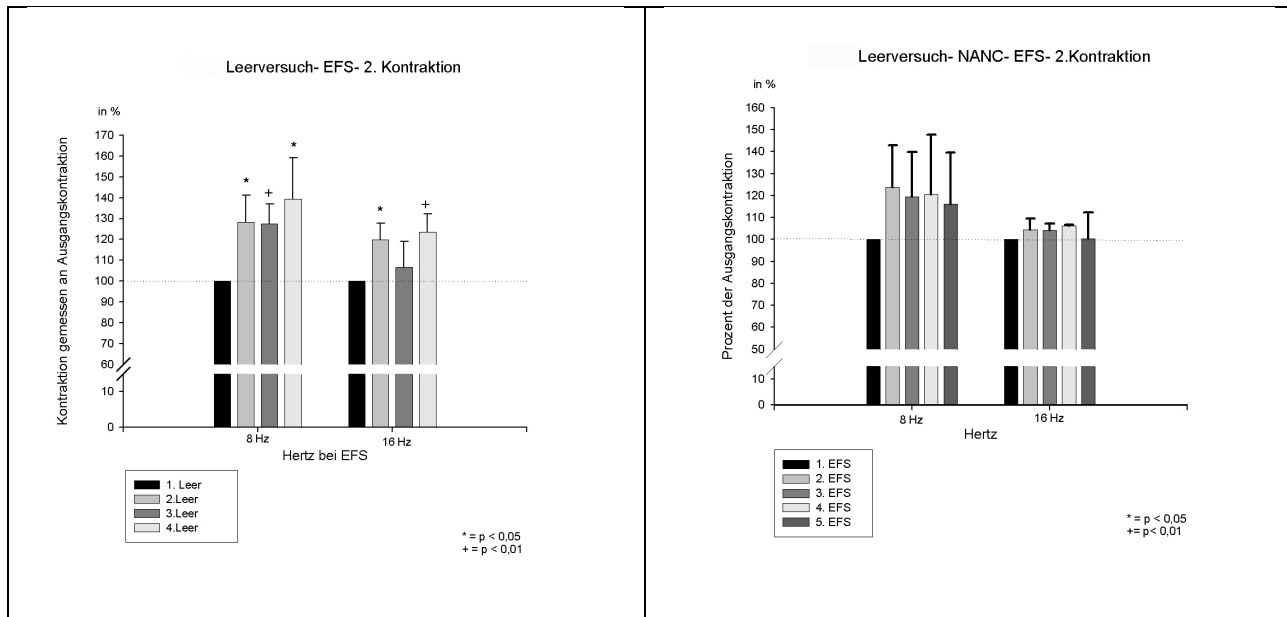
Zur Charakterisierung und genaueren Bestimmung der einzelnen Kontraktionsphasen erfolgte die Applikation und Inkubation (10 min) von Atropin (1  $\mu$ M) und Guanethidin (1  $\mu$ M). Wie bekannt blockiert Atropin die m-Cholinorezeptoren und Guanethidin führt zu

einer Blockade der adrenergen Mechanismen. Unter diesen nicht- adrenergen, nicht- cholinergen Bedingungen (NANC) kam es bei gleicher Versuchsdurchführung zu einem veränderten Kontraktionsmuster. Die oben beschriebene erste, „on“- Kontraktion wurde weitestgehend inhibiert. Da diese Kontraktionsphase durch die alleinige Präsenz von Atropin (1  $\mu$ M) blockiert wurde, ließ sich die erste Phase der Kontraktion als cholinerge vermittelt definieren. Interessanterweise bildete sich weiterhin die zweite Phase des Kontraktionsmusters stabil aus (Abb. 5).



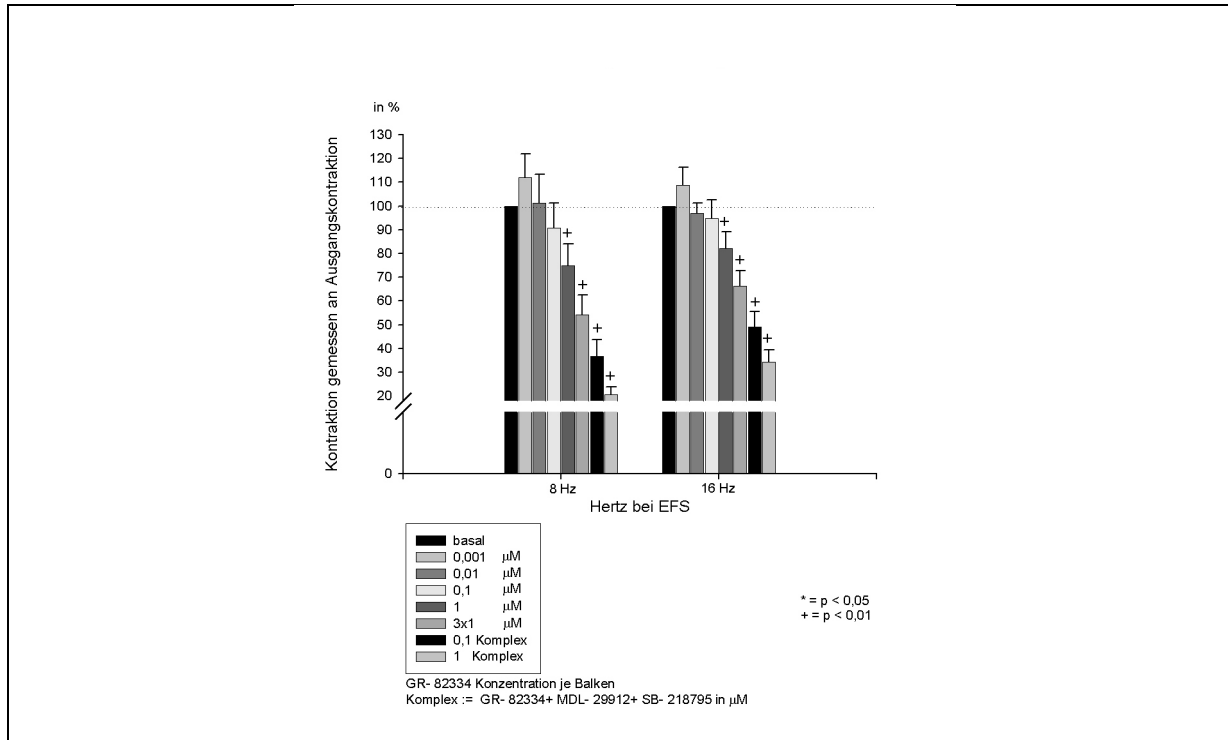
**Abb. 5** Tracing eines Muskelstreifen, der unter NANC Bedingungen mit elektrischer Feldstimulation kontrahiert wurde

In weiteren Untersuchungen konnte man sogar feststellen, dass sich die zweite Phase des Kontraktionsmusters unter NANC- Bedingungen vergleichend mit der Versuchsanordnung unter Standardbedingungen stabiler darstellte ( siehe Abb. 6). Aus diesem Grund wurden zur weiteren Charakterisierung bzw. bei Versuchen bzgl. der zweiten Kontraktionsphase immer NANC Bedingungen angewendet.



**Abb. 6** vergleichende Darstellung der zweiten Kontraktionsphase unter Standard- und unter NANC Bedingungen

Unter der Vorstellung, dass die zweite Phase des elektrisch induzierten Kontraktionsmusters größtenteils peptiderg vermittelt ist [6], erfolgte die Applikation verschiedener Tachykinin Rezeptor Antagonisten, sowie die Testung eines Substanz P Antagonisten, um zu beschreiben, welche Tachykininrezeptoren daran beteiligt sind. Es zeigte sich bei Einzelgabe des NK2 Antagonisten MDL 29912 (1  $\mu$ M) kein signifikanter reduzierender Effekt (ohne Daten). Der NK 3 Antagonist SB 218795 reduzierte die Kontraktion der zweiten Phase signifikant ab einer Konzentration von 3  $\mu$ M um  $19,33 \pm 5,63\%$  (n=5, p< 0,01). Ein ebenfalls signifikant inhibierender Effekt ( $-33,61 \pm 6,25\%$ , n=6, p< 0,01) war bei Gabe des NK1 Antagonisten GR 82334 in gleicher Konzentration zu beobachten. Durch die Kombination von GR 82334 (1  $\mu$ M, NK1 Antagonist), MDL 29912 (1  $\mu$ M, NK2 Antagonist) und SB 218795 (1  $\mu$ M, NK3 Antagonist) konnte die zweite Phase der Kontraktion bis zu 80% antagonisiert werden (Abb. 7).



**Abb. 7 Darstellung der hemmenden Wirkung der NK Antagonisten GR 82334 (NK1 Antagonist), MDL 29912 (NK2 Antagonist) und SB 218795 (NK3 Antagonist) auf die peptiderge Kontraktionsantwort des durch elektrische Feldstimulation stimulierten Muskelstreifens**

Nach Gabe und Inkubation des Substanz P Antagonisten L732,138 (1 μM) reduzierte sich die durch elektrische Feldstimulation (16 Hz) vermittelte peptiderge (2.Phase) Kontraktion signifikant (n = 5, p < 0,01) auf 73,5 ± 13,15 % des Ausgangswertes (Tabelle 1).

**Tabelle 1 Einfluss des Substanz P Antagonisten L732,138 auf die peptiderge Komponente der elektrisch induzierten (16 Hz) Kontraktion (n.s. bedeutet nicht signifikant)**

Konzentration	% Ausgangskonzentration	Signifikanz
Ohne Substanz	100 %	n.s. ( n=5)
0,01 μM L732,138	90,13 ± 5,25 %	n.s. ( n=5)
0,1 μM L732,138	98,87 ± 11,49 %	n.s. (n=5)
1 μM L732,138	73,50 ± 13,15 %	signifikant p < 0,01

### 3.1.4 Einfluss der elektrischen Feldstimulation auf den unter NANC Bedingungen mit Serotonin vorkontrahierten in- vitro Muskelstreifen

Wie im Abschnitt 2.3.5 beschrieben, wurden in dieser Versuchreihe die Präparationen unter nicht adrenergen und nicht cholinergen Bedingungen mit Serotonin ( $1 \mu\text{M}$ ) vorkontrahiert. Nach einem Zeitintervall von ca. zwei Minuten stellte sich ein stabiles Plateau ein. In dieser Plateauphase wurden nun die Muskelstreifen jeweils 10 Sekunden mit elektrischer Feldstimulation in verschiedenen Frequenzen stimuliert. Das daraus resultierende Kontraktionsmuster war wie folgt charakterisiert:

Initial eine Relaxation der Muskelstreifen, dann Kontraktion über das Serotoninniveau hinaus, nach einem Zeitintervall von 3- 5 Minuten (in Abhängigkeit der Frequenz) post stimulatem Rückkehr auf das Serotoninplateau. Die Kontraktion zeigte dabei interessanterweise im niedrigen Frequenzbereich ein biphasisches Kontraktionsmuster, welches in höheren Frequenzbereichen (16 Hz) nur noch einphasisch zu beobachten war (Abb. 8).

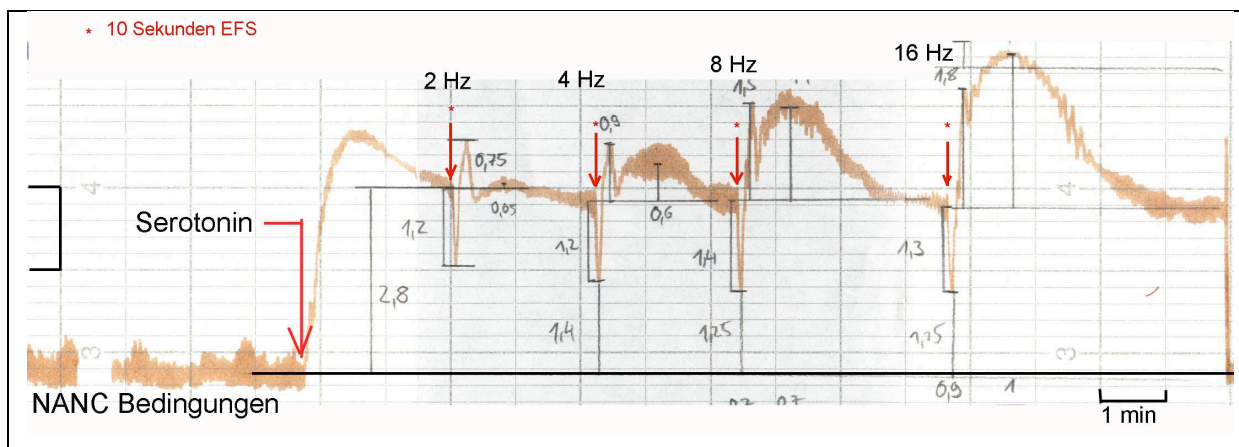


Abb. 8 Beispiel für die elektrisch induzierte Relaxation der mit Serotonin ( $1 \mu\text{M}$ ) vorbehandelten Muskulatur unter nicht adrenergen, nicht cholinergen Bedingungen

## 3.2 Thujone

### 3.2.1 Wirkung auf den Basaltonus und die Ruheaktivität der Muskelstreifen

$\alpha$  Thujon,  $\alpha$ - $\beta$  Thujon und Mischthujon hatten keinen Einfluss auf den Basaltonus oder die Spontanaktivität der Präparation (0,1- 100  $\mu$ M, Daten nicht angegeben). Auch bei der Auswertung der Ruheaktivitätsparameter = Kontraktionsfrequenz und -amplitude ergaben sich keine signifikanten Änderungen (Tabelle 2 und Tabelle 3).

**Tabelle 2: Einfluss der Thujone  $\alpha$  Thujon,  $\alpha$ - $\beta$  Thujon und Mischthujon auf die Kontraktionsfrequenz der Muskelstreifen (n.s. bedeutet nicht signifikant)**

Thujone	% Frequenzänderung	Signifikanz
Kontrollfrequenz	-0,67 $\pm$ 0,75 %	n.s. (n=5)
$\alpha$ Thujon 1 $\mu$ M	+2,37 $\pm$ 2,36 %	n.s. (n=5 )
$\alpha$ Thujon 10 $\mu$ M	+1,77 $\pm$ 2,61 %	n.s. (n=5 )
$\alpha$ Thujon 100 $\mu$ M	+1,73 $\pm$ 1,94 %	n.s. (n=5 )
Kontrollfrequenz	-0,72 $\pm$ 1,39 %	n.s. (n=5)
$\alpha$ - $\beta$ Thujon 1 $\mu$ M	-4,4 $\pm$ 3,27 %	n.s. (n=5)
$\alpha$ - $\beta$ Thujon 10 $\mu$ M	- 3,65 $\pm$ 3,41 %	n.s. (n=5)
$\alpha$ - $\beta$ Thujon 100 $\mu$ M	- 6,92 $\pm$ 4,51 %	n.s. (n=5)
Kontrollfrequenz	+ 2,64 $\pm$ 1,75 %	n.s. (n=6)
Mischthujon 1 $\mu$ M	+2,74 $\pm$ 2,63%	n.s. (n=6)
Mischthujon 10 $\mu$ M	+ 0,84 $\pm$ 3,1 %	n.s. (n=6)
Mischthujon 100 $\mu$ M	- 1,08 $\pm$ 2,56 %	n.s. (n=6)



**Tabelle 3 Einfluss der Thujone  $\alpha$  Thujon,  $\alpha$ - $\beta$  Thujon und Mischthujon auf die Kontraktionsamplitude der Muskelstreifen (n.s. bedeutet nicht signifikant)**

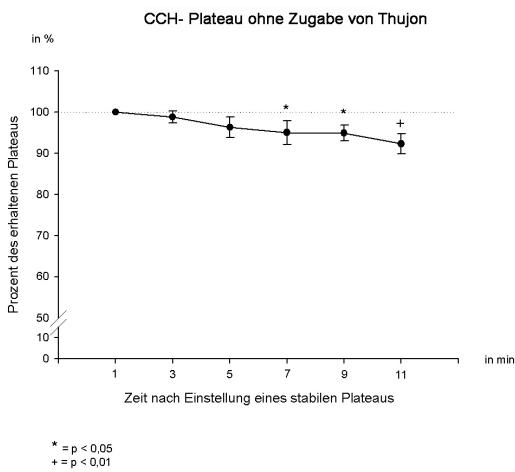
<b>Thujone</b>	<b>% Amplitudenänderung</b>	<b>Signifikanz</b>
Kontrollamplitude	+11,4 $\pm$ 9,4 %	n.s. (n=5)
$\alpha$ Thujon 1 $\mu$ M	+9,0 $\pm$ 13,5 %	n.s. (n=5)
$\alpha$ Thujon 10 $\mu$ M	+38,0 $\pm$ 40,5 %	n.s. (n=5)
$\alpha$ Thujon 100 $\mu$ M	+24,0 $\pm$ 54,7 %	n.s. (n=5)
Kontrollamplitude	-3,6 $\pm$ 5,2 %	n.s. (n=5)
$\alpha$ - $\beta$ Thujon 1 $\mu$ M	+8,0 $\pm$ 20,4 %	n.s. (n=5)
$\alpha$ - $\beta$ Thujon 10 $\mu$ M	+3,0 $\pm$ 14,0 %	n.s. (n=5)
$\alpha$ - $\beta$ Thujon 100 $\mu$ M	- 4,2 $\pm$ 13,1 %	n.s. (n=5)
Kontrollamplitude	-1,5 $\pm$ 3,2 %	n.s. (n=6)
Mischthujon 1 $\mu$ M	+5,74 $\pm$ 11,9 %	n.s. (n=6)
Mischthujon 10 $\mu$ M	+12,97 $\pm$ 18,5 %	n.s. (n=6)
Mischthujon 100 $\mu$ M	-7,45 $\pm$ 23,1 %	n.s. (n=6)

### **3.2.2 Einfluss auf die pharmakologisch stimulierten Muskelstreifen**

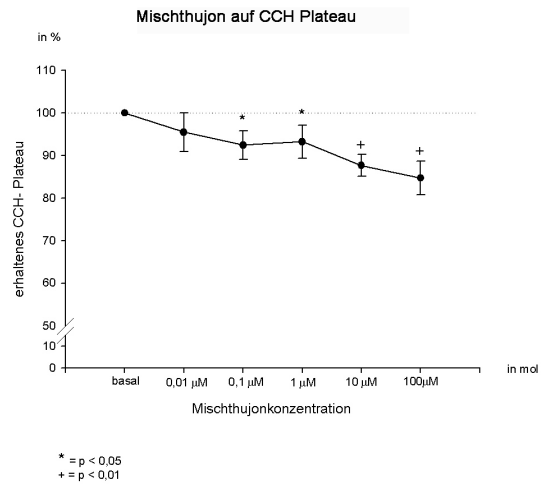
Carbachol (1  $\mu$ M) bewirkt eine Kontraktion der Muskelzelle, die nach durchschnittlich zwei Minuten in ein Plateau übergeht und ca. 20 Minuten relativ stabil bleibt (nach 11 Minuten stabiles Plateau -7,7  $\pm$  2,4 %, Abb. 9a., Abschnitt 3.1.2). Die Thujone die zu einem derart stimulierten Muskel zugegeben wurden, führten zu einer Reduktion des Kontraktionsniveaus.

Dabei wurden die Substanzen im Konzentrationsbereich von 0,01  $\mu\text{M}$  bis 100  $\mu\text{M}$  appliziert und hatten in der Maximalpotenz der Abschwächung folgende Reihenfolge:  $\alpha$  Thujon (100  $\mu\text{M}$   $\rightarrow$  -33,73 %  $\pm$  2,49 %) >  $\beta$  Thujon (100  $\mu\text{M}$   $\rightarrow$  -20,03 %  $\pm$  5,15 %) > Mischthujon. (100  $\mu\text{M}$   $\rightarrow$  -15,3 %  $\pm$  3,9 %). Dabei wurden die Kontraktionsniveauhöhen 2 min nach Zugabe der jeweiligen Substanz erhoben (Abb. 9 b.- d.).

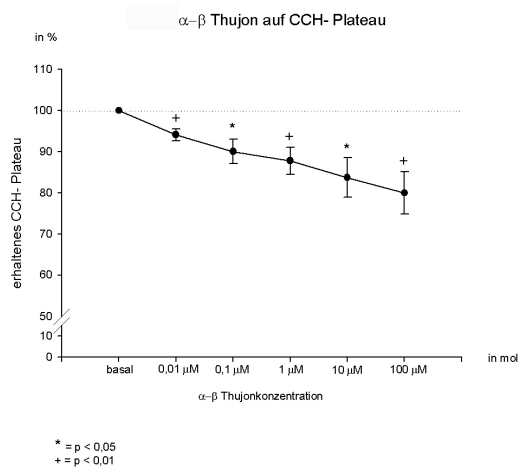
a.)



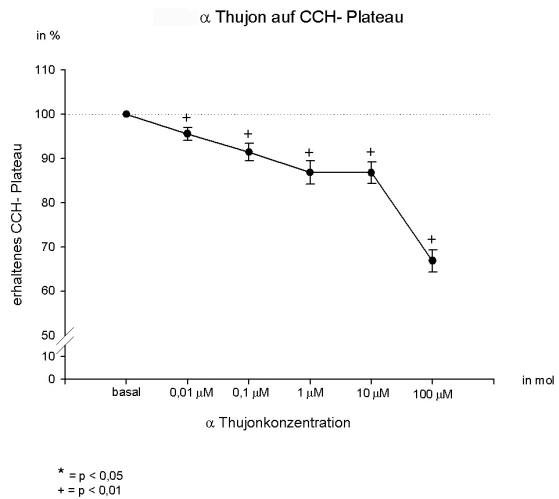
b.)



c.)

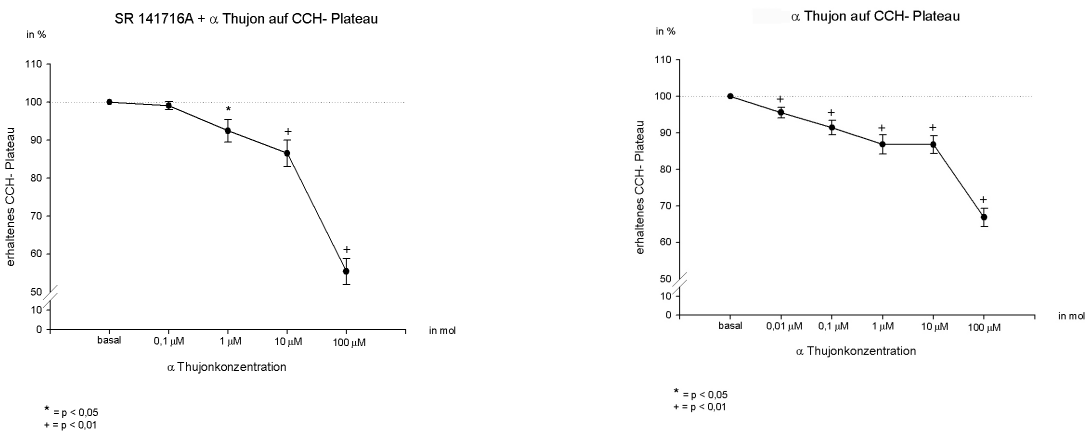


d.)



**Abb. 9 Einfluss der Thujone auf das durch Carbachol ( 1  $\mu\text{M}$  ) induzierte Kontraktionsplateau der glatten Muskulatur im Verhältnis zu einem Versuchablauf ohne Thujon Applikation ( a.)**

Der reduzierende Effekt von  $\alpha$  Thujon auf das durch Carbachol induzierte Kontraktionsplateau wurde durch die Applikation von 1  $\mu\text{M}$  SR 141716A (Cannabinoid 1 Rezeptor Antagonist) weiter verstärkt (n=4) (Abb. 10). Für die Maximaldosierung von 100  $\mu\text{M}$   $\alpha$  Thujon bedeutete dieser Effekt eine weitere Reduzierung des Plateaus um 11,46 %.



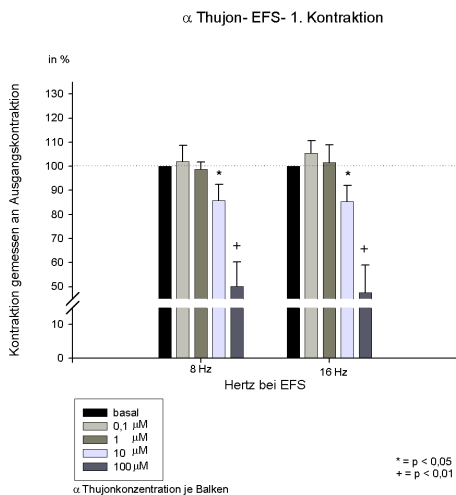
**Abb. 10** vergleichende Darstellung des Einflusses von  $\alpha$  Thujon auf das durch Carbachol induzierte Kontraktionsplateau mit und ohne Applikation von 1  $\mu\text{M}$  SR 141716A

### 3.2.3 Wirkung auf die elektrisch induzierte Kontraktion

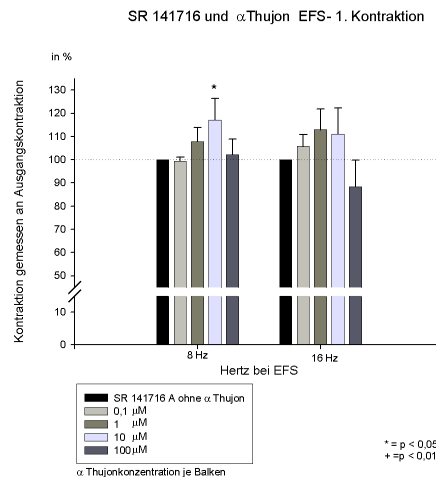
Durch die elektrische Feldstimulation (40V; 2Hz/ 4Hz/ 8Hz/ 16Hz; 1ms Pulsdauer; 10sek.) der einzelnen Organstreifen kommt es zu einer biphasischen verlaufenden Kontraktion. Dabei ist die erste Phase charakterisiert durch eine cholinerg und die zweite Phase durch eine vorwiegend peptiderg vermittelte Kontraktion (eigene Ergebnisse siehe Abschnitt 3.1.3).

Die Substanz  $\alpha$  Thujon hemmte die cholinerg vermittelte Kontraktion ab einer Konzentration von 10  $\mu\text{M}$  signifikant ( $n=5$ ). Bei einer Konzentration von 100  $\mu\text{M}$  betrug der hemmende Effekt  $49,84 \pm 10,08\%$  (8 Hz Stimulationsfrequenz) und  $52,75 \pm 11,92\%$  (16 Hz Stimulationsfrequenz) im Vergleich zu den basalen Konditionen ( Abb. 11a ). Im gleichen Modellversuch mit Applikation und Inkubation des Cannaboid 1 Rezeptor Antagonisten SR 141716A (1 $\mu\text{M}$ ) kam es zu keinem signifikanten reduzierenden Effekt ( $n=6$ ) von  $\alpha$  Thujon auf die cholinerg vermittelte Kontraktion bei elektrischer Feldstimulation ( Abb. 11b).

a)



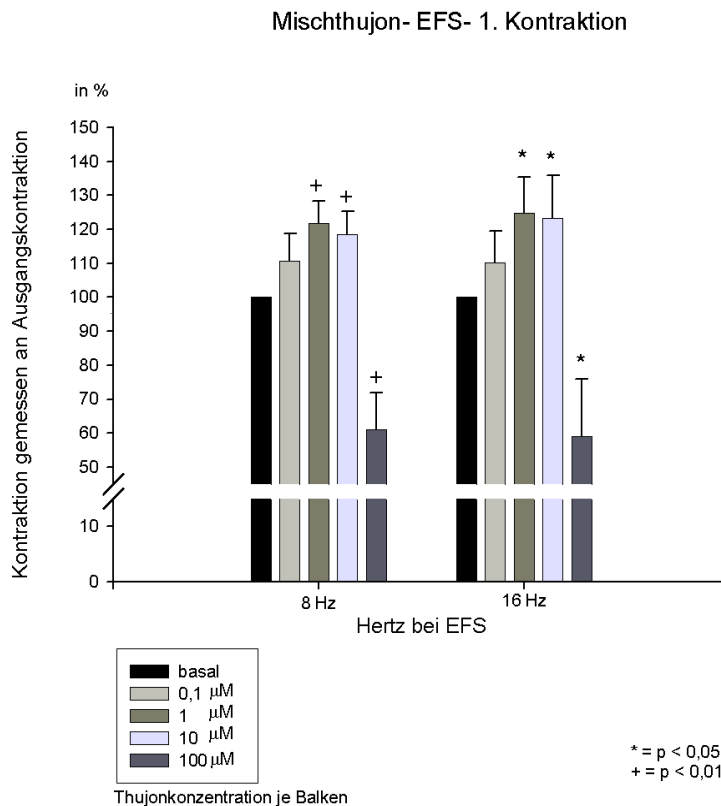
b)



**Abb. 11** vergleichende Darstellung der Wirkung von  $\alpha$  Thujon auf die erste und damit cholinerg vermittelten Komponente der durch Elektrostimulation ausgelösten Kontraktion mit und ohne Applikation von SR 141716A (1 $\mu\text{M}$ )

Die Substanz Mischthujon zeigte einen biphasischen Effekt auf die cholinerg vermittelte Kontraktion. Bei der Gabe von niedrigen Konzentrationen (1  $\mu\text{M}$ , 10  $\mu\text{M}$ ) konnte man

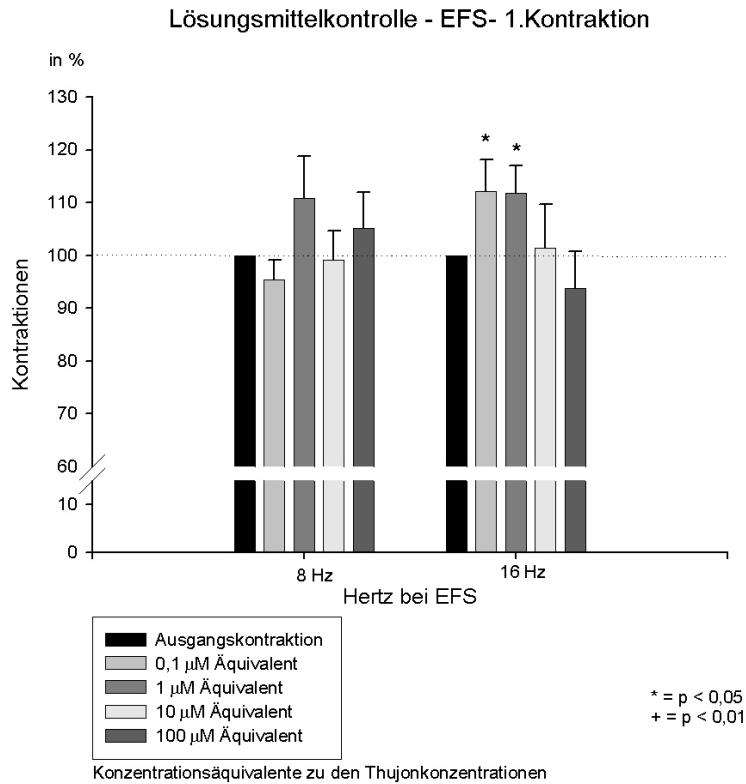
eine signifikante Steigerung der Kontraktion beobachten, wohingegen in hohen Konzentrationen (100  $\mu\text{M}$ ) ein signifikant hemmender Effekt von  $-39,04 \pm 10,93\%$  (8 Hz) und  $-40,98 \pm 16,93\%$  (16 Hz) zu beobachten war (n=6) (Abb. 12).



**Abb. 12.. Darstellung der Wirkung von Mischthujon auf die erste und damit cholinerg vermittelte Komponente der durch Elektrostimulation ausgelösten Kontraktion**

Um eventuelle Beeinflussungen dieser Ergebnisse durch verwendete Lösungsmittel auszuschließen, wurde als Kontrolle eine Lösung erstellt, die die gleichen Anteile Ethanol und Tween, wie die gelösten Thujone enthielt. Diese Lösung wurde in einem identischen Versuchsablauf auf gleiche Weise appliziert, wie das zu testende Thujon.

Dabei konnte keine hemmende Wirkung des cholinergen Anteils der EFS beobachtet werden. Zu beobachten war allerdings eine signifikante Kontraktionserhöhung in niedrigeren Konzentrationsäquivalenten (siehe Stimulationsfrequenz 16 Hz, Abb. 13).



**Abb. 13 Darstellung der hemmenden Wirkung einer Lösung, die dem Lösungsansatz von Thujonen entspricht auf die erste und damit cholinerg vermittelten Komponente der durch Elektrostimulation ausgelösten Kontraktion**

Ähnlich signifikante Beobachtungen konnte man bei der Substanz  $\alpha$ - $\beta$  Thujon nicht finden. Hier blieb das Kontraktionsniveau der cholinergen Komponente auch in hohen Konzentrationen (100  $\mu$ M) nahezu unverändert (Tabelle 4).

**Tabelle 4 Darstellung der Wirkung von  $\alpha$ - $\beta$  Thujon auf die cholinerge Komponente der EFS am Beispiel der Stimulationsfrequenz 8 Hz (n.s. bedeutet nicht signifikant)**

$\alpha$ - $\beta$ Thujon 1 $\mu$ M	+3,41 % $\pm$ 8,46 %	n.s. (n=5)
$\alpha$ - $\beta$ Thujon 10 $\mu$ M	+1,68 % $\pm$ 6,66 %	n.s. (n=5)
$\alpha$ - $\beta$ Thujon 100 $\mu$ M	- 4,78 % $\pm$ 11,09 %	n.s. (n=5)

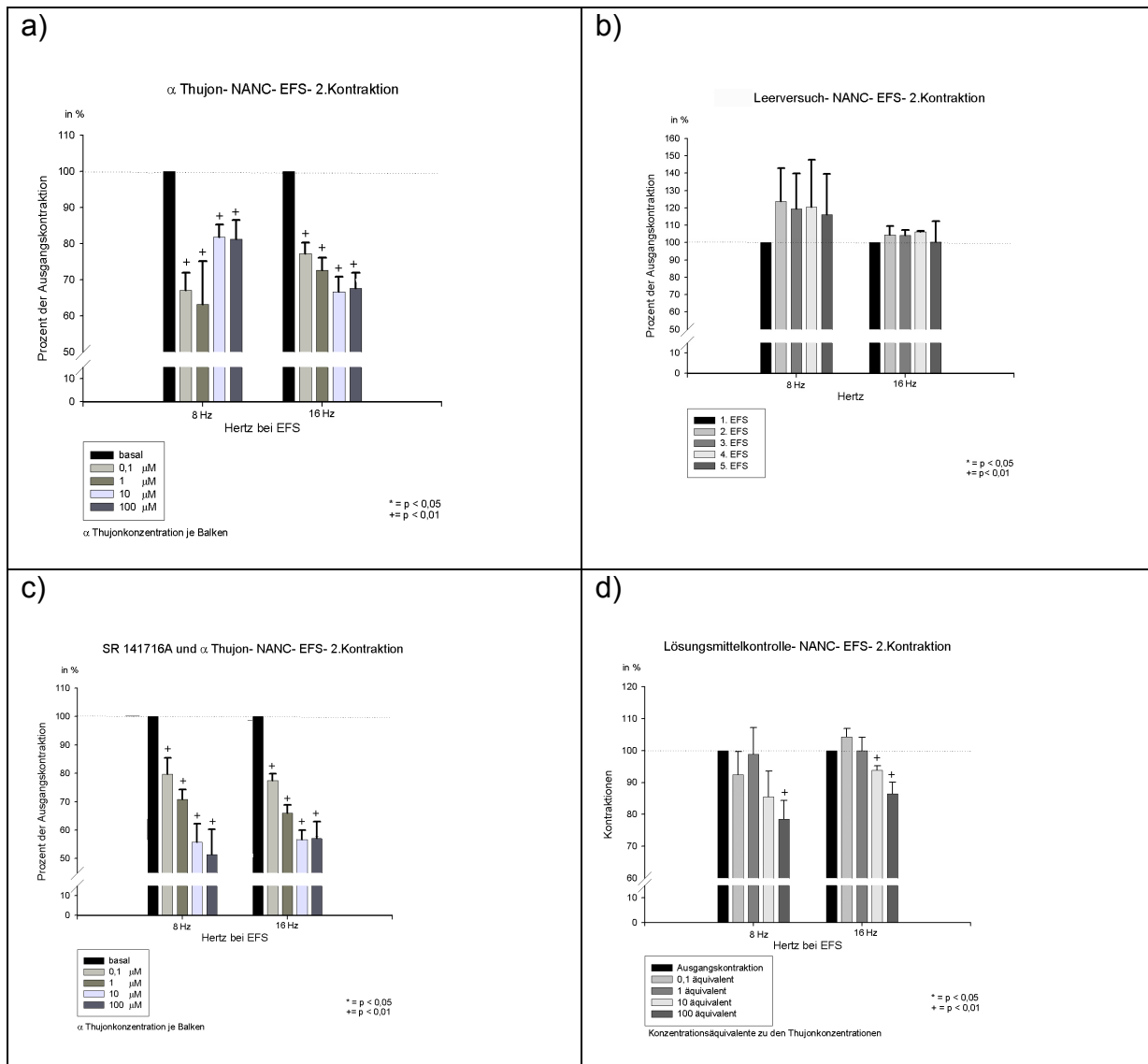
Zur Bestimmung und Auswertung der peptiderge Komponente hatte sich in Vorversuchen gezeigt, dass die Kontraktionsmuster unter nicht adrenergen, nicht-cholinergen Bedingungen stabiler und steter waren. Daher wird die Auswertung der Ergebnisse im Folgenden anhand dieser Daten im anschließenden Kapitel vorgenommen.

### **3.2.4 Wirkung auf die elektrisch induzierte Kontraktion unter nicht adrenergen, nicht cholinergen Bedingungen**

Die Substanz  $\alpha$  Thujon hemmte die peptiderg vermittelte Kontraktion der Organstreifen ab einer Konzentration von 0,1  $\mu$ M signifikant (n=6, p < 0,01). Der hemmende Einfluss zeigte ein relativ stabiles Niveau von durchschnittlich -26,71  $\pm$  4,28% (Stimulationsfrequenz 8 Hz) und -29,64  $\pm$  2,18% (Stimulationsfrequenz 16 Hz) im Vergleich zu den basalen Konditionen (Abb. 14 a und b, basale Konditionen werden als Leerversuch beschrieben).

Bei Durchführung der Lösungsmittelkontrolle zeigt sich in hohen Konzentrationen (10 $\mu$ M – 100 $\mu$ M) ein reduzierender Effekt der verwendeten Lösungsmittel auf die induzierte Kontraktionsantwort.

Auch unter Einfluss des Cannaboid 1 Rezeptor Antagonisten SR 141716A (1 $\mu$ M), der in dieser Konzentration keinen Einfluss auf die untersuchten Parameter hat, ließ sich diese signifikant hemmende Wirkung beobachten (n=6). Hier zeigten sich relativ Niveaus von  $-35,57 \pm 5,86\%$  (Stimulationsfrequenz 8 Hz) und  $-36,43 \pm 5,31 \%$  (Stimulationsfrequenz 16 Hz) (Abb. 14c).



**Abb. 14 Vergleichende Darstellung: Wirkung von  $\alpha$  Thujon auf die peptiderge Kontraktion mit und ohne Applikation von SR141716A und der Leerversuch bei elektrischer Feldstimulation unter nicht adrenergen, nicht cholinergen Bedingungen**



Ähnlich signifikante Beobachtungen konnte man bei den Substanzen  $\alpha$ - $\beta$  Thujon und Mischthujon nicht finden. Hier blieb das Kontraktionsniveau der peptidergen Komponente auch in hohen Konzentrationen (100  $\mu$ M) nahezu unverändert (siehe Tabelle 5 ).

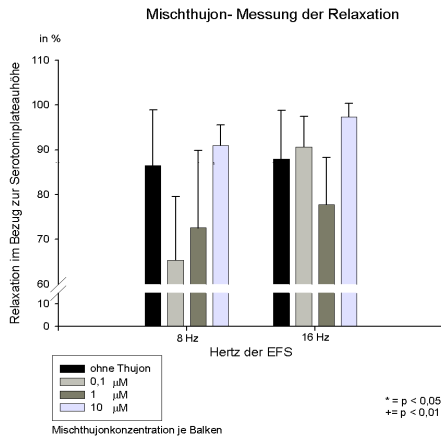
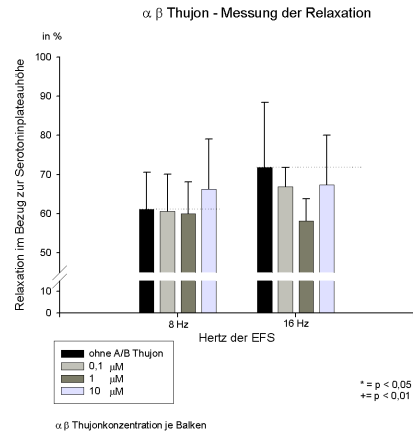
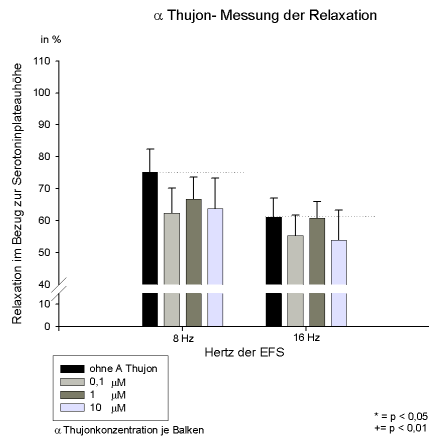
**Tabelle 5 Darstellung der Wirkung von  $\alpha$ - $\beta$  Thujon auf die peptiderge Kontraktionskomponente unter nicht adrenergen, nicht cholinergen Bedingungen der elektrischen Feldstimulation (n.s. bedeutet nicht signifikant)**

Konzentration	Stimulationsfrequenz 8 Hz	Stimulationsfrequenz 16 Hz
$\alpha$ - $\beta$ Thujon 1 $\mu$ M	-0,48 $\pm$ 7,55 %	+11,46 $\pm$ 10,01 %
$\alpha$ - $\beta$ Thujon 10 $\mu$ M	+4,35 $\pm$ 8,21 %	+5,09 $\pm$ 10,09 %
$\alpha$ - $\beta$ Thujon 100 $\mu$ M	-0,76 $\pm$ 10,43 %	+6,69 $\pm$ 10,01 %
$\alpha$ - $\beta$ Thujon 1 $\mu$ M	n.s. (n=5)	n.s. (n=5)
$\alpha$ - $\beta$ Thujon 10 $\mu$ M	n.s. (n=5)	n.s. (n=5)
$\alpha$ - $\beta$ Thujon 100 $\mu$ M	n.s. (n=5)	n.s. (n=5)

### **3.2.5 Einfluss auf die elektrisch induzierte Relaxation unter nicht adrenergen, nicht cholinergen- Bedingungen**

Eine elektrische Stimulation (10sek./ 40V / 1ms / 2–16Hz) unter nicht adrenergen, nicht cholinergen Bedingungen führt zur frequenzabhängigen Relaxation mit anschließender Kontraktion des durch Serotonin (1  $\mu$ M) vorstimulierten Dünndarmsteifens (Abschnitt 3.1.4).

Wie in Abb. 15 zu erkennen, zeigten die untersuchten Thujone keine signifikante Wirkung (n=5) auf die durch Serotonin und elektrische Feldstimulation hervorgerufene Relaxation der Muskelstreifen.



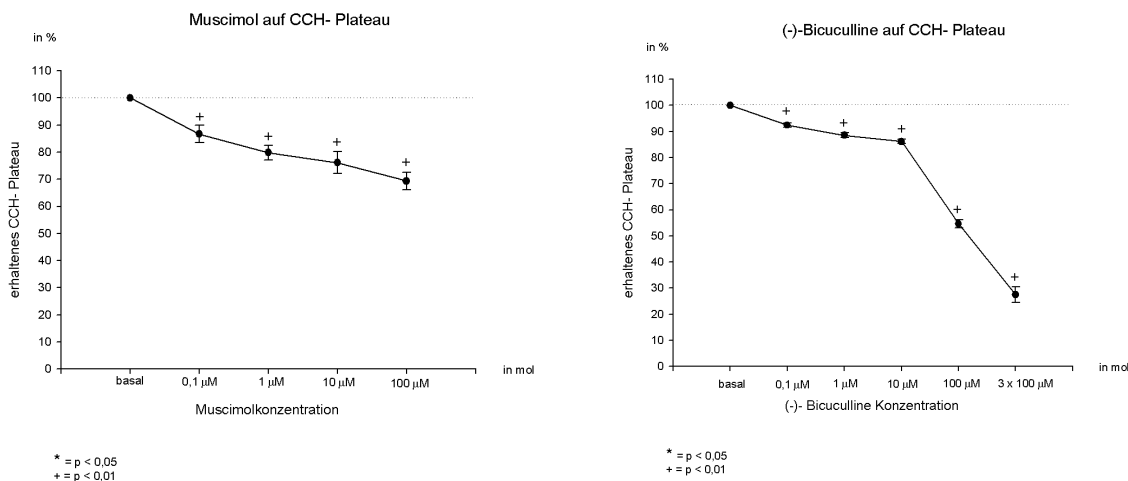
**Abb. 15 Vergleich der Thujone in deren Wirkung auf die Relaxation**

### 3.3 GABA- erge Substanzen

#### 3.3.1 Einfluss auf die pharmakologisch stimulierten Muskelstreifen

(-)- Bicuculline Methochlorid und Muscimol nehmen in unterschiedlicher Weise und Potenz Einfluss auf die GABA- A Rezeptoren. Dabei ist (-)- Bicuculline Methochlorid ein Antagonist und Muscimol ein Agonist des GABA- A Rezeptors [12].

Beide Substanzen zeigten ab einer Konzentration von 0,1  $\mu\text{M}$  einen signifikanten inhibierenden Effekt auf das durch Carbachol induzierte Plateau ( $n=5$ ,  $p < 0,01$ ). Dabei war dieser Effekt bei hoher Konzentration (100  $\mu\text{M}$ ) bei der Substanz (-)- Bicuculline mit  $-45,35 \pm 1,55\%$  deutlich ausgeprägter im Vergleich zu Muscimol  $-30,66 \pm 3,16\%$  (Abb. 16).



**Abb. 16** vergleichende Darstellung des Einflusses von Muscimol und (-)- Bicuculline auf das durch Carbachol induzierte Kontraktionsplateau

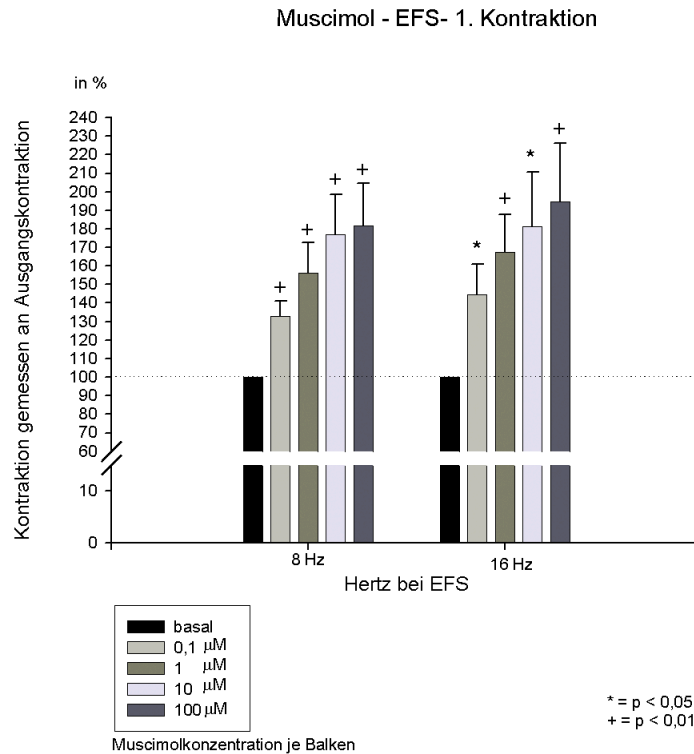
### 3.3.2 Wirkung auf die elektrisch induzierte Kontraktion

Durch die elektrische Feldstimulation (40V; 2Hz/ 4Hz/ 8Hz/ 16Hz; 1ms Pulsdauer; 10sek.) der einzelnen Organstreifen kommt es, wie in Punkt 3.1.3 beschrieben zu einer biphasischen verlaufenden Kontraktion. Die cholinerge Komponente dieser Kontraktionsantwort wurde durch den GABA- A Rezeptorantagonisten (-)- Bicuculline ab einer Konzentration von 100  $\mu$ M signifikant gesteigert (Tabelle 6).

**Tabelle 6 Darstellung der Wirkung von (-)- Bicuculline auf die cholinerge Komponente der EFS am Beispiel der Stimulationsfrequenz 16 Hz (n.s. bedeutet nicht signifikant)**

(-)- Bicuculline 1 $\mu$ M	-2,31 $\pm$ 8,61 %	n.s. (n=5)
(-)- Bicuculline 10 $\mu$ M	-1,49 $\pm$ 6,13 %	n.s. (n=5)
(-)- Bicuculline 100 $\mu$ M	+23,42 $\pm$ 10,15 %	p < 0,05 (n=5)

Die Substanz Muscimol (GABA- A Rezeptor Agonist) hatte auf die durch elektrische Feldstimulation getriggerte cholinerge Kontraktion einen konzentrationsabhängigen verstärkenden Effekt, der ab einer Konzentration von 0,1  $\mu$ M signifikant war ( p < 0,01; n=6). Bei einer Konzentration von 100  $\mu$ M wurde eine Verstärkung dieser Kontraktion von +81,62  $\pm$  22,90% (Stimulationsfrequenz 8 Hz) und +94,78  $\pm$  31,30% (Stimulationsfrequenz 16 Hz) im Vergleich zu basalen Konditionen erreicht ( Abb. 17).



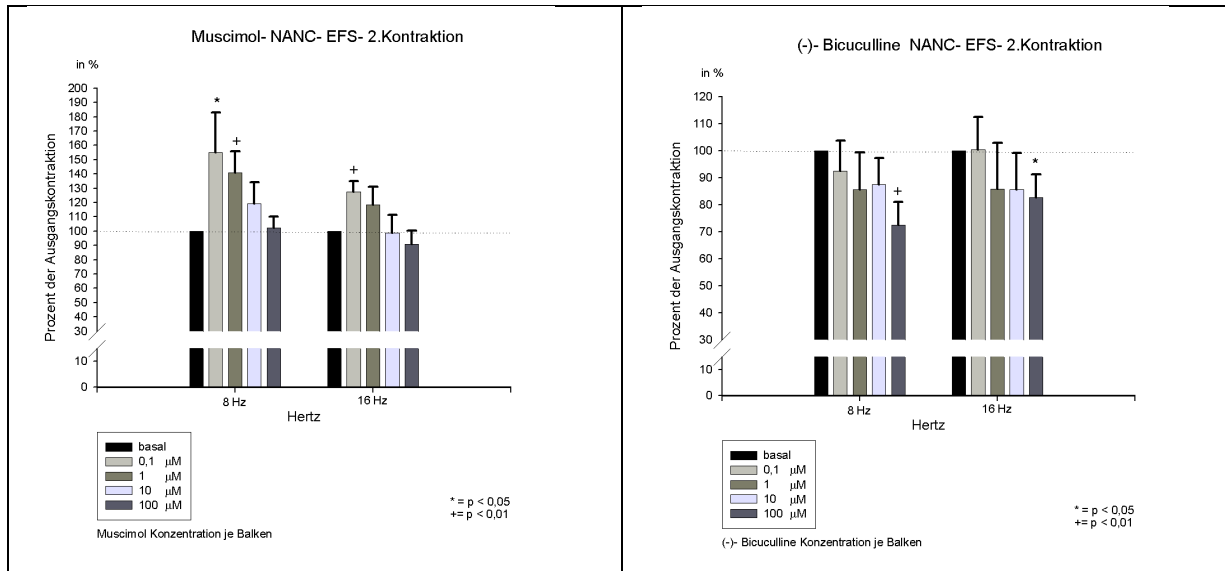
**Abb. 17 Wirkung von Muscimol auf die durch EFS hervorgerufene cholinerge Komponente der Kontraktionsantwort**

### **3.3.3 Wirkung auf die elektrisch induzierte Kontraktion unter nicht adrenergen, nicht cholinergen Bedingungen**

Eine unter nicht adrenergen, nicht cholinergen Bedingungen durchgeführte elektrische Feldstimulation (40V; 2Hz/ 4Hz/ 8Hz/ 16Hz; 1ms Pulsdauer; 10sek.) ist charakterisiert durch eine wie in Abb. 5 gezeigte peptiderg vermittelte Kontraktion. Bei der Testung der GABA Agonisten und Antagonisten ergab sich folgendes Ergebnis:

Die Substanz Muscimol hatte einen signifikant steigernden Effekt in niedrigen Konzentrationen (n=6, p < 0,05 bzw. p < 0,01), der sich mit steigender Konzentration jedoch wieder den basalen Konditionen anglich.

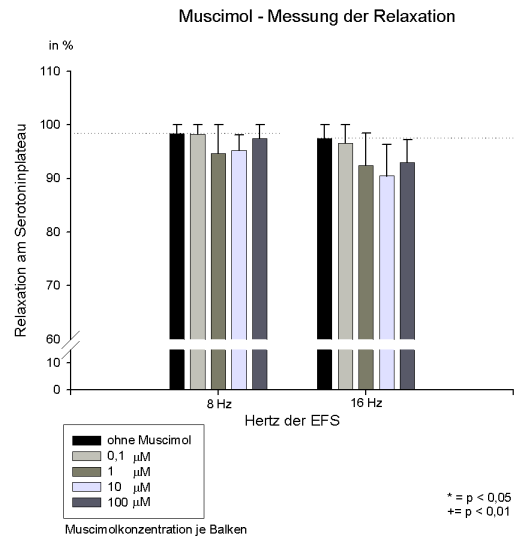
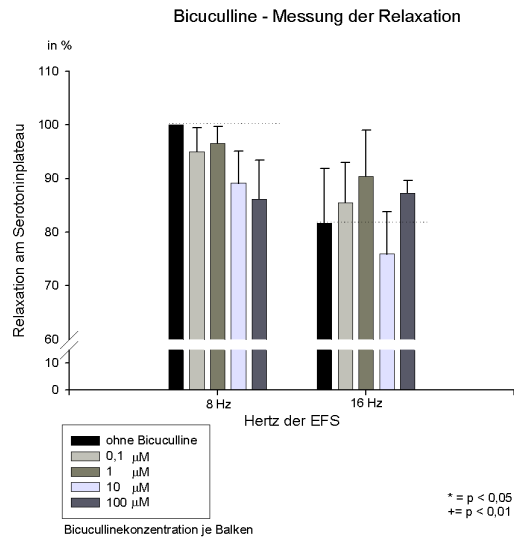
(-)- Bicuculline zeigte in diesem Versuchsmodell inhibierende Tendenzen, die erst in hohen Konzentrationen (100  $\mu\text{M}$ ) signifikant wurden ( $n=6$ , 8Hz =  $p < 0,01$ ; 16 Hz =  $p < 0,05$ ) ( Abb. 18).



**Abb. 18 Wirkung von Muscimol und (-)- Bicuculline auf die peptiderge Kontraktionsantwort durch elektrische Feldstimulation unter nicht adrenergen, nicht cholinergen Bedingungen**

### 3.3.4 Einfluss auf die elektrisch induzierte Relaxation unter nicht adrenergen, nicht cholinergen- Bedingungen

Um die Wirkung von GABA, (-)- Bicuculline und Muscimol auf die Relaxation zu untersuchen, wurde das im Methodikteil unter Punkt 2.3.5 beschriebene Schema angewandt. Die isolierten Muskelstreifen wurden jeweils mit Serotonin 1  $\mu\text{M}$  vorstimuliert. Bei der auf dieser Art und Weise vorbereiteten Muskulatur führte eine elektrische Feldstimulation (10 sek./ 40 V / 1 ms / 2–16Hz) unter nicht- adrenergen, nicht- cholinergen Bedingungen (Anwesenheit von Atropin 1  $\mu\text{M}$  und Guanethidin 1  $\mu\text{M}$ ) zu einer frequenzabhängigen Relaxation. Die hier getesteten Substanzen hatten keinen signifikanten Einfluss ( $n=5$ ) auf die Relaxation (Abb. 19).

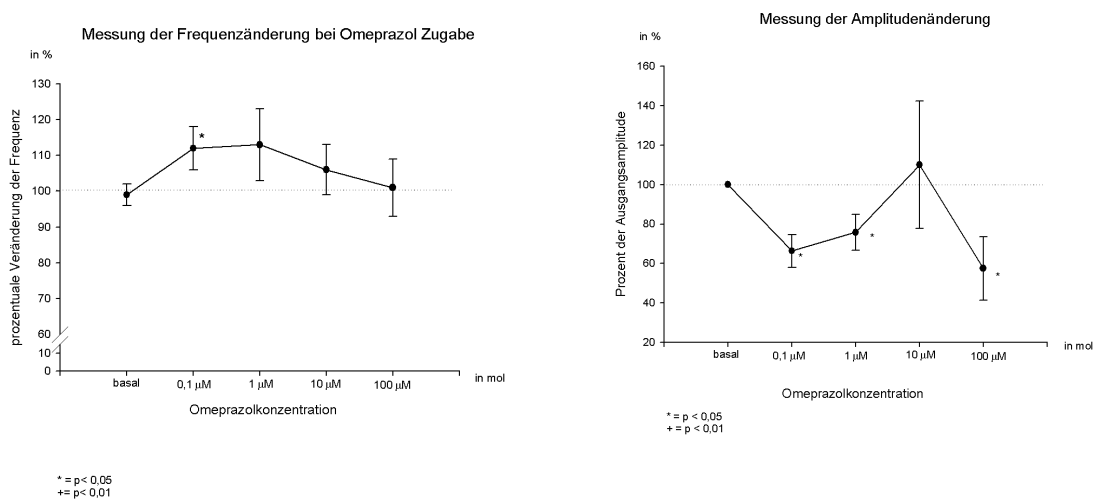


**Abb. 19 Einfluss von (-) Bicuculline, Muscimol auf die Relaxation**

### 3.4 Omeprazol

#### 3.4.1 Wirkung auf den Basaltonus und die Ruheaktivität der Muskelstreifen

Der Protonenpumpeninhibitor Omeprazol zeigte in unserem Organbad- Versuchsmodell keine signifikante Wirkung auf den Basaltonus sowie die Spontanaktivität der präparierten Muskelstreifen (n=6, Daten nicht angegeben). Zur genaueren Bestimmung der Ruheaktivität wurden die Parameter Kontraktionsfrequenz und –amplitude bei steigender Dosierung von Omeprazol untersucht. Wie in Abb. 20 zu erkennen, erhöhte sich die Frequenz der Muskelkontraktionen bei einer Zugabe von 0,1  $\mu\text{M}$  Omeprazol signifikant um  $+12 \pm 6\%$  (n=5) und kehrte bei steigender Konzentration von Omeprazol (-100  $\mu\text{M}$ ) auf Werte vergleichbar den basalen Ausgangswerten ( $+1 \pm 8\%$ ) zurück. Die Ergebnisse bezüglich der Kontraktionsamplitude ließen keine Tendenz in Bezug auf die steigende Konzentration der Substanz Omeprazol erkennen.



**Abb. 20** Änderung der Kontraktionsfrequenz und –amplitude bei steigender Omeprazolkonzentration



### 3.4.2 Einfluss auf die pharmakologisch stimulierten Muskelstreifen

Omeprazol, das zu einem mit Carbachol vorstimulierten Muskel zugegeben wurde, führte in hohen Konzentrationen (100  $\mu\text{M}$ ) zu einer signifikanten Abschwächung des Plateaus ( $-20,46 \pm 6,75\%$ ,  $n= 6$ ) (Tabelle 7).

**Tabelle 7 Einfluss von Omeprazol auf das durch Carbachol ( 1 $\mu\text{M}$  ) induzierte Kontraktionsplateau der glatten Muskelzelle im Vergleich zu basalen Konditionen (n.s. bedeutet nicht signifikant)**

Konzentration	Plateauänderung	Signifikanz
Omeprazol 1 $\mu\text{M}$	$+1,57 \pm 5,51 \%$	n.s. (n=6)
Omeprazol 10 $\mu\text{M}$	$+3,15 \pm 9,55 \%$	n.s. (n=6)
Omeprazol 100 $\mu\text{M}$	$- 20,46 \pm 6,75 \%$	$p < 0,01$ (n=6)

### 3.4.3 Wirkung auf die elektrisch induzierte Kontraktion

Um den Einfluss von Omeprazol auf die Kontraktionsfähigkeit der glatten Muskelzelle am Ileum der Ratte zu untersuchen, wurde nach dem im Methodikteil unter Punkt 2.3.3 beschriebenen Stimulationsschema vorgegangen. Die durch elektrische Feldstimulation hervorgerufene cholinerge Kontraktionsantwort wurde durch Omeprazol (0,1  $\mu\text{M}$ -100 $\mu\text{M}$ ) nicht signifikant gehemmt.

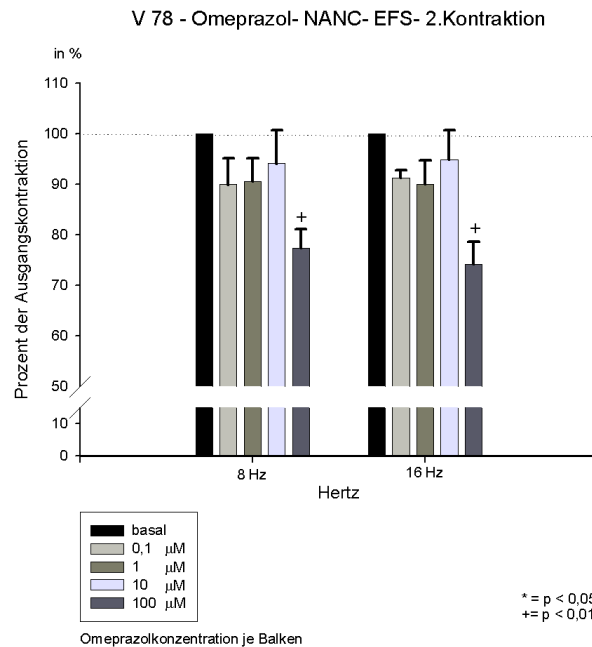
**Tabelle 8 Einfluss von Omeprazol auf die durch elektrische Feldstimulation induzierte cholinerge Kontraktionsantwort**

Konzentration	Einfluss auf cholinerge Kontraktion	Signifikanz
Omeprazol 1 $\mu\text{M}$	$-3,08 \pm 6,96 \%$	n.s. (n=4)
Omeprazol 10 $\mu\text{M}$	$+3,98 \pm 8,30 \%$	n.s. (n=4)
Omeprazol 100 $\mu\text{M}$	$+2,24 \pm 5,43 \%$	n.s. (n=4)

### **3.4.4 Wirkung auf die elektrisch induzierte Kontraktion unter nicht adrenergen, nicht cholinergen Bedingungen**

Eine unter nicht adrenergen, nicht cholinergen Bedingungen durchgeführte elektrische Feldstimulation (40V; 2Hz/ 4Hz/ 8Hz/ 16Hz; 1ms Pulsdauer; 10sek.) ist charakterisiert durch eine peptiderg vermittelte Kontraktion (Abschnitt 3.1.3). Wie sich in Vorversuchen zeigte, ist unter nicht adrenergen, nicht cholinergen Bedingungen eine konstantere Auswertung der peptidergen Komponente gegeben ( siehe Abb. 6).

Omeprazol konnte die peptiderge Kontraktionsantwort reduzieren. Besonders ausgeprägt war dieser Effekt in einer Omeprazolkonzentration von 100  $\mu\text{M}$  (Stimulationsfrequenz 8 Hz:  $-22,61 \pm 3,75\%$ ; Stimulationsfrequenz 16 Hz:  $-25,81 \pm 4,41\%$ ) (Abb. 21).

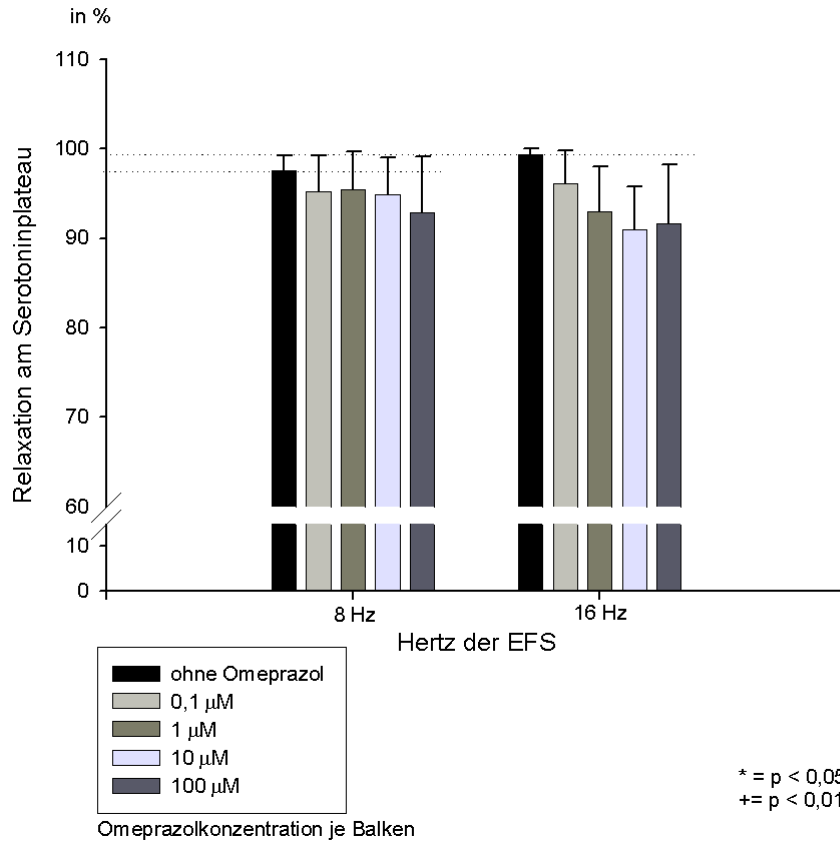


**Abb. 21 Wirkung von Omeprazol auf die peptiderge Kontraktionsantwort bei elektrischer Feldstimulation unter nicht adrenergen, nicht cholinergen Bedingungen**

### 3.4.5 Einfluss auf die elektrisch induzierte Relaxation unter nicht adrenergen, nicht cholinergen- Bedingungen

Um den Einfluss von Omeprazol auf die Relaxation zu untersuchen, wurde das im Methodikteil unter Punkt 2.3.5 beschriebene Versuchsschema angewandt. Die dabei induzierte Relaxation (siehe Abschnitt 3.1.4) wurde durch den Protonenpumpeninhibitoren Omeprazol nicht signifikant beeinflusst (n=6).

### V23- Omeprazol- Messung der Relaxation



**Abb. 22 Wirkung von Omeprazol auf die durch Serotoningabe ( 1 μM) und elektrische Feldstimulation induzierte Relaxation am Organstreifen**

## **4 Allgemeine Diskussion**

### **4.1 Die glatte Muskulatur des Dünndarms**

Die Hauptfunktion der glatten Muskulatur des Darms ist den Darminhalt durchzumischen und voranzutreiben, um eine effiziente Verdauung und die schrittweise Aufnahme der Nährstoffe zu ermöglichen. Diese Funktion wird durch intrinsisch elektrische und mechanische Eigenschaften der glatten Muskulatur geregelt, welche mannigfaltig hormonell und nerval beeinflusst werden.

#### **4.1.1 Struktur der glatten Muskulatur**

Die glatte Muskulatur des Darms besteht aus einer dünneren, äußeren, longitudinalen Schicht und einer dickeren, inneren, dichter innervierteren zirkulären Schicht. Die Muskelschichten leiten ihren Namen von der Ausrichtung der Muskelzellen ab. Die Schichten werden von Septen in 1mm dicke Bündel unterteilt, welche als kontraktile Einheiten fungieren. In diesen Schichten ebenfalls vorhanden sind Glia Zellen, Fibroblasten und ein bedeutender Anteil an interstitiellen Zellen von Cajal (ICC) [82].

Die einzelnen Muskelzellen sind im Relaxationszustand ca. 400 µm lang und 5 µm breit. Sie sind spindelförmig und haben eine große Oberfläche im Verhältnis zu ihrem Volumen [42, 44, 43]. Über 80% des Interieurs einer Zelle besteht aus kontraktile Filamenten wohingegen 20 % aus verschiedenen Organellen, wie Nukleus, Mitochondrien, Golgi Apparat, Lysosomen, rauhen und glattem endoplasmatischem Reticulum bestehen [44]. Letzteres hat einen Anteil von 2 % am Zellvolumen und ist der Ort, der für die Kontraktion so wichtigen Calciumaufnahme und Abgabe [16, 17, 99, 109].

## 4.1.2 Mobilisation des kontraktiven Aktivators Calcium

Die Konzentration von Calcium im Zytosol der Muskelzelle ist ein entscheidender Faktor für die Aktivität der glatten Muskulatur. Es gibt zwei Mechanismen, die zu einem Anstieg von zytosolischem Calcium führen: zum einen die Interaktion eines Agonisten mit einem membranständigem Rezeptor, welcher über einen Transduktionsweg zu einer Calciumausschüttung intrazellulärer Speicher führt. Zum anderen die Interaktion eines kontraktiven Agonisten mit einem Rezeptor, welcher zu einer Depolarisation der Plasmamembran führt und dadurch spannungsabhängige  $\text{Ca}^{2+}$  Kanäle öffnet. Die erste Art findet man in der zirkulären Schicht, die Zweite in der Longitudinalen.

### 4.1.2.1 Mobilisation von Calcium in den longitudinalen Muskelschichten

Durch Bindung eines Agonisten an seinen spezifischen Rezeptor kommt es zu folgender Kaskade:

1. Aktivierung des transduzierenden G Proteins,
2. Aktivierung der Phospholipase  $A_2$  ( $\text{PLA}_2$ ) [91]
3. Hydrolyse vom membranständigem Phosphatidylcholin zu Arachidonsäure (AA)
4. Arachidonsäure (AA) aktiviert den Chlorid ( $\text{Cl}^-$ ) Kanal mit daraus folgendem  $\text{Cl}^-$  Ausstrom [68]
5. Depolarisation der Plasmamembran mit Öffnung der  $\text{Ca}^{2+}$  Kanäle
6. Einstrom von  $\text{Ca}^{2+}$  in die Zelle
7. die ansteigende  $\text{Ca}^{2+}$  Konzentration im Zytosol verursacht eine Ausschüttung des  $\text{Ca}^{2+}$  aus dem endoplasmatischem Reticulum (ER)[50]
8. zudem aktiviert  $\text{Ca}^{2+}$  die membrangebundene Adenosin Diphosphoribosyl Zyklase (ADPR Cyclase)
9. Synthese von zyklischer Adenosin Diphospho- Ribose (cADPR)

10. cADPR agiert als  $\text{Ca}^{2+}$  mobilisierender Messenger am endoplasmatischem Retikulum (ER) [67]

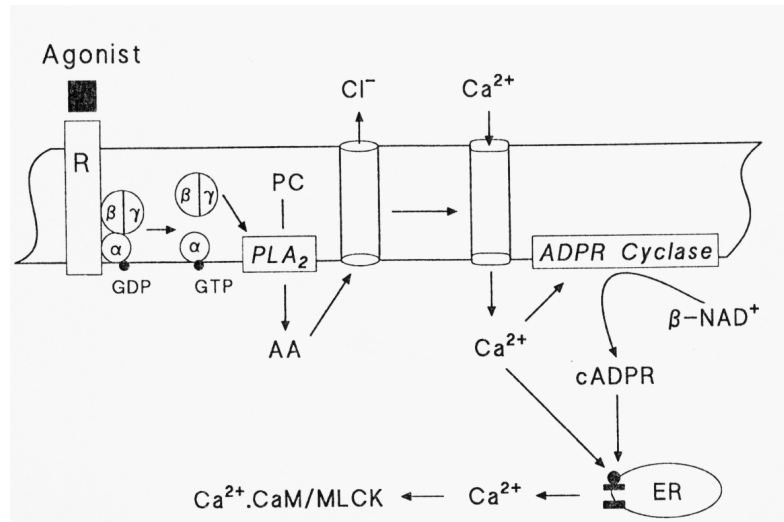


Abb. 23 schematische Darstellung des Signaltransduktionsweges für Calcium mobilisierende Agonisten in glatten Muskelzellen der longitudinalen Schicht [4]

### 4.1.3 nervale Regulation der glatten Muskulatur durch den Myenterischen Plexus

Seit Jahrzehnten ist bekannt, dass die Regulation der intestinalen Motilität abhängig von der koordinierten Aktivität der enterischen Neurone ist. Diese haben viele verschiedene interagierende Funktionen. Costa et al. [29] identifizierte mindestens 11 verschiedene Typen von Neuronen im myenterischen Plexus des Meerschweinchens auf der Basis ihrer Neurochemie und Projektion.

#### 4.1.3.1 Topographie des myenterischen Plexus

Die neuronale Organisation des enterischen Nervensystems ist bei Säugetieren gut beschrieben und wurde intensiv an Meerschweinchen, Ratten, Hunden und dem Menschen erforscht [29, 75, 124, 126]. Neurone des myenterischen Plexus sind

untereinander, mit Neuronen des submukösen Plexus, sowie mit den paravertebralen Ganglien verbunden und innervieren Muskelzellen der zirkulären und longitudinalen Schicht. Fortschritte in der Immunhistochemie machen es möglich diese Neurone nach ihren morphologischen, elektrophysiologischen und neurochemischen Eigenschaften zu entschlüsseln.

Neurone des myenterischen Plexus fallen in zwei Hauptkategorien: 25 % enthalten VIP und PACAP zusammen mit Stickstoffmonoxid Synthase (NOS), dem Enzym, welches für die Synthese von Stickstoffmonoxid (NO) in den terminalen Endigungen der Nerven verantwortlich ist. 50%- 60 % enthalten Acetylcholin zusammen mit dem Tachykinin, Substanz P (SP). Es gibt keine Überlappen dieser beider Kategorien [29, 28, 75, 124, 126]. Einige wenig Neurone enthalten Gamma Aminobuttersäure (GABA), Serotonin (< 3%), oder Somatostatin (< 5%).

#### **4.1.3.2 Enterische Motorneurone und ihre Transmitter**

Peptiderge und nicht peptiderge Transmitter werden von den axonalen Enden der Nerven nahe der Muskelzelle ausgeschüttet. Sie diffundieren über eine Strecke von 20 zu 100 nm und interagieren mit den Rezeptoren der Muskelzelle. Die Identifikation der Transmitter, welche von den enterischen Motoneuronen ausgeschüttet werden, ist stark fortgeschritten. Parallel dazu wurde festgestellt, dass jede Klasse enterischer Motoneurone sich nicht nur einen, sondern multiple Transmitter zunutze macht. Dies fing mit der Identifikation der Tachykinine (TK) als Cotransmitter von Acetylcholin [70] an, welches einen direkten, exzitatorischen Stimulus auf enterische Motoneurone hat [57, 116].

Inhibitorische Neurone benutzen ebenfalls multiple Transmitter mit unterschiedlicher Gewichtung jedes Einzelnen, abhängig von der Region im gastrointestinalen Trakt und der Spezies [27]. ATP, Stickstoffmonoxid (NO), vasoaktives intestinales Peptid (VIP) und pituitary adenylyl cyclase activating peptide (PACAP) wurden alle als Mediatoren der Inhibition neuromuskulärer Übertragung identifiziert [73]. VIP und PACAP sind mit



der Stickstoffmonoxid- Synthase (NOS) in inhibitorischen Motoneuronen kolokalisiert [23].

Dieses Basisschema ist anwendbar auf die meisten Spezies, wie z.B.

Meerschweinchen, Maus, Ratte und Mensch [23, 76, 98, 104]. Es unterscheiden sich die einzelnen Arten insofern, dass einige Motoneuronen zusätzliche Neurochemische Marker, wie z.B. Enkephaline oder GABA enthalten.

**Tabelle 9 Neurochemie der menschlichen enterischen Neurone und die vermutete Funktion**

Neurochemie des myenterischen Plexus	Funktion
± NO/ ± ATP/ ± VIP/ ± NPY [13, 88, 93, 98, 124, 125]	Inhibitoren der Muskelmotoneuronen
ACH/ ± SP/ ± ENK; Galanin[9, 93, 98, 124, 125], Neurokinine	Exzitatoren der Muskelmotoneuronen

(ATP: Adenosin Triphosphat, ENK: Enkephalin, NO: Stickstoffmonoxid, VIP: vasoaktives intestinales Peptid, NPY: Neuropeptid Y, ACH Acetylcholin, SP: Substanz P)

Die Aktivierung exzitatorischer Motorneurone der zirkulären Schichten durch elektrische Stimulation oder durch physiologische Reflexe( z.B. der peristaltische Reflex) führt zu einer Depolarisation und Kontraktion der glatten Muskulatur. Diese Antwort ist weitestgehend durch Acetylcholin [70] vermittelt, wobei jedoch eine residuale Kontraktion in der Anwesenheit von muskarinen Antagonisten verbleibt. Dieses Residuum wird vermutlich durch Tachykinin (TK) Antagonisten vollständig aufgehoben. Aus diesem Grund geht man davon aus, dass die gesamte exzitatorische Kontraktionsantwort durch ACH und TK vermittelt wird [19].

Die Innervation und Regulation der longitudinalen Muskelschicht ist weitaus weniger verstanden als die der zirkulären Schicht und scheint unter den Spezies und Regionen stärker zu variieren [19]. Anatomische und histochemische Studien weisen darauf hin, dass eine große Mehrheit an longitudinalen Muskelmotoneuronen cholinerge Neurone sind, welche auch TK enthalten [23, 29]. Die longitudinalen Schichten z.B. des

Meerschweinchen Dickdarms werden im Gegensatz zum Dünndarm von inhibitorischen Motoneuronen innerviert, welche die Substanz VIP und/oder das Enzym NOS enthalten [76, 103].

#### **4.1.3.3 Kommunikation der Interneurone**

Im Ileum des Meerschweinchens sind die aufsteigenden Interneurone immunoreaktiv für choline Acetyltransferase (ChAT) und Substanz P [22] und die Erregungsübertragung via Acetylcholin findet an nicotinergen Rezeptoren statt (nAChR)[20]. Dabei fällt auch eine Komponente auf die Neurokinin 3 (NK3) Tachykinin Rezeptoren zurück [20].

Weiterhin lassen sich mindestens 3 unterschiedliche Klassen von absteigenden Bahnen unterscheiden[29]. Diese Bahnen wurden aufgrund ihrer Eigenschaften hinsichtlich ihres inhibitorischen bzw. exzitatorischen Effekts auf Motoneurone genau charakterisiert. Die absteigenden, inhibitorischen Bahnen vermitteln ihre Erregungsübertragung weitgehend über ATP, welches an P2X Rezeptoren ansetzt [15]. Die Hauptinterneurone der absteigenden Bahnen des Ileum scheinen die NOS/ VIP Neurone zu sein [20].

#### **4.2 Die Thujone**

Das natürliche Produkt Thujon findet man in vielen verschiedenen Pflanzen, wie Artemisia absinthum- Wermut, Salbei oder Thuja occidentalis- dem Lebensbaum [32]. Die frischen Blätter des Lebensbaums enthalten 0,6 % ätherisches Öl, welches zu 65 % Thujon und 8% Isothujon besteht [53]. Thujon kommt in der Natur als eine Mischung von  $\alpha$  und  $\beta$  Isomeren vor [110, 120]. Dabei entfallen 80 % auf  $\alpha$  - und 20 % auf  $\beta$  Thujon.

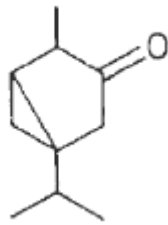


Abb. 24 Grundstrukturformel von Thujon

## 4.2.1 Biochemie und Struktur der Thujone

### 4.2.1.1 Metabolisation von $\alpha$ Thujon

In mehreren Tierversuchen wurde der Metabolisationsweg und die daraus resultierenden Metaboliten untersucht. Höld et al identifizierten bei Inkubation von  $\alpha$  Thujon mit Hasenleberzytosol Thujol und Neothujol als Hauptmetaboliten [56].

Weiterhin wurde gezeigt, dass  $\alpha$  Thujon in Anwesenheit von Nicotinamidadenindinukleotidphosphat (NADPH) aus Maus- Leberenzymen rasch metabolisiert wird. Dabei entsteht der Hauptmetabolit 7- Hydroxy-  $\alpha$  Thujon sowie 5 weitere Untermetaboliten (4- Hydroxy-  $\beta$  Thujon; 7,8- Dehydro  $\alpha$  Thujon; 4- Hydroxy-  $\alpha$  Thujon und Thujol) [56] ( Abb. 25).

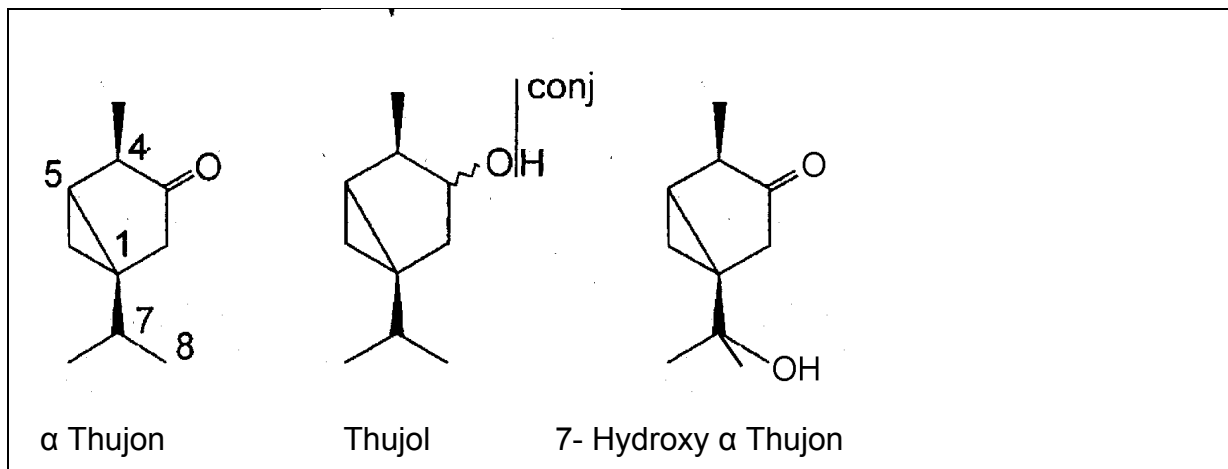


Abb. 25 Strukturformeln von  $\alpha$  Thujon und seiner Metaboliten Thujol und 7-Hydroxy  $\alpha$  Thujon

## 4.2.2 Interaktion von Thujon mit verschiedenen Rezeptoren

In einer Reihe von Studien wurde der Wirkmechanismus der Thujone im Hinblick auf die Affinität auf verschiedene Rezeptoren untersucht. Im Folgenden soll nun ein Überblick über bis dato gewonnenen Kenntnisse erstellt werden.

### 4.2.2.1 Einfluss auf den 5-HT<sub>3</sub> Rezeptor

Der 5-HT<sub>3</sub>-Rezeptor nimmt als ligandengesteuerter Ionenkanal eine einzigartige Stellung unter den 5-HT-Rezeptoren ein. Er besteht aus 5 Proteinmolekülen und ist selektiv für die Passage von Natrium- und Kaliumionen. Dieser ausschließlich auf zentralen und peripheren Neuronen vorkommende Rezeptor ist u.a. für die Auslösung des Brechreflexes verantwortlich.[62]

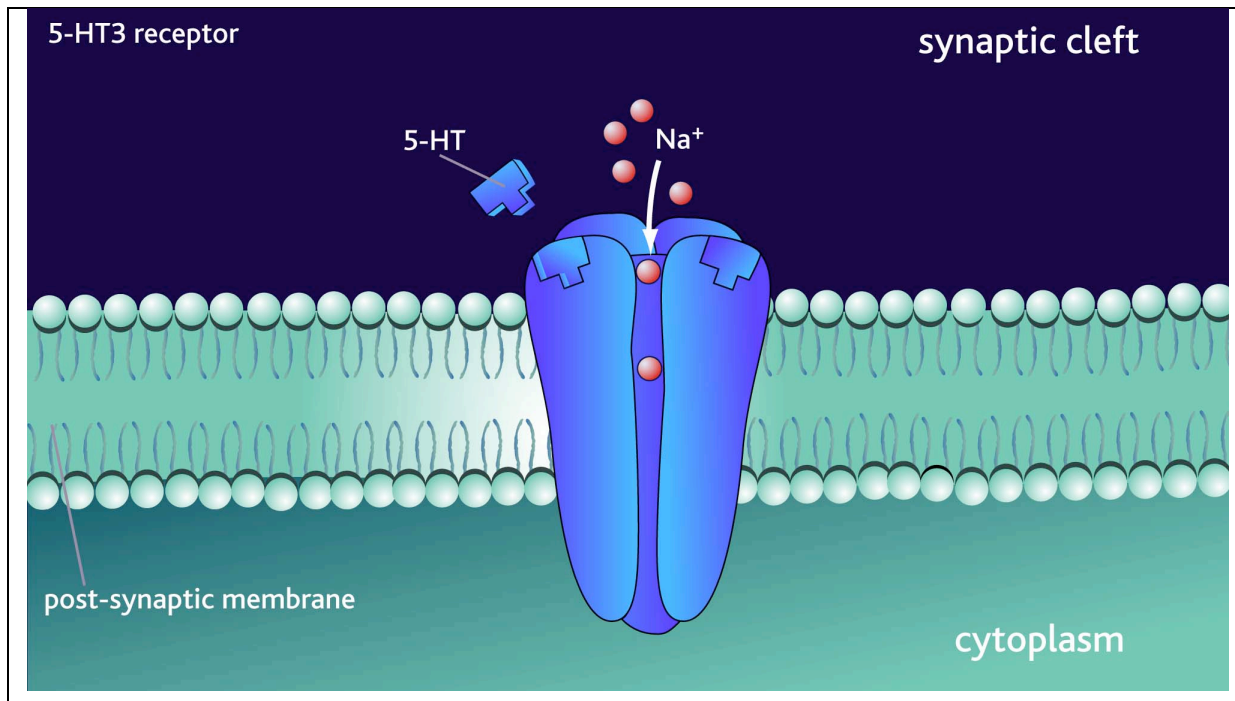


Abb. 26 schematische Darstellung des 5-HT<sub>3</sub> Rezeptors [62]

Im Jahre 2004 konnte Deiml et al zeigen, dass Alpha Thujon eine signifikant inhibierende Wirkung auf den 5 HT<sub>3</sub> Rezeptor hat. Danach wird dieser reduzierende Effekt durch einen Mechanismus erzielt, welcher zur Desensibilisierung des Rezeptors für seinen natürlichen Liganden Serotonin führt [34].

#### **4.2.2.2 Modulation des $\gamma$ - Aminobuttersäure Typ A (GABA A) Rezeptors**

GABA A-Rezeptoren sind ligandenaktivierte Ionenkanäle, welche für Chlorid- und Bikarbonationen durchlässig sind. Es handelt sich um Heteropentamere, das heißt sie sind aus fünf verschiedenen Untereinheiten aufgebaut (Penta = fünf; hetero = verschieden). Jede Untereinheit durchspannt die Zellmembran viermal. Es gibt sieben Klassen homologer Untereinheiten. Die drei wichtigsten sind:

- $\alpha$  (mit 6 Vertretern;  $\alpha$ 1- $\alpha$ 6)
- $\beta$  (mit 4 Vertretern;  $\beta$ 1- $\beta$ 4)
- $\gamma$  (mit 4 Vertretern;  $\gamma$ 1- $\gamma$ 4)

Die meisten GABA A- Rezeptoren im Gehirn sind aus 2 $\alpha$ -, 2 $\beta$ - und 1 $\gamma$ -Untereinheiten aufgebaut. Neben der Bindestelle für Gamma- Aminobuttersäure besitzt der funktionsfähige GABA-A Rezeptor noch weitere Bindestellen für Benzodiazepine an der  $\gamma$ - Untereinheit und für Barbiturate und Neurosteroiden an der  $\beta$ -Untereinheit [63].

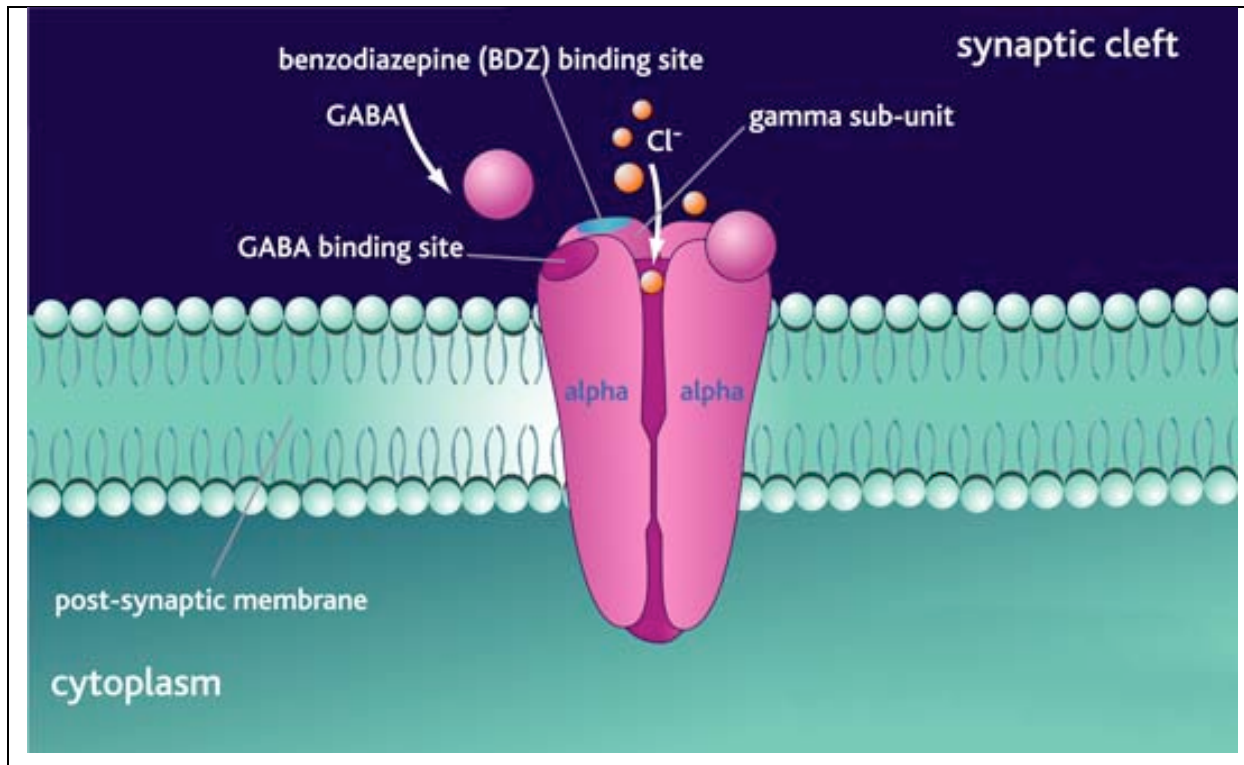


Abb. 27 schematische Darstellung des GABA A Rezeptors [63]

Der GABA-A Rezeptor ist sehr weit im Gehirn und Rückenmark verbreitet und der wichtigste inhibitorische Rezeptor im zentralen Nervensystem. 30% der Transmittermenge im ZNS entfallen auf GABA. Besondere Funktion hat er in den Basalganglien und dem Kleinhirn, wo er an der motorischen Kontrolle beteiligt ist. Peripher lassen sich GABA A Rezeptoren u. a. im myenterischen und submukösen Plexus des gastrointestinalen Trakts finden [41, 118].

In mehreren Studien konnte bewiesen werden, dass  $\alpha$  Thujon einen inhibierenden Effekt auf den GABA A Rezeptor hat [51, 56, 95]. Es ist ein nicht kompetitiver Antagonist des GABA gesteuerten Chlorid Kanals und es zeigt sich in elektrophysiologischen Studien das dieser Effekt reversibel ist.

#### 4.2.2.3 Interaktion mit dem Cannabinoid Rezeptor

1988 erbrachten Devane et al. den ersten Beweis für die Existenz eines spezifischen Cannabinoidrezeptors [36]. Bis heute wurden zwei Rezeptortypen (CB1 und CB2) sowie eine Variante von CB1 (CB1a) identifiziert. Sie zählen zur Gruppe der G-Protein gekoppelten Rezeptoren.

Die G-Protein gekoppelten Rezeptoren gehören zu den membrangebundenen Rezeptoren. Sie sind aus sieben helikalen hydrophoben Bereichen aufgebaut, welche die Zellmembran durchdringen und durch hydrophile Extra- und Intrazellulärschleifen verbunden sind. Die Signalübertragung bei diesen Rezeptoren erfolgt über ein Kopplungsprotein, das G- Protein (Guanin- Nukleotide- bindendes Protein), welches über einen Wechselwirkungsmechanismus Ionenkanäle öffnen bzw. schließen kann.

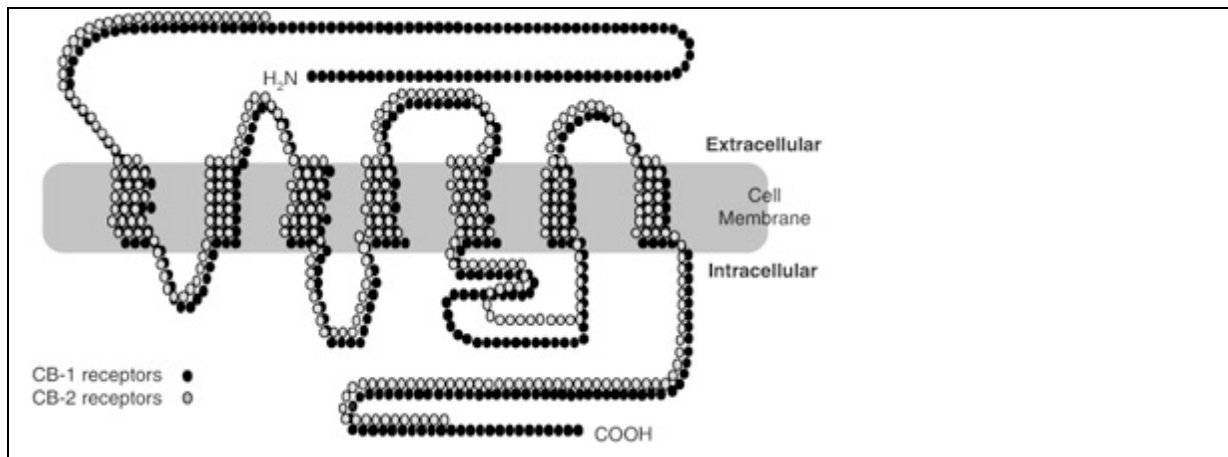


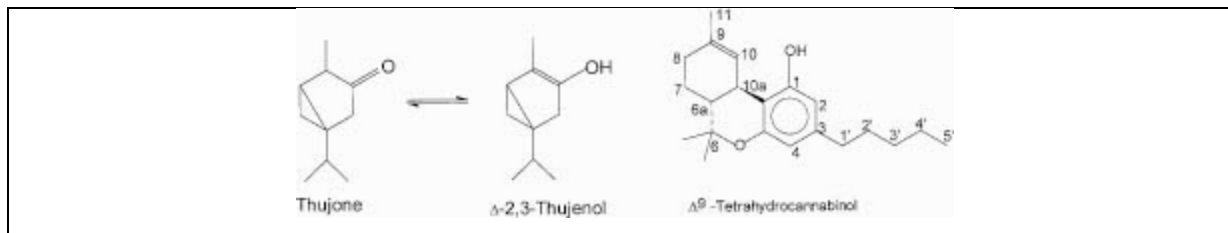
Abb. 28 molekularer Aufbau des CB 1- bzw. CB 2 Rezeptor im Vergleich [59]

Der CB1 Rezeptor findet sich v.a. im zentralen Nervensystem (Hippocampus, Basalganglien, Kleinhirn, Rückenmark)[54, 55, 81], aber auch peripher beim Menschen im Hoden[46], auf Spermazellen[105], auf Endothelzellen[113], sowie im menschlichen Ileum[31]. Die präsynaptisch lokalisierten CB1-Rezeptoren regulieren die Acetylcholinabgabe in den myenterischen Neuronen. Eine Aktivierung der Rezeptoren führt zur Hemmung der langsamen nicht adrenergen, nicht cholinergen (NANC) und schnellen cholinergen exzitatorischen Transmissionen im Ileum. Diese Hemmung von cholinergen und nicht- adrenergen, nicht- cholinergen Übertragungswegen im enterischen Nervensystem hat eine verminderte Kontraktionsfähigkeit des

Gastrointestinaltrakts zur Folge und es kommt zur verminderten Ausscheidung und Verlängerung der Passagezeit [24, 31, 58, 97].

Der CB 2 Rezeptor lässt sich v.a. auf Zellen des Immunsystems finden, wobei die höchsten Konzentrationen auf B Zellen und T Killerzellen gefunden wurden [45].

1975 beschrieben Del Castillo et al eine strukturelle Ähnlichkeit zwischen Thujon und  $\Delta^9$  Tetrahydrocannabinol, dem aktiven Wirkstoff des Marihuana (Abb. 29) und folgerten aus diesem Zusammenhang eine Interaktion beider Substanzen am selben Rezeptortyp [35].



**Abb. 29 Die Strukturformeln von Thujon, Thujenol( tautomere Form im Gleichgewicht mit Thujon) und Tetrahydrocannabinol**

Meschler et al konnten 1999 zeigen, dass Thujon den Cannabinoid Agonisten [3H]CP55940 ab einer Konzentration  $\geq 10 \mu\text{M}$  vom Rezeptor verdrängt, jedoch auch in sehr hohen Konzentrationen (0,1 mM) zu keiner Stimulation von G Proteinen führt [87]. Hiermit konnte eine Affinität zum selben Rezeptortyp bewiesen werden, ohne jedoch ein Korrelat für dessen Wirkungsweise zu finden.

#### **4.2.3 Medizinische Bedeutung von Thuja occidentalis und Artemisia absinthium**

Thuja occidentalis, auch bekannt als Lebensbaum oder weiße Zeder, ist in Nordamerika beheimatet und wurde schon früh als Zierpflanze nach Europa importiert [26]. Die Pflanze wurde erstmals während einer Expedition in Kanada im 16. Jahrhundert als Heilmittel der Indianer entdeckt. Sie wurde dort zur Behandlung von Schwäche und



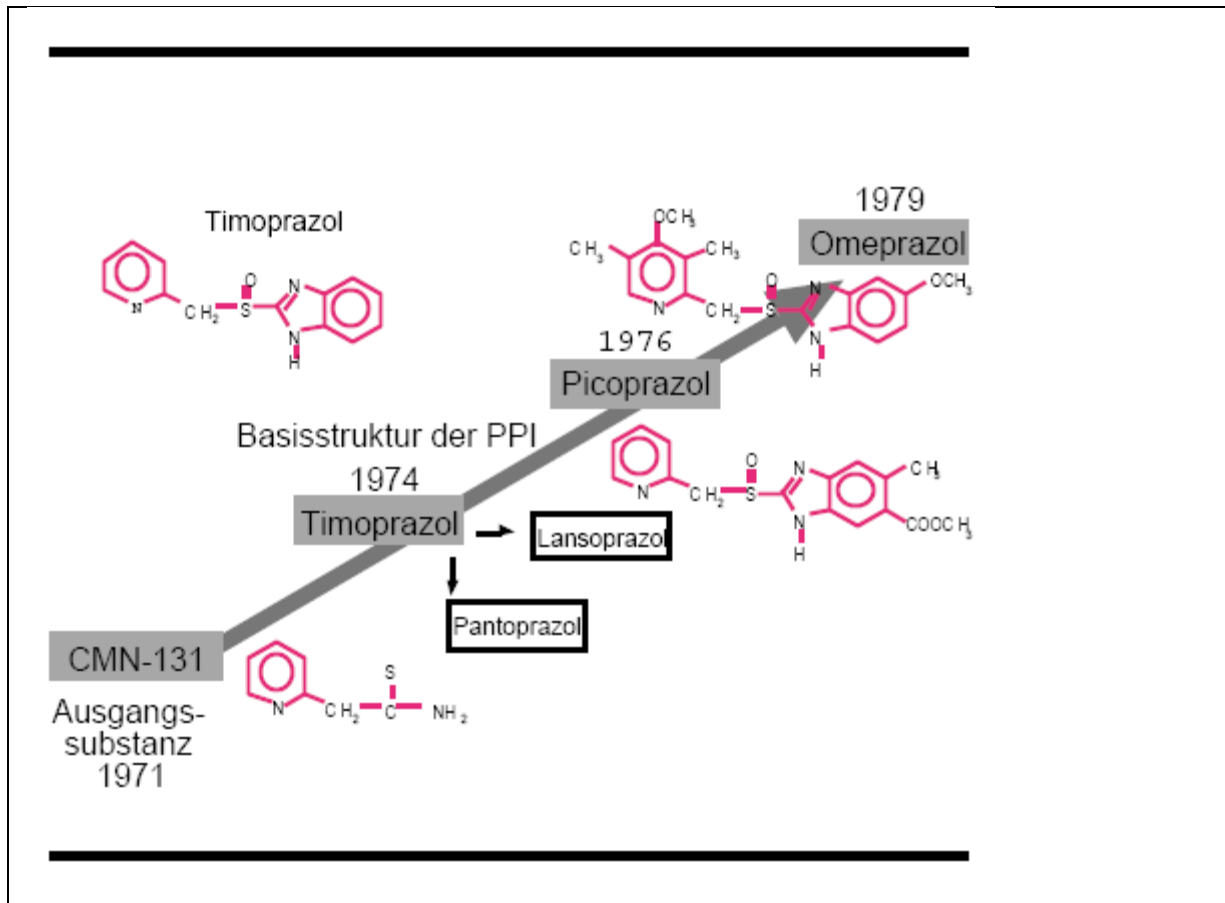
Skorbut eingesetzt [89]. In der Volksmedizin kam Thuja occidentalis zur Behandlung von Bronchitis, Enuresis, Zystitis, Psoriasis u.a. zum Einsatz [1, 10, 94].

Heute wird sie hauptsächlich in der Homöopathie als Muttertinktur oder Dilution benutzt [2, 4]. In Kombination mit anderen immunmodulierenden Pflanzen, wie Echinacea pupurea, Echinacea pallida und Baptisia tinctoria kommt sie als Phytotherapeutikum für akute und chronische Infekte des oberen Respiratorischen Trakts zur Anwendung [123]. Auch Wermut ist reich an Thujon. Das erste Mal wurde Artemisia absinthium, der Wermut vor 3000 Jahren erwähnt. Extrakte der Wermutpflanze spielten schon dort für die Behandlung von gastrointestinalen Wurmerkrankungen eine wichtige Rolle [8]. Seit dem 15. und 16. Jahrhundert findet Wermut eine breite Anwendung bei Magen- und Darmbeschwerden und bei allen Problemen der Verdauung [108]. Weitere Namen des Artemisia absinthium spiegeln dessen Wirkung als Heilpflanze deutlich wider: Heilbitter, Magenkraut, Wurmkraut.

## **4.3 Omeprazol**

### **4.3.1 Physiko- chemische Eigenschaften**

Omeprazol gehört zu der Gruppe der Protonenpumpeninhibitoren und ihre Wirkung auf die Sekretion der Säure im Magen wurde erstmals 1979 beschrieben[65]. Anfang der siebziger Jahre synthetisierte man chemische Verbindungen mit Säuresekreteionshemmenden Eigenschaften. Über Timoprazol, Picoprazol gelangte man schließlich durch weitere chemische Veränderungen und Optimierung des Grundmoleküls 1979 zum Omeprazol (Abb. 30).



**Abb. 30** Entwicklung der Protonenpumpeninhibitoren

Der chemische Name von Omeprazol lautet:

5 - m e t h o x y - 2 - [ [ ( 4 - m e t h o x y - 3 , 5 - d i m e t h y l - 2 - p y r i d i n y l ) - m e t h y l ] s u l p h i n y l ] - 1 H - B e n z i m i d a z o l . Das Molekulargewicht beträgt 345,42 Dalton. Das Omeprazolmolekül besteht aus drei Anteilen, die alle für die pharmakologische Funktion von Bedeutung sind [21]. Eine Sulphoxid- Kette ist das Bindeglied zwischen einem substituierten Pyridinring und einem substituierten Benzimidazolring. Als lipophile Substanz ist Omeprazol in der Lage, schnell Membranen zu passieren. Die Löslichkeit in Wasser ist gering.

Durch den Pyridinring ist Omeprazol eine schwache Base ( $pK_a = 4$ ) und hat daher eine Affinität zu säurehaltigen Kompartimenten, wie man sie in der Parietalzelle findet. Die Stabilität einer Omeprazolösung ist in starkem Maße pH- abhängig. Die Zersetzungshalbwertszeit beträgt ungefähr 10 Monate bei pH 11, 17 Stunden bei pH 7,4, aber nur 2 Minuten bei pH 2. In der säurehaltigen Umgebung der Parietalzelle, nahe dem Zielenzym, der  $H^+/K^+$ -ATPase, erfolgt die Aktivierung des Omeprazolmoleküls in die

eigentlich wirksame Substanz. Durch eine säurekatalysierte Zyklisierung wird aus dem Omeprazol, das als Vorstufe dient (Prodrug), das Omeprazol- Sulfenamid.

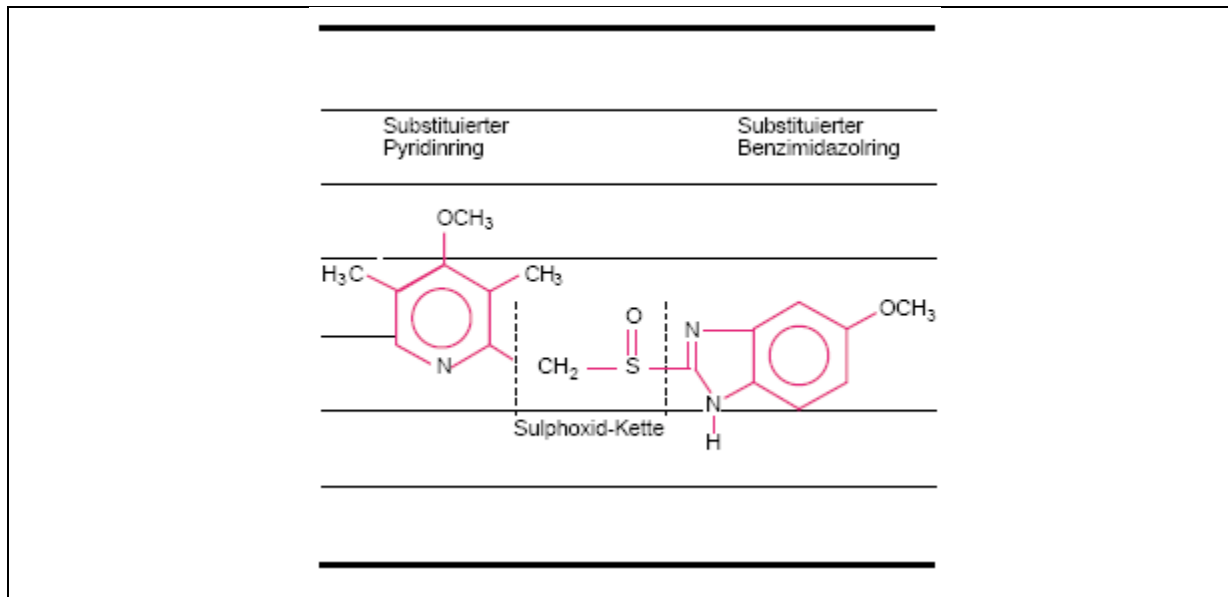


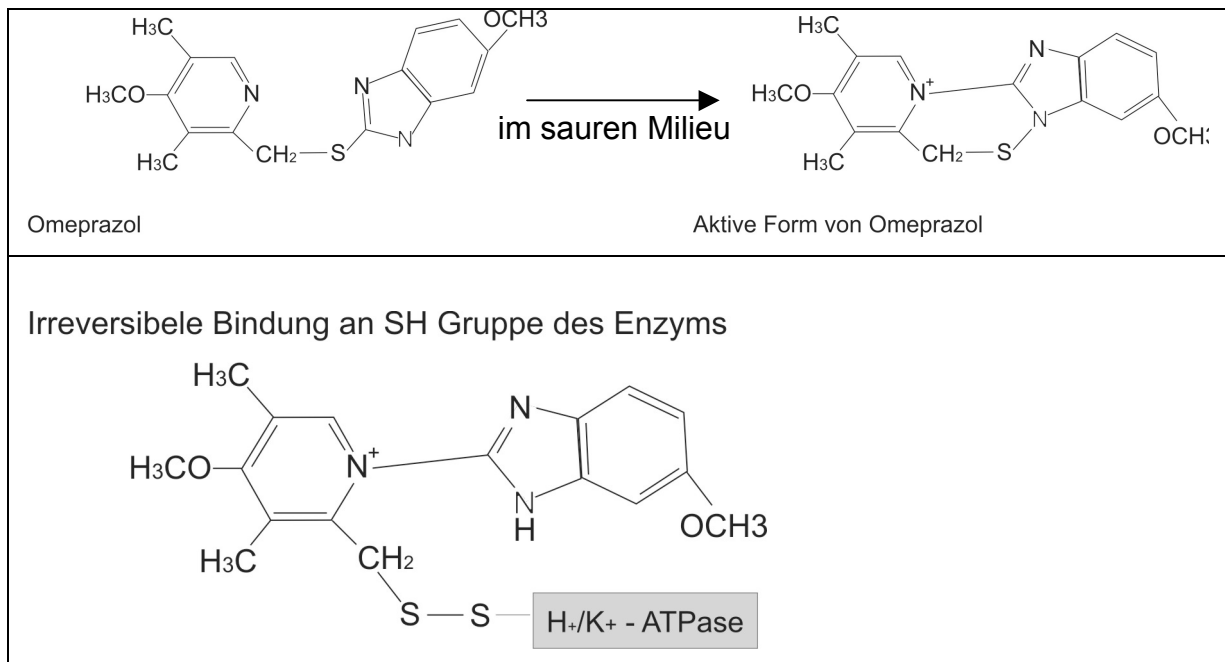
Abb. 31 Strukturformel von Omeprazol

Neben Omeprazol gehören u.a. auch noch dessen S Enantiomer Esomeprazol, Pantoprazol sowie Lansoprazol zur Gruppe der Protonenpumpeninhibitoren. Eingeführt und als Medikament in Deutschland zugelassen wurde die Substanz im Jahre 1989.

#### 4.3.2 Wirkungsweise des Protonenpumpeninhibitors Omeprazol

Protonenpumpenhemmer werden im Dünndarm resorbiert und gelangen über den Blutkreislauf in die sekretorischen Kanäle der Belegzellen des Magens.

Um eine vorherige Umsetzung im sauren Milieu des Magens zu vermeiden, ist der Wirkstoff entweder mit einem säurefesten Überzug versehen oder er wird in säurefesten Kapseln verabreicht. Bei allen Substanzen handelt es sich um Prodrugs, die erst am Ort der Wirkung im sauren Milieu in die aktive Form umgewandelt werden, welche an die H<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPase bindet und diese irreversibel in ihrer Funktion als Protonenpumpe blockiert (Abb. 32).



**Abb. 32 Strukturformel und Wirkungsweise von Omeprazol. Nach Umlagerung in seine aktiven Wirkform bindet das Schwefel Atom über eine SH Gruppe mit der H<sup>+</sup>/K<sup>+</sup> - ATP ase und führt diese in eine inaktive Form über [79]**

Die Blockierung ist dosisabhängig und wirkt sowohl auf die basale als auch auf die stimulierte Magensäuresekretion. Die Verminderung der Säureproduktion im Magen und der resultierende Anstieg des pH Werts des Magensaftes führt zu einer Abmilderung der Aggressivität des Magensaftes und somit zu einer beschleunigten Heilung von Magenwandverletzungen (wie z.B. Schleimhauterosionen oder Ulzera) [84].

Protonenpumpenhemmer wirken trotz ihrer kurzen Plasmahalbwertszeit von nur 0,5 bis 1,5 Stunden dennoch ca. 1-3 Tage lang, denn erst nach dieser Zeit hat sich die H<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPase durch Neubildung wieder regeneriert.

Protonenpumpenhemmer werden vollständig durch das Cytochrom P 450 -System (CYP) metabolisiert. Dabei erfolgt der überwiegende Teil der Verstoffwechslung durch das polymorphe CYP2C19, ein geringer Teil wird durch CYP3A4 verstoffwechselt [79].

#### 4.3.3 Klinische Relevanz

Omeprazol und andere Substanzen aus der Gruppe der Protonenpumpeninhibitoren werden hauptsächlich bei der Behandlung von Krankheiten angewendet die entweder mit einer Überproduktion an Magensäure in Zusammenhang stehen oder mit einer verminderten protektiven Funktion der Magen- Darmschleimhaut assoziiert sind. Dabei haben Protonenpumpenhemmer andere Wirkstoffe wie Antazida oder H<sub>2</sub> Antagonisten in ihrer Bedeutung zurückgedrängt [79].

Dementsprechend sind Omeprazol und seine Analogsubstanzen aus der Familie der Protonenpumpenhemmer als Mittel der ersten Wahl bei der Behandlung aller hyperaziden Magen- Darmerkrankungen (u. a. Zollinger- Ellison- Syndroms, hyperazide Gastritis, Magen- und Duodenalulzera, GERD Syndrom).

Eine noch breitere Anwendung finden Omeprazol und seine Analogsubstanzen seit der Entdeckung (1984) des gramnegativen Bakteriums *Helicobacter pylori* der Magenschleimhaut [85]. Dies für eine Reihe von Magenerkrankungen verantwortliche Bakterium (u. a. ca. 75 % der Magenulzera und praktisch alle Duodenalulzera) [3] wird durch eine Eradikationstherapie mit folgendem Schema therapiert: Protonenpumpeninhibitor kombiniert mit Clarithromycin und Metronidazol („italian“ tripel) oder Amoxicillin („french“ tripel) [25].

Beispiele für die Anwendung bei reduzierter Schleimhautprotektion sind u.a. Nicht steroidale Antirheumatika und Acetylsalicylsäure induzierte Prostaglandinreduktion mit folgender Magenschleimhautschädigung.

Neben den klassischen Behandlungsfeldern kommen die Hemmstoffe der Protonenpumpeninhibitoren (PPI) auch bei nicht- Säure- assoziierten Erkrankungen zur Anwendung. Wie mehrere klinische Studie zeigten, profitieren Patienten mit nicht Säure assoziierter, funktioneller Dyspepsie von der Einnahme des Medikaments Omeprazol bzw. Lansoprazol [18, 83, 111, 115, 121]. Trotzdem bleibt diese Art der Anwendung weiterhin kontrovers diskutiert, da die Rolle, die Effizienz, sowie der Wirkmechanismus der PPI bei dieser Therapieform nicht eindeutig geklärt sind [39, 74, 86, 114, 127].

## **5 Spezielle Diskussion**

### **5.1 Die Thujone**

#### **5.1.1 Direkter Einfluss auf die glatte Muskelzelle**

Die Basalaktivität der präparierten Muskelstreifen unter Versuchsbedingungen zeigte ein typisches wellenförmiges Muster, bei dem sich Kontraktion und Relaxation abwechselten (für Details siehe Ergebnisteil, ab Seite 16). In den hier beschriebenen Versuchen wurde der Einfluss der Thujone ( $\alpha$  Thujon,  $\beta$  Thujon und Mischthujon) auf den basalen Muskeltonus untersucht.

Wie im Abschnitt 4.2.2.3 erläutert interagieren die Thujone mit verschiedenen Rezeptortypen. Bezüglich des Dünndarms liegen in der Literatur folgende Kenntnisse vor:

- CB1 Rezeptoren: Die Existenz von CB1-Rezeptoren konnte mit Hilfe radioaktiv markierter Liganden und immunhistochemischen Untersuchungen im enterischen Nervensystem des Verdauungstrakts von z.B. Meerschweinchen [101] und Schweinen [69] nachgewiesen werden. Ein Nachweis für die Existenz von CB1-Rezeptoren direkt auf den glatten Muskelzellen des Magen-Darm-Trakts wurde bisher noch nicht erbracht.

- 5 HT3 Rezeptoren: Johnson et al konnten 1995 die Existenz von 5 HT3 Rezeptoren im enterischen Nervensystem des Verdauungstrakts von Ratten nachweisen. 5 HT3 Rezeptoren finden sich demnach in Ganglien des submukösen, wie myenterischen Plexus [61]. Zudem konnte in der Folge gezeigt werden, dass Serotonin beim Meerschweinchen über 5 HT3 Rezeptoren stimulierend in der Weiterleitung von absteigenden Interneuronen auf die exzitatorischen Motoneuronen wirkt [78, 90]. Ein Beweis für die Existenz von 5 HT3 Rezeptoren direkt auf den glatten Muskelzellen des Dünndarms wurde bisher nicht erbracht.

- GABA A Rezeptoren: Der myenterische Plexus des Magen- Darm- Traktes des Meerschweinchens enthält GABA A Rezeptoren, welche mit Chlorid- Ionenkanälen verbunden sind. Diese sind pharmakologisch gleich denen im zentralen Nervensystem [41]. Bezüglich der Verteilung von GABA Rezeptoren zeigen verschiedene Studien größere Unterschiede zwischen den Spezies. So wurde der Transmitter GABA im Meerschwein v. a. im myenterischen Plexus nachgewiesen, im Hausschwein dahingegen v. a. im submukösen Plexus [118]. Weiterhin zeigen sich größere Verteilungsunterschiede von GABA Rezeptoren entlang des Verdauungstrakts vom Duodenum bis zum Colon mit höchster Dichte im Ileum [118]. Alle bisherigen Studien zeigen, dass GABA innerhalb der neuronalen Strukturen des Gastrointestinaltrakts wirkt [52] und des weiteren wahrscheinlich keinen postsynaptischen Effekt hat [19].

Damit ist zusammenfassend festzustellen, dass keiner der Rezeptoren, mit denen Thujone interagieren, direkt auf der Muskelzelle zu finden ist.

Dies passt sehr gut zu unseren Ergebnissen, bei denen die eingesetzten Thujone (0,1  $\mu\text{M}$  – 100  $\mu\text{M}$ ) keinen Einfluss auf die Spontanaktivität, den Basaltonus, die Kontraktionsfrequenz bzw. -amplitude der in vitro präparierten Muskelstreifen hatten.

### **5.1.2 Wirkung auf die pharmakologisch vorstimulierte Muskulatur**

Carbachol kann alle Zellen, die muskarinerge Rezeptoren besitzen, beeinflussen.

Die Substanz zählt zu den direkten Parasympathikomimetika, d.h. Carbachol wirkt direkt am Muskarinrezeptor und wird nicht von der Acetylcholinesterase gespalten und abgebaut. Seine Wirkung im Gastrointestinaltrakt entfaltet es direkt an den glatten Muskelzellen und steigert auf diesem Wege den Tonus, die Peristaltik und die Sekretion im Magen-Darm-Trakt.

Gibt man Carbachol in das Organbad, bewirkt es eine deutliche Kontraktion der glatten Muskelzellen, die nach 2-3 Minuten (Carbachol 1  $\mu\text{M}$ ) in ein Plateau übergeht. Dieses Plateau bleibt bei Carbachol ca. 15 Minuten stabil (für Details siehe Ergebnisteil). In der

vorliegenden Arbeit wurde der Effekt der unterschiedlichen Thujone auf das induzierte Plateau untersucht.

Wie im Ergebnisteil ausführlich dargestellt, kommt es nach Gabe von allen in der vorliegenden Arbeit verwendeten Thujone zu einer signifikanten Reduktion des durch Carbachol induzierten Plateaus (3.1.2).

Diese Beobachtung würde eine direkte Beeinflussung der Thujone auf die glatte Muskelzelle im aktiven Zustand Rückschließen lassen.

Wie kann sich dieser Effekt erklären lassen?

1. Eine Beeinflussung über die unter Punkt 5.1.1 und 4.1.3.2 diskutierten Rezeptoren ist nicht direkt auf die glatte Muskelzelle möglich. Ein weiterer Rezeptor kann aber in der Interaktion der Thujone zur glatten Muskulatur des Magen- Darm- Trakts nicht ausgeschlossen werden.

2. Eine andere Erklärungsmöglichkeit wäre die Beeinflussung des zur Lösung von Thujonen benötigten Ethanol (2.5). Ethanol kann das Kontraktionsvermögen der glatten Muskulatur hemmen. Zudem ist bekannt, dass Ethanol die durch Carbachol induzierte Kontraktion der glatten Muskelzelle reduziert und somit zu dieser Abschwächung des Plateaus führen kann [40, 41, 64]. Ethanol, in der von uns verwendeten niedrigen Konzentration zeigte diese Wirkung jedoch nicht.

3. Bicuculline und  $\alpha$  Thujon haben beide inhibitorische Funktion am GABA A Rezeptor (4.2.2.3). Interessanterweise zeigte der GABA A Antagonist Bicuculline eine ähnlich starke Reduktion des durch Carbachol induzierten Plateaus. Bei dem inhibitorischen Effekt von Bicuculline auf das Plateau kann jedoch nicht von einer Beeinflussung durch ein Lösungsmittel ausgegangen werden, da Bicuculline, wie im Methodikteil dargestellt, in destilliertem Wasser gelöst wurde.

Die Rolle des GABA A Antagonisten im Bezug auf die Kontraktilität des Dünndarms wird in der Literatur kontrovers diskutiert. Eine durch GABA und GABA A Agonisten



ausgelöste direkte Kontraktion im Rattenileum, kann durch Bicuculline vollständig antagonisiert werden [66].

Ong et al zeigten das Bicuculline die Spontanaktivität longitudinaler Muskelstreifen des Meerschweinchen Ileums deutlich herabsetzt [96]. Zusätzlich wird ein noch unklarer Wirkmechanismus von Bicuculline auf die Motilität des Meerschweinchenileums beschrieben, welcher unabhängig vom GABA A Rezeptor zu scheinen ist [11, 119].

Da der genaue Wirkmechanismus dieses GABA A Rezeptorantagonisten im Ileum also nicht genau bekannt ist, bleibt festzustellen, dass Bicuculline und Thujone den gleichen Effekt auf die durch Carbachol stimulierte glatte Muskelzelle haben, deren Mechanismus ebenfalls unabhängig von GABA A Rezeptoren sein könnte. Effekte dieser beiden Substanzen auf Ionenkanäle wären eine denkbare Erklärung, bisher wurde aber noch keine spezifische Beeinflussung eines Ionenkanals gezeigt.

### **5.1.3 Einfluss auf die elektrisch induzierte, cholinerge Kontraktion**

Die elektrische Feldstimulation (40 V, 1ms Pulsdauer, 2 Hz, 4 Hz, 8 Hz, 16 Hz Stimulationsfrequenz) der glatten Muskelzellen des Rattenileums im Nativzustand – ohne Vorstimulation und pharmakologische Blocker – bewirkt eine unter Punkt 3.1.3 ausführlich beschriebene, charakteristische Kontraktion. Im Folgenden wird die Wirkung des Thujons auf die erste und damit cholinerg vermittelte Kontraktion diskutiert.

Durch die Zugabe der Substanz  $\alpha$  Thujon (0,1 – 100  $\mu$ M) konnte die cholinerg vermittelte Kontraktionsantwort konzentrationsabhängig signifikant reduziert werden. Um eine Beeinflussung dieses Effektes durch verwendete Lösungsmittel auszuschließen, wurde eine Lösungsmittelkontrolle durchgeführt bei der ähnliche Reduktionen der Kontraktion nicht beobachtet werden konnten. Die durch  $\alpha$  Thujon hervorgerufene konzentrationsabhängige Reduktion der cholinerg vermittelten Kontraktion konnte durch den CB1 Rezeptorantagonisten SR 141716A vollständig antagonisiert werden.

Ähnlich Effekte ließen sich bei der Substanz Mischthujon in reduzierter Form ebenfalls finden. Die Substanz  $\alpha$   $\beta$  Thujon zeigte keinen signifikanten Einfluss auf die elektrisch induzierte Kontraktion der Organstreifen.

Diese Beobachtungen lassen folgende Schlüsse zu:

1. Die Substanz  $\alpha$  Thujon zeigte sich in dieser Versuchsanordnung als aktivstes Reagens, der in dieser Arbeit analysierten Thujone. Die anderen Substanzen mit geringeren Anteilen an  $\alpha$  Thujon hatten einen weniger reduzierenden Einfluss auf die elektrisch induzierte Kontraktion. Dieses Verhalten unterstreicht die These, dass  $\alpha$  Thujon das aktivere Isomer im Verhältnis zu  $\beta$  Thujon ist [56, 92].
2. Der beobachtete reduzierende Effekt kann nicht auf eine Lösungsmittel induzierte Wirkung zurückgeführt werden, so dass eine Wirkung von  $\alpha$  Thujon auf die cholinerge, neuronal vermittelte Komponente der elektrisch induzierten Kontraktion bestätigt wird.
3. Der reduzierende Effekt auf die Kontraktionsantwort wurde durch SR 141716A, einem CB1 Rezeptorantagonisten, vollständig aufgehoben. Diese Feststellung lässt eine Wirkung der Substanz  $\alpha$  Thujon auf den CB1 Rezeptor vermuten.

Das enterische Nervensystem der unterschiedlichsten Spezies enthält Cannabinoidrezeptoren. So konnten z.B. durch spezifische Marker CB1-Rezeptoren auf den cholinergen Neuronen im Gastrointestinaltrakt von Schweinen nachgewiesen werden [69]. Mit Hilfe der PCR wurde CB1 mRNA im Magen und Kolon des Menschen gefunden [31, 107] und auch im menschlichen Ileum befinden sich CB1-Rezeptoren [31]. Durch das Verfahren der Polymerase- Kettenreaktion wurde der Nachweis von CB1 mRNA im myenterischen Plexus von Meerschweinchen und im Gastrointestinaltrakt von Rattenembryos erbracht. Über diese CB1-Rezeptoren beeinflussen die entsprechenden Cannabinoidagonisten die gastrointestinale Tätigkeit in vivo und in vitro.

Es ergaben elektrophysiologische Untersuchungen an myenterischen Neuronen [77], dass WIN 55,212-2 (CB 1 Agonist) und der synthetische CB1-Agonist CP 55,940 die schnellen, exzitatorischen Potenziale (Transmitter Acetylcholin) an den Synapsen verringern und WIN 55,212-2 zusätzlich auch negativ auf die langsamen erregenden Potenziale (Transmitter NO) wirkt. Der in jedem der oben beschriebenen Experimente eingesetzte CB1-Antagonist SR 141716A war in der Lage die Effekte der Cannabinoide zu blocken.

Pertwee et al. [97] beschrieben u.a. die Wirksamkeit von WIN 55,212-2, CP 55,940 (CB1 Agonist) und SR 141716A auf das Ileum beim Meerschweinchen. Bis auf den CB1-Antagonisten SR 141716A konnten die Cannabinoide die elektrisch induzierten Kontraktionen reduzieren. In einer zusätzlichen Versuchsreihe mit CP 55,940 wurde nachgewiesen, dass es die Acetylcholinausschüttung während der durch die EFS hervorgerufenen Kontraktionen herabsetzt.

Auch im menschlichen Ileum konnten präsynaptische CB1-Rezeptoren nachgewiesen werden. Bei deren Aktivierung durch WIN 55,212-2 war ebenfalls eine Hemmung der durch die elektrische Feldstimulation induzierten Kontraktionen zu verzeichnen. Durch SR 141716A wurde diesen Effekt antagonisiert.

Meschler et al zeigten 1999 mit der Hilfe von Radioliganden gesteuerten Rezeptor bindings assay, dass Thujon den CB1 Rezeptoragonisten CP 55,940 in Konzentrationen über 10  $\mu$ M von seinem CB1 Rezeptor verdrängen kann ( hier in Membranen des Rattenhirns) und bewies so eine Affinität von Thujon zum CB1 Rezeptoren. In der gleichen Arbeit wurde mit GTPgamma Binding assays herausgearbeitet, dass Thujone keinen stimulierenden Effekt auf die mit CB1 Rezeptoren gekoppelten Proteine hatten. Diese Feststellung steht im Kontrast zu den von uns gefunden Ergebnissen im Bereich des Gastrointestinaltrakts, bei denen  $\alpha$  Thujon neuronale CB1 Rezeptoren aktiviert. Dieser Effekt ist durch den spezifischen CB1 Rezeptorantagonisten reversibel.

#### **5.1.4 Wirkung auf die elektrisch induzierte Kontraktion unter nicht adrenergen, nicht cholinergen Bedingungen**

Die elektrische Feldstimulation (40 V, 1ms Pulsdauer, 2 Hz, 4 Hz, 8 Hz, 16 Hz Stimulationsfrequenz) der glatten Muskelzellen des Rattenileums unter Gabe von Atropin (1 $\mu$ M) und Guanethidin (1 $\mu$ M) (und damit nicht adrenerg, nicht cholinerg = NANC) bewirkt eine Inhibition der cholinerg vermittelten „on“ Kontraktion, ohne Einfluss auf die zweite Phase der Kontraktion, welche größtenteils peptiderg vermittelt ist (3.1.3). Die zweite, peptiderge Kontraktion wird unter NANC Bedingungen untersucht, da hierunter klarere pharmakologische Aussagen möglich sind.

Atropin stammt aus Nachtschattengewächsen wie der Tollkirsche oder dem Stechapfel. Es antagonisiert die muskarinerge Wirkung von Acetylcholin und zählt deshalb zu den Parasympathikolytika. Es bewirkt u. a. eine Spasmolyse im Mastdarm und hemmt die Peristaltik in Magen und Darm.

Guanethidin gehört zur Gruppe der Antisymphotonika und wurde primär zur antihypertensiven Therapie eingesetzt. Es lagert sich in protonierter Form an das Catecholamin- Transportsystem der axonalen Plasmamembran und der Speichervesikel adrenerger Neuronen an und vermindert die Speicherfähigkeit und damit die Wirksamkeit von Katecholaminen. Heute ist die medizinische Verwendung aufgrund weit reichender Nebenwirkungen weitgehend obsolet [37, 38, 102].

Die Gabe von  $\alpha$  Thujon inhibierte die durch elektrische Feldstimulation induzierte Kontraktion unter NANC Bedingungen konzentrationsabhängig. Mischthujon zeigte in hohen Konzentrationen eine signifikante Inhibition und  $\alpha$   $\beta$  Thujon hatte keinen signifikanten Einfluss.

Die Gabe von SR 141716A (CB1 Rezeptorantagonist) konnte diesen Effekt nicht antagonisieren.

Die durchgeführte Lösungsmittelkontrolle erbrachte in sehr hohen Konzentrationen ebenfalls eine inhibierende Wirkung auf die Kontraktionsantwort.

Dies legt nahe, dass zumindest ein Teil des reduzierenden Effektes von  $\alpha$  Thujon auf die verwendeten Lösungsmittel zurückzuführen ist.

Weiterhin scheint die beobachtete inhibierende Wirkung von  $\alpha$  Thujon auf die peptiderge Komponente unabhängig vom CB1 Rezeptor zu sein, da diese Antwort nicht durch SR 141716A antagonisiert werden konnte.

Dies steht im Einklang mit der Literatur, die, wie im Punkt 5.1.3 ausführlich diskutiert, eine Interaktion der CB1 Rezeptoren mit der hier durch NANC Bedingungen unterdrückten Acetylcholinausschüttung beschreibt. Eine Interaktion mit der durch Tachykinine vermittelten Kontraktion ist in der Literatur bisher nicht beschrieben. Auch eine mögliche Inhibition der Thujone über die GABA A Rezeptoren wurde in der vorliegenden Arbeit untersucht. Der GABA A Rezeptorantagonist (-)- Bicuculline hemmte signifikant die peptiderg vermittelte Kontraktionsantwort erst in Konzentrationen ab  $100\mu\text{M}$ . Daher scheint eine Interaktion der Thujone über GABA A Rezeptoren unwahrscheinlich.

### **5.1.5 Einfluss auf die elektrisch induzierte Relaxation**

Die nicht- adrenergen, nicht- cholinergen Nerven verlaufen v.a. im Plexus myentericus und submucosus und bilden dort einen Bestandteil des enterischen Nervensystems. Sie vermitteln den größten Anteil an inhibitorischen Signalen im Gastrointestinaltrakt, wie z.B. die Relaxation des unteren Ösophagussphinkters nach dem Schlucken [48], die für die Nahrungsaufnahme wichtige Magenentspannung [5] und die absteigende Inhibition des peristaltischen Reflexes [49]. Ihre wichtigsten Überträgerstoffe sind das vasoaktive intestinale Polypeptid (VIP), PACAP (Pituitary Adenylatcyclase activating Peptide), ATP und NO.

Bei der Untersuchung der nicht- adrenergen, nicht- cholinergen Übertragungswege nach dem unter (2.3.5) beschriebenen Schema konnten wir keinen signifikanten Einfluss der

Thujone auf die elektrisch induzierte Relaxation des präkontrahierten Rattenileums feststellen.

Wie unter Punkt 5.1.3 und in der Literatur [87] diskutiert scheinen Thujone eine Affinität zu CB1 Rezeptoren zu besitzen. Ein Einfluss von Cannabinoiden auf die Relaxation unter nicht adrenergen und nicht cholinergen Bedingungen (NANC) im Gastrointestinaltrakt wurde im Bereich des Magenfundus von Ratten, nicht aber im Ileum beschrieben [112]. Sowohl der synthetische Cannabinoid Rezeptoragonist Win 55,212-2, als auch der endogene Cannabinoidagonist Anandamide konnte die durch EFS induzierte Relaxation signifikant reduzieren. Der so erbrachte beweisende Einfluss von Cannabinoiden auf die Relaxation im Magenfundus der Ratte, konnte durch Thujone im Rattenileum nicht reproduziert werden.

## **5.2 Omeprazol**

### **5.2.1 Direkter Einfluss auf die glatte Muskelzelle**

In unseren Versuchen wurde die Wirkung des Protonenpumpeninhibitors Omeprazol auf den basalen Muskeltonus, die Spontanaktivität in Form von Frequenzmessungen und Amplitudenänderungen untersucht.

Omeprazol hatte in unserer Versuchsanordnung keinen direkten Einfluss auf den Muskeltonus des Rattenileums. Die Veränderung der Kontraktionsfrequenz der präparierten Muskelstreifen war nicht Konzentrationsabhängig zur Omeprazolgabe, so dass dieser Effekt wahrscheinlich nicht durch eine spezifische Wirkung an einem Rezeptor, sondern vielmehr durch eine multifaktorielle Wirkung zu erklären ist. Passend dazu fanden sich bezüglich der Amplitudenänderung in der Mehrzahl der Omeprazolapplikationen signifikante reduzierende Effekte, die jedoch ebenfalls keinen konzentrationsabhängigen Charakter hatten und aus diesem Grund ebenfalls nicht auf eine Wirkung an einem einzelnen Rezeptor zurückzuführen sind. Einflüsse auf die Spontanaktivität und den Basaltonus sind im Gastrointestinaltrakt multifaktoriell.

Veränderungen können über multiple Rezeptoren, wahrscheinlich über multiple Ionenkanäle und/oder durch Membran bedingte Effekte (Stabilisierung und Destabilisierung) vermittelt werden. Daraus folgend kann die Wirkung einer Substanz unterschiedlich, je nach Zustand ausfallen.

Die in unsere Arbeit gefundenen Ergebnisse sprechen für physiologisch erklärbare Phänomene wie z. B. die der unterschiedlichen Kontraktionsphasen des peristaltischen Reflexes. Der durch Vorspannung der präparierten Muskelstreifen im Organbad getriggerte peristaltische Reflex ist charakterisiert durch ein typisches Kontraktionsmuster, welches sich durch intraluminale Dehnungen [60, 72, 106], Temperaturänderung [14] aber auch durch unterschiedliche intrinsisch- neurale oder myogene Aktivitätsgrade verändert. Hier können die Phasen der kontraktiven Stille, der irregulären und regulären Kontraktilität des Dünndarms unterschieden werden [71]. Die damit einhergehenden Veränderungen der Kontraktionsfrequenz und Amplitude im zeitlichen Verlauf eines Versuches (in unserem Modell ca. 100 min) können somit unabhängig vom Einfluss einer Substanz sein, solange dieser sich nicht konzentrationsabhängig gestaltet. Dies steht im Einklang mit dem in der Literatur beschriebenen Migrating Motor Komplex des Gastrointestinaltrakts (ca. 90-110 min) [117].

Eine direkte Beeinflussung der glatten Muskelzelle des Gastrointestinaltrakts konnte bisher noch nicht gefunden werden und auch unsere Ergebnisse sprechen gegen einen direkten muskulären Wirkmechanismus.

### **5.2.2 Einfluss auf die pharmakologisch vorstimulierte Muskulatur**

Gibt man Carbachol in das Organbad, bewirkt es eine deutliche Kontraktion der glatten Muskelzellen, die nach 1–2 Minuten (Carbachol 1  $\mu$ M) in ein Plateau übergeht. Dieses bleibt ca. 15 Minuten stabil (vgl. Ergebnisteil).

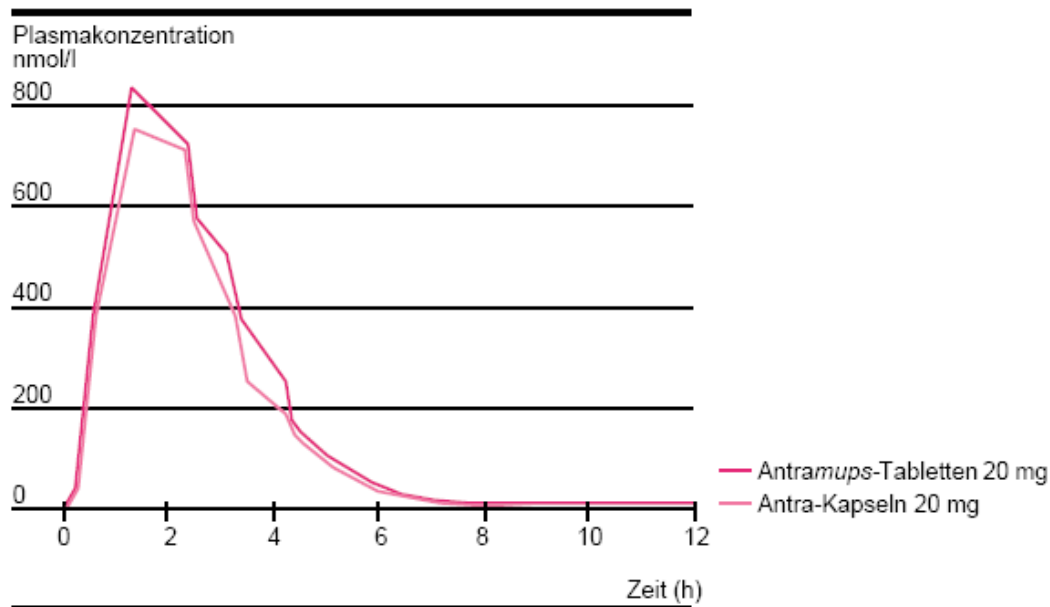
In den Konzentrationen 0,1 – 100  $\mu\text{M}$  hatte der Protonenpumpeninhibitor Omeprazol in hohen Konzentrationen eine signifikant reduzierende Wirkung auf das durch Carbachol induzierte Plateau.

Einflüsse durch ein verwendetes Lösungsmittel können in dieser Versuchreihe ausgeschlossen werden, da Omeprazol, wie im Methodikteil beschrieben, in destilliertem Wasser gelöst worden ist.

Wie in der Literatur geschildert, gibt es Beobachtungen, dass Omeprazol die Motilität des Gastrointestinaltrakts herabsetzt. Rasmussen et al zeigten 1999, dass Omeprazol eine Verzögerung der Magenentleerung hervorruft [100]. Die daraufhin unternommenen Studien im Bezug auf die Dünndarmmotilität erbrachten z.B. bei Mäusen eine verzögerte Dünndarmpassage unter dem Einfluss von Omeprazol [30]. Ein genauer Wirkmechanismus von Omeprazol wurde bis zum jetzigen Zeitpunkt jedoch noch nicht charakterisiert, die Untersuchungen von Cowan et al lassen aber eine Modulation serotonerger Mechanismen durch Omeprazol als sehr wahrscheinlich erscheinen [30].

Wie oben beschrieben hemmt Omeprazol das durch Carbachol induzierte Plateau signifikant erst ab einer Konzentration von 100  $\mu\text{M}$ . Die durch orale Aufnahme einer 20 mg Tablette erreichte Plasmakonzentration liegt mit ca. 0,8  $\mu\text{mol/l}$  deutlich unter diesem inhibierendem Niveau (Abb. 33). Standardtherapieschemata, wie z. B. für die Ulkuskrankheit, sehen eine Tagesdosis von 20- 40 mg vor. Die so erreichte Plasmakonzentration würde nie in den inhibierenden Bereich von 100  $\mu\text{M}$  gelangen und dementsprechend keine systemisch inhibierende Wirkung auf den Dünndarm entfalten.





**Abb. 33 Vergleich der Plasmakonzentrationen anhand des Beispiels einer Antramups Tablette 20 mg und einer Antra Kapsel 20 mg [7]**

Wie schon in der allgemeinen Diskussion erläutert, wird Omeprazol nach protektiver Passage durch den Magen (z.B. durch säurefesten Überzug der Pellets) erst im Dünndarm resorbiert. Eine mögliche Erklärung, dass derart hohe Konzentrationen (100  $\mu\text{M}$ ) von Omeprazol erreicht werden könnten, wäre eine vor Resorption auf lokal begrenzte Areale des intraluminalen Dünndarms beschränkte Akkumulierung des Arzneistoffs. Eine wie in unseren Versuchen prompt aufgetretene Hemmung, könnte dann zur Verzögerung der Darmpassage führen. Entsprechende pharmakokinetische Daten, die diese These stützen würden, sind aktuell in der Literatur jedoch nicht zu finden.

### 5.2.3 Einfluss auf die elektrisch induzierte Kontraktion

Trotz intensiver Recherchen ließ sich in der Literatur kein Zusammenhang zwischen elektrischer Feldstimulation, der dadurch vermittelten Kontraktion und einem Einfluss des Protonenpumpeninhibitors Omeprazol finden.

Die in unserem Versuchsmodell durch elektrische Feldstimulation (40 V, 1ms Pulsdauer, 2 Hz, 4 Hz, 8 Hz, 16 Hz Stimulationsfrequenz) induzierte „on“ Kontraktion, die v. a. durch den Transmitter Acetylcholin vermittelt ist, wurde durch Gabe von Omeprazol (0,1 – 100  $\mu$ M) nicht signifikant beeinflusst.

Diese Ergebnisse zeigen, dass Omeprazol im Ileum der Ratte keinen Einfluss auf die neuronale Freisetzung des exzitatorischen Neurotransmitters Acetylcholin hat.

In gleicher Versuchsanordnung unter nicht- adrenergen, nicht- cholinergen Bedingungen (= NANC) wurde ,wie im Ergebnisteil ausführlich dargestellt, die cholinerge Komponente der induzierten Kontraktion antagonisiert und es wurde nun bei Zugabe von Omeprazol die Wirkung auf die peptiderg vermittelte Kontraktion untersucht. Hier zeigte sich ein signifikant reduzierender Effekt von Omeprazol in hohen Konzentrationen (100  $\mu$ M). Einflüsse durch verwendete Lösungsmittel können aufgrund der Löslichkeit in destilliertem Wasser ausgeschlossen werden.

Diese Ergebnisse weisen auf einen hemmenden Einfluss der Substanz Omeprazol auf die Freisetzung und/oder die Wirkungsweise an der Effektorzelle von peptiderg- exzitatorischen Neurotransmittern im Rattenileum hin.

Wie in mehreren Studien und in der vorliegenden Arbeit gezeigt, ist die durch EFS unter NANC induzierte Kontraktion v. a. durch Neuropeptide induziert [6, 122]. Tachykinine, wie z. B. die Substanz P sind Kotransmitter des Acetylcholins der exzitatorischen enterischen Motoneurone [57, 116]. Sie wirken über 3 verschiedene prä- und postsynaptische lokalisierte NK Rezeptoren (NK1, NK2, NK3) und es lassen sich zwischen den Spezies größere Unterschiede in der Rezeptorvermittlung finden. Maggi et al konnten an longitudinalen in vitro Muskelstreifen des Menschen zeigen, dass vor allem NK 2 Rezeptoren an der durch Tachykinine vermittelten Exzitation beteiligt sind [80]. Im Ileum der Maus sind maßgeblich NK1 Rezeptoren an der Wirkung der endogenen Tachykinine beteiligt. Diese sind direkt an der glatten Muskelzelle wie auch auf cholinergen Nerven lokalisiert [33]. Unsere Ergebnisse zeigten, dass die Exzitation unter NANC Bedingungen der longitudinale Muskelstreifen des terminalen Rattenileums signifikant von NK1 und NK3 Antagonisten inhibiert werden können. Der NK2 Antagonist hatte keinen signifikanten Effekt. ( siehe Ergebnisteil)

In Zusammenschau unserer Ergebnisse könnte Omeprazol in hohen Konzentrationen (wie sie im Rahmen der Dünndarmresorption vermutlich vorkommen) einen antagonisierenden Effekt auf die NK1 oder NK3 Rezeptoren und/oder auf die Freisetzung der Tachykinine haben.

Wie schon unter Punkt 5.2.2 ausführlich erläutert, sind der Art hohe systemische Plasmakonzentrationen nach Einnahme des Arzneistoffes Omeprazol im therapeutischen Spektrum nicht möglich. Es wäre eine lokale Akkumulierung der Substanz intraluminal des Dünndarms denkbar, welche einen lokal begrenzten Effekt auf die Exzitation des Ileums hätte. Dadurch wäre ebenfalls eine begrenzte Hemmung der Passage im Dünndarm möglich, so wie sie bereits für Mäuse in der Literatur beschrieben worden ist [30].

#### **5.2.4 Einfluss auf die elektrisch induzierte Relaxation**

Der Protonenpumpeninhibitor Omeprazol hatte in unserer Versuchsanordnung keinen signifikanten Einfluss auf die Relaxation der präkontrahierten Muskelstreifen des terminalen Rattenileums. Diese Ergebnisse lassen den Schluss zu, dass Omeprazol keinen Einfluss auf die Freisetzung oder den Wirkmechanismus der inhibierenden Neurotransmitter, wie z.B. das vasoaktive intestinale Polypeptid (VIP), PACAP (Pituitary Adenylatcyclase activating Peptide), ATP und NO am Rattenileum hat.

## 6 Zusammenfassung

Die vorliegende Arbeit untersucht die Wirkung von Thujonen und Omeprazol auf die Aktivität der glatten Muskelzellen im Ileum von Ratten. Zu den untersuchten Thujonen zählen  $\alpha$  Thujon,  $\alpha\beta$  Thujon und Mischthujon.

Untersucht wurde der Einfluss der genannten Substanzen auf

- den Basaltonus und die Ruheaktivität,
- die pharmakologisch (Carbachol) vorstimulierte Muskulatur,
- die durch elektrische Feldstimulation induzierten Kontraktionen unter Standard und nicht- adrenergen, nicht- cholinergen Bedingungen
- die elektrisch induzierte Relaxation unter nicht- adrenergen, nicht- cholinergen Bedingungen

Im Rahmen der Arbeit wurden die folgenden Ergebnisse erzielt:

### 1. Einfluss auf den Basaltonus und die Ruheaktivität

Die Thujone hatten keine Wirkung auf den Basaltonus und die Ruheaktivität. Auch bei dem Protonenpumpeninhibitor konnte keine Veränderung der beobachteten Parameter festgestellt werden, so dass für alle untersuchten Substanzen eine direkte Wirkung auf die unstimulierte, glatte Muskulatur ausgeschlossen werden kann.

### 2. Einfluss auf die pharmakologisch vorstimulierte Muskulatur

Thujone hatten einen konzentrationsabhängigen, inhibierenden Effekt auf den durch Carbachol vorkontrahierten Muskelstreifen. Die Ausprägung der Inhibition unter den Thujonen war dabei entsprechend dem  $\alpha$  Thujon Anteil wie folgt:  $\alpha$  Thujon >  $\alpha\beta$  Thujon > Mischthujon.

Omeprazol zeigte ebenfalls in hohen Konzentrationen einen reduzierenden Einfluss auf die durch Carbachol vorstimulierte Muskelzelle, so dass für die untersuchten

Substanzen eine Wirkung auf die pharmakologisch stimulierte glatte Muskulatur nachgewiesen werden konnte.

### 3. Einfluss auf die elektrisch induzierte Kontraktion

Durch die elektrische Stimulation (10 sek./min.; 40V; 1ms Pulsdauer, 2 Hz, 4 Hz, 8 Hz, 16 Hz) der einzelnen Organstreifen kommt es zu einem charakteristischen biphasischen Kontraktionsmuster. Das Kontraktionsmuster stellte sich wie folgt dar:

Erste Phase („on“ Kontraktion): steiler Kontraktionspeak, der während der Stimulation des Organstreifens auftritt und durch die Inkubation von Atropin (1  $\mu$ M) und Guanethidin (1  $\mu$ M) vollständig aufgehoben werden kann. Die erste Phase lässt sich dementsprechend als cholinerg vermittelt definieren.

Zwischenphase: Relaxation unterschiedlichen Ausmaßes zwischen erster Phase und zweiter Phase.

Zweite Phase („off“ Kontraktion): ca. 2-3 minütige Kontraktionsphase im Anschluss der elektrischen Feldstimulation, die auch in Anwesenheit von Atropin (1  $\mu$ M) und Guanethidin (1  $\mu$ M) sich stabil und unverändert ausbildete. Inhibiert werden konnte diese Phase durch den NK1 Rezeptorantagonisten GR 82334 (3  $\mu$ M, - 33 %), sowie durch den NK3 Rezeptorantagonisten SB 218795 (3  $\mu$ M, -19 %). Eine Kombination aus dem NK1 Rezeptorantagonisten (GR 82334, 1  $\mu$ M), dem NK2 Rezeptorantagonisten (MDL 29912, 1  $\mu$ M) und dem NK3 Rezeptorantagonisten (SB 218795, 1  $\mu$ M) konnte diese Kontraktionsphase bis zu 80 % inhibieren, so dass die off Kontraktion im Wesentlichen tachykinerg vermittelt ist.

Die cholinerge Kontraktionsantwort wurde durch  $\alpha$  Thujon und Mischthujon konzentrationsabhängig gehemmt. Im Vergleich zu  $\alpha$  Thujon war die Wirkung von Mischthujon niedriger potent. Der CB1 Antagonist SR 141716A konnte den beobachteten Effekt blockieren, so dass wir in der vorliegenden Arbeit den Nachweis erbringen, dass diese Wirkung durch einen Agonismus am CB1 Rezeptor vermittelt ist.  $\alpha\beta$  Thujon zeigten keinen signifikanten Effekt auf die cholinerg vermittelte Kontraktion. Der Protonenpumpeninhibitor Omeprazol konnte die cholinerg vermittelte Kontraktionsantwort ebenfalls nicht beeinflussen.

Die peptiderge Kontraktionsantwort wurde von  $\alpha$  Thujon ebenfalls konzentrationsabhängig reduziert. Diese Reduktion konnte vom CB1 Antagonisten SR 141716A nicht blockiert werden, so dass es sich hierbei um einen CB1 Rezeptor unabhängigen Mechanismus handelt.

Mischthujon und  $\alpha\beta$  Thujon hatten keinen signifikanten Einfluss auf die zweite Kontraktionsphase.

Omeprazol konnte in hohen Konzentrationen die durch EFS induzierte peptiderge Kontraktion in hohen Konzentrationen inhibieren.

### 3. Einfluss auf die elektrisch induzierte Relaxation unter nicht- adrenergen, nicht- cholinergen Bedingungen

Keine der in der vorliegenden Arbeit getesteten Substanzen hatte einen signifikanten Einfluss auf die elektrisch induzierte Relaxation.

Aus diesen Ergebnissen lässt sich folgern, dass Thujone einen Einfluss auf die Motilität und Kontraktilität des Dünndarms haben. Unter den in der Arbeit verwendeten Thujone zeigte sich  $\alpha$  Thujon als die Substanz mit der potentesten Wirkung.

Durch die inhibierende Wirkung von  $\alpha$  Thujon auf das Carbacholplateau können Rückschlüsse auf eine direkte Beeinflussung der glatten Muskelzelle gezogen werden. Zusätzlich hemmt  $\alpha$  Thujon konzentrationsabhängig die Ausschüttung des exzitatorischen Neurotransmitters Acetylcholin. Durch die Blockade des Effektes durch den CB1 Antagonisten SR 141716A kann von einer Beteiligung des präsynaptisch gelegenen CB1 Rezeptors ausgegangen werden. Damit bestätigt sich die Affinität von  $\alpha$  Thujon zu dem CB1 Rezeptor auch im Gastrointestinaltrakt. Weiterhin hemmt  $\alpha$  Thujon die Ausschüttung peptiderg- exzitatorischer Neurotransmitter. Dieser Effekt konnte durch den CB1 Antagonisten nicht blockiert werden, weswegen die Beteiligung weiterer Rezeptoren bei der Wirkung der Thujone auf die Neurotransmission im enterischen Nervensystem nicht ausgeschlossen ist.  $\alpha$  Thujon zeigte keinen Einfluss auf die Abgabe Inhibitorische Neurotransmitter( NO, VIP).

Es ist bekannt, dass Phytopharmaka zur Behandlung von Motilitätsstörungen des Gastrointestinalen Trakts beitragen. Aufgrund der hier charakterisierten pharmakologischen Eigenschaften konnte man zeigen, dass die pflanzlichen Thujone modulierenden Einflüsse auf die Motilität haben. Daher gilt es zu untersuchen, ob Thujone vorteilhafte Einflüsse auf Motilitätsstörungen beim Menschen entfalten.

Omeprazol wird neben Säure assoziierten Erkrankungen u.a. bei dyspetischen Beschwerden eingesetzt. Unsere Untersuchungen zeigen erstmals, dass Omeprazol in vitro Motilitätsphänomene beeinflussen kann. Da im Dünndarm keine Protonenpumpen lokalisiert sind, lässt sich dieser Effekt nicht auf eine Wirkung an den Protonenpumpen erklären. Aufgrund der klinischen Wirksamkeit bei Patienten mit dyspetischen Beschwerden und der hier gezeigten Daten, ist eine weitere Charakterisierung dieser Mechanismen dringlich, um das zusätzliche Potenzial dieser Substanz zu verstehen und möglicher Weise in einer gezielten Therapie münden zu lassen.

## 7 Literaturverzeichnis

1. *Thuja*, in *British Herbal Pharmacopoeia*. 1983, British Herbal Medicine Association: West Yorks, UK.
2. *Thuja Monograph*, in *Homöopathisches Arzneibuch*. 1985, Deutscher Apotheker Verlag: Stuttgart. p. 876-7.
3. *Helicobacter pylori in peptic ulcer disease*. NIH Consensus Statement Online 1994 Jan 7-9.
4. *Thuja Monograph*, in *Homöopathisches Arzneibuch*. 2003, Deutscher Apotheker Verlag: Stuttgart. p. 1-2.
5. Abrahamsson, H., *Non-adrenergic non-cholinergic nervous control of gastrointestinal motility patterns*. Arch Int Pharmacodyn Ther, 1986. **280**(2 Suppl): p. 50-61.
6. Allescher, H.D., S. Willis, V. Schusdziarra, and M. Classen, *Modulatory effect of insulin on rat small intestinal motility and peptide release in vitro*. Digestion, 1991. **48**(4): p. 192-201.
7. Anderberg, *Bioequivalence between omeprazole MUPS tablets and omeprazole capsules*. Gastroenterology, 1998. **114**.
8. Arnold, W.N., *Sci.Am.* 6. 1998. p. 112-117.
9. Balint, A., E. Feher, I. Kisfalvi, Jr., M. Mate, T. Zelles, E.S. Vizi, and G. Varga, *Functional and immunocytochemical evidence that galanin is a physiological regulator of human jejunal motility*. J Physiol Paris, 2001. **95**(1-6): p. 129-35.



10. Baran, D., [*Arbor vitae, a guarantee of health*]. Rev Med Chir Soc Med Nat Iasi, 1991. **95**(3-4): p. 347-9.
11. Bartolini, A., A. Giotti, S. Giuliani, P. Malmberg-Aiello, and R. Patacchini, *Bicuculline actions on isolated rat atria, mouse vas-deferens and guinea-pig ileum are unrelated to GABA A receptor blockade*. Gen Pharmacol, 1990. **21**(3): p. 277-84.
12. Bayer, S., A. Jellali, F. Crenner, D. Aunis, and F. Angel, *Functional evidence for a role of GABA receptors in modulating nerve activities of circular smooth muscle from rat colon in vitro*. Life Sci, 2003. **72**(13): p. 1481-93.
13. Belai, A. and G. Burnstock, *Pattern of distribution and co-localization of NOS and ATP in the myenteric plexus of human fetal stomach and intestine*. Neuroreport, 2000. **11**(1): p. 5-8.
14. Beleslin, D. and V. Varagic, *The effect of cooling and of 5-hydroxytryptamine on the peristaltic reflex of the isolated guinea-pig ileum*. Br J Pharmacol Chemother, 1958. **13**(3): p. 266-70.
15. Bian, X., P.P. Bertrand, and J.C. Bornstein, *Descending inhibitory reflexes involve P2X receptor-mediated transmission from interneurons to motor neurons in guinea-pig ileum*. J Physiol, 2000. **528**(Pt 3): p. 551-60.
16. Bitar, K.N., P.G. Bradford, J.W. Putney, Jr., and G.M. Makhoul, *Stoichiometry of contraction and Ca<sup>2+</sup> mobilization by inositol 1,4,5-trisphosphate in isolated gastric smooth muscle cells*. J Biol Chem, 1986. **261**(35): p. 16591-6.
17. Bitar, K.N., G.M. Burgess, J.W. Putney, Jr., and G.M. Makhoul, *Source of activator calcium in isolated guinea pig and human gastric muscle cells*. Am J Physiol, 1986. **250**(3 Pt 1): p. G280-6.

18. Bolling-Sternevald, E., K. Lauritsen, C. Aalykke, T. Havelund, T. Knudsen, P. Unge, P. Ekstrom, B. Jaup, A. Norrby, A. Stubberod, K. Melen, R. Carlsson, P. Jerndal, O. Junghard, and H. Glise, *Effect of profound acid suppression in functional dyspepsia: a double-blind, randomized, placebo-controlled trial*. Scand J Gastroenterol, 2002. **37**(12): p. 1395-402.
19. Bornstein, J.C., M. Costa, and J.R. Grider, *Enteric motor and interneuronal circuits controlling motility*. Neurogastroenterol Motil, 2004. **16 Suppl 1**: p. 34-8.
20. Bornstein JC, F.J., Kunze WAA, *Enteric reflexes that influence motility*, in Brookes SJH, Costa M, eds. *Innervation of the Gastrointestinal Tract*. 2002, Taylor & Francis: London, UK. p. 1-55.
21. Brandstrom, A., P. Lindberg, and U. Junggren, *Structure activity relationships of substituted benzimidazoles*. Scand J Gastroenterol Suppl, 1985. **108**: p. 15-22.
22. Brookes, S.J., A.C. Meedeniya, P. Jobling, and M. Costa, *Orally projecting interneurons in the guinea-pig small intestine*. J Physiol, 1997. **505 ( Pt 2)**: p. 473-91.
23. Brookes SJH, C.M., *Cellular organisation of the mammalian enteric nervous system*, in *Innervation of the Gastrointestinal Tract*. 2002, Taylor & Francis: London UK. p. 393- 467.
24. Calignano, A., G. La Rana, A. Makriyannis, S.Y. Lin, M. Beltramo, and D. Piomelli, *Inhibition of intestinal motility by anandamide, an endogenous cannabinoid*. Eur J Pharmacol, 1997. **340**(2-3): p. R7-8.
25. Caspary, W.F., *Diagnostik und Therapie der Helicobacter-pylori-Infektion*, in *Leitlinie der Deutschen Gesellschaft für Verdauungs- und Stoffwechselkrankheiten*. 1996. p. 392 - 401.

26. Chang, L.C., L.L. Song, E.J. Park, L. Luyengi, K.J. Lee, N.R. Farnsworth, J.M. Pezzuto, and A.D. Kinghorn, *Bioactive constituents of Thuja occidentalis*. J Nat Prod, 2000. **63**(9): p. 1235-8.
27. Costa, M., J.B. Furness, and C.M. Humphreys, *Apamin distinguishes two types of relaxation mediated by enteric nerves in the guinea-pig gastrointestinal tract*. Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol, 1986. **332**(1): p. 79-88.
28. Costa, M., J.B. Furness, S. Pompolo, S.J. Brookes, J.C. Bornstein, D.S. Bredt, and S.H. Snyder, *Projections and chemical coding of neurons with immunoreactivity for nitric oxide synthase in the guinea-pig small intestine*. Neurosci Lett, 1992. **148**(1-2): p. 121-5.
29. Costa, M., S.J. Brookes, P.A. Steele, I. Gibbins, E. Burcher, and C.J. Kandiah, *Neurochemical classification of myenteric neurons in the guinea-pig ileum*. Neuroscience, 1996. **75**(3): p. 949-67.
30. Cowan, A., D.L. Earnest, G. Ligozio, and M.A. Rojavin, *Omeprazole-induced slowing of gastrointestinal transit in mice can be countered with tegaserod*. Eur J Pharmacol, 2005. **517**(1-2): p. 127-31.
31. Croci, T., L. Manara, G. Aureggi, F. Guagnini, M. Rinaldi-Carmona, J.P. Maffrand, G. Le Fur, S. Mukenge, and G. Ferla, *In vitro functional evidence of neuronal cannabinoid CB1 receptors in human ileum*. Br J Pharmacol, 1998. **125**(7): p. 1393-5.
32. Cushey, A.A., in *A Textbook of Pharmacology and Therapeutics*. 1906, Lea Bros.: Philadelphia. p. 426.
33. De Schepper, H.U., B.Y. De Winter, T.C. Seerden, A.G. Herman, P.A. Pelckmans, and J.G. De Man, *Functional characterisation of tachykinin receptors*

- in the circular muscle layer of the mouse ileum*. Regul Pept, 2005. **130**(3): p. 105-15.
34. Deiml, T., R. Haseneder, W. Zieglgansberger, G. Rammes, B. Eisensamer, R. Rupprecht, and G. Hapfelmeier, *Alpha-thujone reduces 5-HT<sub>3</sub> receptor activity by an effect on the agonist-reduced desensitization*. Neuropharmacology, 2004. **46**(2): p. 192-201.
  35. del Castillo, J., M. Anderson, and G.M. Rubottom, *Marijuana, absinthe and the central nervous system*. Nature, 1975. **253**(5490): p. 365-6.
  36. Devane, W.A., F.A. Dysarz, 3rd, M.R. Johnson, L.S. Melvin, and A.C. Howlett, *Determination and characterization of a cannabinoid receptor in rat brain*. Mol Pharmacol, 1988. **34**(5): p. 605-13.
  37. Dzoljic, M., *Action of Guanethidine on Smooth Muscle of Guinea Pig, Rat, Rabbit, and Leech Dorsal Muscle*. Arch Int Pharmacodyn Ther, 1964. **151**: p. 334-42.
  38. Dzoljic, M., N. Van, P.N. Aarsen, and L.H. Loebis, *Effect of Guanethidine on Smooth Muscle of Rat Stomach in Vivo and in Vitro*. Arch Int Pharmacodyn Ther, 1964. **151**: p. 343-51.
  39. Farup, P.G., O. Hovde, R. Torp, and S. Wetterhus, *Patients with functional dyspepsia responding to omeprazole have a characteristic gastro-oesophageal reflux pattern*. Scand J Gastroenterol, 1999. **34**(6): p. 575-9.
  40. Fields, J.Z., M. Jacyno, R. Wasyliw, D. Winship, and A. Keshavarzian, *Ethanol inhibits contractility of esophageal smooth muscle strips*. Alcohol Clin Exp Res, 1995. **19**(6): p. 1403-13.

41. Frye, G.D., A.S. Fincher, M. Lorenzetti, J. Trzeciakowski, and W.H. Griffith, *Comparison of contractile responses of the guinea pig ileum longitudinal muscle to ethanol and GABAA agonists*. J Pharmacol Exp Ther, 1990. **252**(2): p. 474-81.
42. Gabella, *Quantitative morphological study of smooth muscle cells of the guinea pig taenia coli*. Cell Tissue Res, 1976: p. 170:161.
43. Gabella, *Structure of muscles and nerves in the gastrointestinal tract*, in *Physiology of the gastrointestinal tract*, e. Johnson LR, Editor. 1987, Raven Press: New York. p. 335.
44. Gabella, *Structure of intestinal musculature*, in *Vol.1 Handbook of physiology , section 6 the gastrointestinal system*, W.J. ed.al., Editor. 1989, American Physiology Society: New York. p. 103.
45. Galiegue, S., S. Mary, J. Marchand, D. Dussosoy, D. Carriere, P. Carayon, M. Bouaboula, D. Shire, G. Le Fur, and P. Casellas, *Expression of central and peripheral cannabinoid receptors in human immune tissues and leukocyte subpopulations*. Eur J Biochem, 1995. **232**(1): p. 54-61.
46. Gerard, C.M., C. Mollereau, G. Vassart, and M. Parmentier, *Molecular cloning of a human cannabinoid receptor which is also expressed in testis*. Biochem J, 1991. **279 ( Pt 1)**: p. 129-34.
47. Glaeske Gerd, J.K., Deitermann Bernhilde. *GEK- Arzneimittelreport- 1991. Auswertungsergebnisse der GEK- Arzneimitteldaten aus den Jahren 1989 - 1990 1992*
48. Goyal, R.K. and S. Rattan, *Nature of the vagal inhibitory innervation to the lower esophageal sphincter*. J Clin Invest, 1975. **55**(5): p. 1119-26.

49. Grider, J.R. and G.M. Makhlof, *Colonic peristaltic reflex: identification of vasoactive intestinal peptide as mediator of descending relaxation*. Am J Physiol, 1986. **251**(1 Pt 1): p. G40-5.
50. Grider, J.R. and G.M. Makhlof, *Contraction mediated by Ca<sup>++</sup> release in circular and Ca<sup>++</sup> influx in longitudinal intestinal muscle cells*. J Pharmacol Exp Ther, 1988. **244**(2): p. 432-7.
51. Hall, A.C., C.M. Turcotte, B.A. Betts, W.Y. Yeung, A.S. Agyeman, and L.A. Burk, *Modulation of human GABAA and glycine receptor currents by menthol and related monoterpenoids*. Eur J Pharmacol, 2004. **506**(1): p. 9-16.
52. Hardcastle, J., P.T. Hardcastle, and W.J. Mathias, *The influence of the gamma-amino butyric acid (GABA) antagonist bicuculline on transport processes in rat small intestine*. J Pharm Pharmacol, 1991. **43**(2): p. 128-30.
53. Harnischfeger G, S.H., *Bewährte Pflanzendrogen in Wissenschaft und Medizin*. 1983, Notamed Verlag: Bad Homburg/ Melsungen. p. 250-9.
54. Herkenham, M., *Characterization and localization of cannabinoid receptors in brain: an in vitro technique using slide-mounted tissue sections*. NIDA Res Monogr, 1991. **112**: p. 129-45.
55. Herkenham, M., A.B. Lynn, B.R. de Costa, and E.K. Richfield, *Neuronal localization of cannabinoid receptors in the basal ganglia of the rat*. Brain Res, 1991. **547**(2): p. 267-74.
56. Hold, K.M., N.S. Sirisoma, T. Ikeda, T. Narahashi, and J.E. Casida, *Alpha-thujone (the active component of absinthe): gamma-aminobutyric acid type A receptor modulation and metabolic detoxification*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2000. **97**(8): p. 3826-31.

57. Holzer, P., W. Schluet, and C.A. Maggi, *Ascending enteric reflex contraction: roles of acetylcholine and tachykinins in relation to distension and propagation of excitation*. J Pharmacol Exp Ther, 1993. **264**(1): p. 391-6.
58. Izzo, A.A., N. Mascolo, M. Tonini, and F. Capasso, *Modulation of peristalsis by cannabinoid CB(1) ligands in the isolated guinea-pig ileum*. Br J Pharmacol, 2000. **129**(5): p. 984-90.
59. Janet E. Joy, S.J.W.J., John A. Benson Jr., *Marijuana and Medicine. Assessing the Science Base*, ed. I.o. Medicine. 1999.
60. Jeffrey, B., H.S. Udaykumar, and K.S. Schulze, *Flow fields generated by peristaltic reflex in isolated guinea pig ileum: impact of contraction depth and shoulders*. Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol, 2003. **285**(5): p. G907-18.
61. Johnson, D.S. and S.F. Heinemann, *Detection of 5-HT<sub>3R-A</sub>, a 5-HT<sub>3</sub> receptor subunit, in submucosal and myenteric ganglia of rat small intestine using in situ hybridization*. Neurosci Lett, 1995. **184**(1): p. 67-70.
62. Katzung, B., *Histamine, serotonin and the ergot alkaloids.*, in *Basic and clinical pharmacology, 8th edition*. 2001, The McGraw Hill Companies, Inc: USA. p. 265–291.
63. Katzung, B.G., *Sedative-hypnotic drugs.*, in *Basic and clinical pharmacology, 8th edition*. 2001, The McGraw Hill Companies, Inc: USA. p. 364–381.
64. Keshavarzian, A., B. Muska, R. Sundaresan, G. Urban, and J. Fields, *Ethanol at pharmacologically relevant concentrations inhibits contractility of isolated smooth muscle cells of cat esophagus*. Alcohol Clin Exp Res, 1996. **20**(1): p. 180-4.
65. Konturek, S.J., M. Cieszkowski, N. Kwiecien, J. Konturek, J. Tasler, and J. Bilski, *Effects of omeprazole, a substituted benzimidazole, on gastrointestinal*

- secretions, serum gastrin, and gastric mucosal blood flow in dogs.*  
Gastroenterology, 1984. **86**(1): p. 71-7.
66. Krantis, A. and R.K. Harding, *GABA-related actions in isolated in vitro preparations of the rat small intestine.* Eur J Pharmacol, 1987. **141**(2): p. 291-8.
67. Kuemmerle, J.F., K.S. Murthy, and G.M. Makhlouf, *Agonist-activated, ryanodine-sensitive, IP3-insensitive Ca<sup>2+</sup> release channels in longitudinal muscle of intestine.* Am J Physiol, 1994. **266**(5 Pt 1): p. C1421-31.
68. Kuemmerle, J.F., Makhlouf GM, *Activation of CL<sup>-</sup> channels by contractile agonists depolarizes longitudinal muscle and triggers Ca<sup>2+</sup> influx via voltage-sensitive Ca<sup>2+</sup> channels.* Gastroenterology, 1994: p. 106:A527.
69. Kulkarni-Narla, A. and D.R. Brown, *Localization of CB1-cannabinoid receptor immunoreactivity in the porcine enteric nervous system.* Cell Tissue Res, 2000. **302**(1): p. 73-80.
70. Lachenmeier, D.W., J. Emmert, T. Kuballa, and G. Sartor, *Thujone-Cause of absinthism?* Forensic Sci Int, 2005.
71. Laplace, J.P., [71]. Reprod Nutr Dev, 1984. **24**(5B): p. 707-65.
72. Larson, M. and K. Schulze, *Appearance of peristaltic reflex in isolated guinea pig ileum in response to boluses of air, water, oil, and cellulose.* Dig Dis Sci, 2002. **47**(12): p. 2644-50.
73. Lecci, A., P. Santicioli, and C.A. Maggi, *Pharmacology of transmission to gastrointestinal muscle.* Curr Opin Pharmacol, 2002. **2**(6): p. 630-41.
74. Lepsch, M. and S.M. Strayer, *Omeprazole and placebo have same long-term effect on dyspepsia.* J Fam Pract, 2003. **52**(9): p. 687-8.



75. Llewellyn-Smith, I.J., J.B. Furness, I.L. Gibbins, and M. Costa, *Quantitative ultrastructural analysis of enkephalin-, substance P-, and VIP-immunoreactive nerve fibers in the circular muscle of the guinea pig small intestine*. J Comp Neurol, 1988. **272**(1): p. 139-48.
76. Lomax, A.E. and J.B. Furness, *Neurochemical classification of enteric neurons in the guinea-pig distal colon*. Cell Tissue Res, 2000. **302**(1): p. 59-72.
77. Lopez-Redondo, F., G.M. Lees, and R.G. Pertwee, *Effects of cannabinoid receptor ligands on electrophysiological properties of myenteric neurones of the guinea-pig ileum*. Br J Pharmacol, 1997. **122**(2): p. 330-4.
78. Lordal, M. and P.M. Hellstrom, *Serotonin stimulates migrating myoelectric complex via 5-HT<sub>3</sub>-receptors dependent on cholinergic pathways in rat small intestine*. Neurogastroenterol Motil, 1999. **11**(1): p. 1-10.
79. Lüllmann Heinz, M.K., *Hemmung der Salzsäure- Produktion*, in *Pharmakologie und Toxikologie*. 1999, Thieme: Stuttgart. p. 222- 225.
80. Maggi, C.A., R. Patacchini, P. Santicioli, S. Giuliani, D. Turini, G. Barbanti, P. Beneforti, D. Misuri, and A. Meli, *Human isolated small intestine: motor responses of the longitudinal muscle to field stimulation and exogenous neuropeptides*. Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol, 1989. **339**(4): p. 415-23.
81. Mailleux, P. and J.J. Vanderhaeghen, *Distribution of neuronal cannabinoid receptor in the adult rat brain: a comparative receptor binding radioautography and in situ hybridization histochemistry*. Neuroscience, 1992. **48**(3): p. 655-68.
82. Makhoulouf, *Smooth Muscle of the Gut*, in *Gastroenterology*. 2000.

83. Manes, G., A. Menchise, C. de Nucci, and A. Balzano, *Empirical prescribing for dyspepsia: randomised controlled trial of test and treat versus omeprazole treatment*. *Bmj*, 2003. **326**(7399): p. 1118.
84. Manfred Schubert-Zsilavec, H.S., *Protonenpumpeninhibitoren*, in *Pharmazie in unserer Zeit*. 2005. p. 194- 199.
85. Marshall, B.J. and J.R. Warren, *Unidentified curved bacilli in the stomach of patients with gastritis and peptic ulceration*. *Lancet*, 1984. **1**(8390): p. 1311-5.
86. Meineche-Schmidt, V. and E. Christensen, *Which dyspepsia patients will benefit from omeprazole treatment? Analysis of a Danish multicenter trial*. *Am J Gastroenterol*, 2000. **95**(10): p. 2777-83.
87. Meschler, J.P. and A.C. Howlett, *Thujone exhibits low affinity for cannabinoid receptors but fails to evoke cannabimimetic responses*. *Pharmacol Biochem Behav*, 1999. **62**(3): p. 473-80.
88. Miller, S.M., D. Reed, M.G. Sarr, G. Farrugia, and J.H. Szurszewski, *Haem oxygenase in enteric nervous system of human stomach and jejunum and co-localization with nitric oxide synthase*. *Neurogastroenterol Motil*, 2001. **13**(2): p. 121-31.
89. Millspaugh , C., *American Medicinal Plants*. 1974, New York: Dovar Publications.
90. Monroe, R.L., P.P. Bertrand, and J.C. Bornstein, *ATP and 5-HT are the principal neurotransmitters in the descending excitatory reflex pathway of the guinea-pig ileum*. *Neurogastroenterol Motil*, 2002. **14**(3): p. 255-64.
91. Murthy, K.S., J.F. Kuemmerle, and G.M. Makhlouf, *Agonist-mediated activation of PLA2 initiates Ca<sup>2+</sup> mobilization in intestinal longitudinal smooth muscle*. *Am J Physiol*, 1995. **269**(1 Pt 1): p. G93-102.

92. Naser, B., C. Bodinet, M. Tegtmeier, and U. Lindequist, *Thuja occidentalis (Arbor vitae): A Review of its Pharmaceutical, Pharmacological and Clinical Properties*. Evid Based Complement Alternat Med, 2005. **2**(1): p. 69-78.
93. Neunlist, M., P. Aubert, C. Toquet, T. Oreshkova, J. Barouk, P.A. Lehur, M. Schemann, and J.P. Galmiche, *Changes in chemical coding of myenteric neurones in ulcerative colitis*. Gut, 2003. **52**(1): p. 84-90.
94. Offergeld, R., C. Reinecker, E. Gumz, S. Schrum, R. Treiber, R.D. Neth, and S.H. Gohla, *Mitogenic activity of high molecular polysaccharide fractions isolated from the cupressaceae Thuja occidentalis L. enhanced cytokine-production by thyapolsaccharide, g-fraction (TPSg)*. Leukemia, 1992. **6 Suppl 3**: p. 189S-191S.
95. Olsen, R.W., *Absinthe and gamma-aminobutyric acid receptors*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2000. **97**(9): p. 4417-8.
96. Ong, J. and D.I. Kerr, *Modulation of spontaneous motility by GABAA receptor antagonism in the guinea pig isolated ileum*. Neurosci Lett, 1989. **101**(2): p. 203-8.
97. Pertwee, R.G., S.R. Fernando, J.E. Nash, and A.A. Coutts, *Further evidence for the presence of cannabinoid CB1 receptors in guinea-pig small intestine*. Br J Pharmacol, 1996. **118**(8): p. 2199-205.
98. Porter, A.J., D.A. Wattchow, S.J. Brookes, and M. Costa, *The neurochemical coding and projections of circular muscle motor neurons in the human colon*. Gastroenterology, 1997. **113**(6): p. 1916-23.
99. Raeymaekers, L., F. Wuytack, S. Batra, and R. Casteels, *A comparative study of the calcium accumulation by mitochondria and microsomes isolated from the*

- smooth muscle of the guinea-pig taenia coli*. Pflugers Arch, 1977. **368**(3): p. 217-23.
100. Rasmussen, L., E. Oster-Jorgensen, N. Qvist, and S.A. Pedersen, *The effects of omeprazole on intragastric pH, intestinal motility, and gastric emptying rate*. Scand J Gastroenterol, 1999. **34**(7): p. 671-5.
101. Ross, R.A., H.C. Brockie, S.R. Fernando, B. Saha, R.K. Razdan, and R.G. Pertwee, *Comparison of cannabinoid binding sites in guinea-pig forebrain and small intestine*. Br J Pharmacol, 1998. **125**(6): p. 1345-51.
102. Sah, H.J., P.P. Sah, and S.A. Peoples, *The new antihypertensive agent, guanethidine--a review. I. Discovery and development-chemical structure-physical properties-pharmacological actions*. Arzneimittelforschung, 1966. **16**(1): p. 53-8.
103. Sang, Q. and H.M. Young, *Chemical coding of neurons in the myenteric plexus and external muscle of the small and large intestine of the mouse*. Cell Tissue Res, 1996. **284**(1): p. 39-53.
104. Sang, Q. and H.M. Young, *The identification and chemical coding of cholinergic neurons in the small and large intestine of the mouse*. Anat Rec, 1998. **251**(2): p. 185-99.
105. Schuel, H., M.C. Chang, D. Berkery, R. Schuel, A.M. Zimmerman, and S. Zimmerman, *Cannabinoids inhibit fertilization in sea urchins by reducing the fertilizing capacity of sperm*. Pharmacol Biochem Behav, 1991. **40**(3): p. 609-15.
106. Schulze-Delrieu, K., *Visual parameters define the phase and the load of contractions in isolated guinea pig ileum*. Am J Physiol, 1999. **276**(6 Pt 1): p. G1417-24.

107. Shire, D., C. Carillon, M. Kaghad, B. Calandra, M. Rinaldi-Carmona, G. Le Fur, D. Caput, and P. Ferrara, *An amino-terminal variant of the central cannabinoid receptor resulting from alternative splicing*. J Biol Chem, 1995. **270**(8): p. 3726-31.
108. Simonetti, G., *Simon & Schuster's Guide to Herbs and Spices*. 1990, Simon & Schuster: New York. p. 261-262.
109. Somlyo, A.P., A.V. Somlyo, and H. Shuman, *Electron probe analysis of vascular smooth muscle. Composition of mitochondria, nuclei, and cytoplasm*. J Cell Biol, 1979. **81**(2): p. 316-35.
110. Sondermann W., S.W., *Über die Biogenese von Thujon, in Thuja occidentalis*. 1962, Tetrahedron Lett. p. 259-60.
111. Spechler, S.J., *What is the long-term effect of high-dose versus standard-dose omeprazole in patients with dyspepsia?* Nat Clin Pract Gastroenterol Hepatol, 2004. **1**(1): p. 12-3.
112. Storr, M., E. Gaffal, D. Saur, V. Schusdziarra, and H.D. Allescher, *Effect of cannabinoids on neural transmission in rat gastric fundus*. Can J Physiol Pharmacol, 2002. **80**(1): p. 67-76.
113. Sugiura, T., T. Kodaka, S. Nakane, S. Kishimoto, S. Kondo, and K. Waku, *Detection of an endogenous cannabimimetic molecule, 2-arachidonoylglycerol, and cannabinoid CB1 receptor mRNA in human vascular cells: is 2-arachidonoylglycerol a possible vasomodulator?* Biochem Biophys Res Commun, 1998. **243**(3): p. 838-43.
114. Talley, N.J., V. Meineche-Schmidt, P. Pare, M. Duckworth, P. Raisanen, A. Pap, H. Kordecki, and V. Schmid, *Efficacy of omeprazole in functional dyspepsia:*

- double-blind, randomized, placebo-controlled trials (the Bond and Opera studies).*  
Aliment Pharmacol Ther, 1998. **12**(11): p. 1055-65.
115. Talley, N.J., *Omeprazole was effective in the short term for uninvestigated dyspepsia.* ACP J Club, 2003. **138**(3): p. 70.
116. Taylor, G.S. and R.A. Bywater, *Antagonism of non-cholinergic excitatory junction potentials in the guinea-pig ileum by a substance P analogue antagonist.* Neurosci Lett, 1986. **63**(1): p. 23-6.
117. Thomas, E.A., H. Sjovall, and J.C. Bornstein, *Computational model of the migrating motor complex of the small intestine.* Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol, 2004. **286**(4): p. G564-72.
118. Timmermans, M.W. and D.W. Scheuermann, *Distributional pattern and targets of GABA-containing neurons in the porcine small and large intestine.* Eur J Morphol, 1998. **36**(3): p. 133-42.
119. Tonini, M., G. De Petris, L. Onori, L. Manzo, C.A. Rizzi, and A. Crema, *The role of GABAA receptor function in peristaltic activity of the guinea-pig ileum: a comparative study with bicuculline, SR 95531 and picrotoxinin.* Br J Pharmacol, 1989. **97**(2): p. 556-62.
120. Traud J., M.H., *Bestimmung und Identifizierung von alpha und beta Thujon mittels Capillar-Gas-Chromographie-Massenspektrometrie (GC/MS).* Fresenius Z Anal Chem, 1983: p. 315:221-6.
121. Veldhuyzen van Zanten, S.J., N. Chiba, D. Armstrong, A. Barkun, A. Thomson, S. Smyth, S. Escobedo, J. Lee, and P. Sinclair, *A randomized trial comparing omeprazole, ranitidine, cisapride, or placebo in helicobacter pylori negative, primary care patients with dyspepsia: the CADET-HN Study.* Am J Gastroenterol, 2005. **100**(7): p. 1477-88.

122. Venugopalan, C.S. and E.P. Holmes, *Blockade of electrical field stimulation-induced nonadrenergic noncholinergic (NANC) excitatory response of the guinea pig ileum*. Res Commun Chem Pathol Pharmacol, 1992. **78**(2): p. 225-34.
123. Vorberg, G., *Bei Erkältung unspezifische Immunabwehr stimulieren*. Ärztliche Praxis, 1984: p. 36:97-8.
124. Wattchow, D.A., J.B. Furness, and M. Costa, *Distribution and coexistence of peptides in nerve fibers of the external muscle of the human gastrointestinal tract*. Gastroenterology, 1988. **95**(1): p. 32-41.
125. Wattchow, D.A., A.J. Porter, S.J. Brookes, and M. Costa, *The polarity of neurochemically defined myenteric neurons in the human colon*. Gastroenterology, 1997. **113**(2): p. 497-506.
126. Wilson, A.J., I.J. Llewellyn-Smith, J.B. Furness, and M. Costa, *The source of the nerve fibres forming the deep muscular and circular muscle plexuses in the small intestine of the guinea-pig*. Cell Tissue Res, 1987. **247**(3): p. 497-504.
127. Wong, W.M., B.C. Wong, W.K. Hung, Y.K. Yee, A.W. Yip, M.L. Szeto, F.M. Fung, T.S. Tong, K.C. Lai, W.H. Hu, M.F. Yuen, and S.K. Lam, *Double blind, randomised, placebo controlled study of four weeks of lansoprazole for the treatment of functional dyspepsia in Chinese patients*. Gut, 2002. **51**(4): p. 502-6.

## 8 Abbildungs- und Tabellenverzeichnis

Abb. 1 Schematisierte Darstellung des Versuchmodells .....	9
Abb. 2 Tracing eines Muskelstreifens unter basalen Konditionen .....	16
Abb. 3 Tracing eines durch Carbachol stimulierten Organstreifens.....	17
Abb. 4 Tracingbeispiele eines durch elektrische Feldstimulation kontrahierten Muskelstreifens mit Einteilung und genauerer Definition der Kontraktionsphasen..	19
Abb. 5 Tracing eines Muskelstreifen, der unter NANC Bedingungen mit elektrischer Feldstimulation kontrahiert wurde.....	20
Abb. 6 vergleichende Darstellung der zweiten Kontraktionsphase unter Standard- und unter NANC Bedingungen .....	21
Abb. 7 Darstellung der hemmenden Wirkung der NK Antagonisten GR 82334 (NK1 Antagonist), MDL 29912 (NK2 Antagonist) und SB 218795 (NK3 Antagonist) auf die peptiderge Kontraktionsantwort des durch elektrische Feldstimulation stimulierten Muskelstreifens.....	22
Abb. 8 Beispiel für die elektrisch induzierte Relaxation der mit Serotonin (1 $\mu$ M) vorbehandelten Muskulatur unter nicht adrenergen, nicht cholinergen Bedingungen .....	23
Abb. 9 Einfluss der Thujone auf das durch Carbachol ( 1 $\mu$ M ) induzierte Kontraktionsplateau der glatten Muskulatur im Verhältnis zu einem Versuchablauf ohne Thujon Applikation ( a.).....	26
Abb. 10 vergleichende Darstellung des Einflusses von $\alpha$ Thujon auf das durch Carbachol induzierte Kontraktionsplateau mit und ohne Applikation von 1 $\mu$ M SR 141716A .....	27
Abb. 11 vergleichende Darstellung der Wirkung von $\alpha$ Thujon auf die erste und damit cholinerg vermittelten Komponente der durch Elektrostimulation ausgelösten Kontraktion mit und ohne Applikation von SR 141716A (1 $\mu$ M) .....	28
Abb. 12.. Darstellung der Wirkung von Mischthujon auf die erste und damit cholinerg vermittelte Komponente der durch Elektrostimulation ausgelösten Kontraktion.....	29



Abb. 13 Darstellung der hemmenden Wirkung einer Lösung, die dem Lösungsansatz von Thujonen entspricht auf die erste und damit cholinerg vermittelten Komponente der durch Elektrostimulation ausgelösten Kontraktion.....	30
Abb. 14 Vergleichende Darstellung: Wirkung von $\alpha$ Thujon auf die peptiderge Kontraktion mit und ohne Applikation von SR141716A und der Leerversuch bei elektrischer Feldstimulation unter nicht adrenergen, nicht cholinergen Bedingungen .....	32
Abb. 15 Vergleich der Thujone in deren Wirkung auf die Relaxation .....	34
Abb. 16 vergleichende Darstellung des Einflusses von Muscimol und (-)- Bicuculline auf das durch Carbachol induzierte Kontraktionsplateau .....	35
Abb. 17 Wirkung von Muscimol auf die durch EFS hervorgerufene cholinerge Komponente der Kontraktionsantwort .....	37
Abb. 18 Wirkung von Muscimol und (-)- Bicuculline auf die peptiderge Kontraktionsantwort durch elektrische Feldstimulation unter nicht adrenergen, nicht cholinergen Bedingungen .....	38
Abb. 19 Einfluss von (-)- Bicuculline, Muscimol auf die Relaxation .....	39
Abb. 20 Änderung der Kontraktionsfrequenz und –amplitude bei steigender Omeprazolkonzentration.....	40
Abb. 21 Wirkung von Omeprazol auf die peptiderge Kontraktionsantwort bei elektrischer Feldstimulation unter nicht adrenergen, nicht cholinergen Bedingungen .....	43
Abb. 22 Wirkung von Omeprazol auf die durch Serotoningabe ( 1 $\mu$ M) und elektrische Feldstimulation induzierte Relaxation am Organstreifen .....	44
Abb. 23 schematische Darstellung des Signaltransduktionsweges für Calcium mobilisierende Agonisten in glatten Muskelzellen der longitudinalen Schicht [4]....	47
Abb. 24 Grundstrukturformel von Thujon.....	51
Abb. 25 Strukturformeln von $\alpha$ Thujon und seiner Metaboliten Thujol und 7- Hydroxy $\alpha$ Thujon.....	52
Abb. 26 schematische Darstellung des 5 HT3 Rezeptors [62] .....	52
Abb. 27 schematische Darstellung des GABA A Rezeptors [63].....	54
Abb. 28 molekularer Aufbau des CB 1- bzw. CB 2 Rezeptor im Vergleich [59].....	55
Abb. 29 Die Strukturformeln von Thujon, Thujenol( tautomere Form im Gleichgewicht mit Thujon) und Tetrahydrocannabinol .....	56

Abb. 30 Entwicklung der Protonenpumpeninhibitoren .....	58
Abb. 31 Strukturformel von Omeprazol.....	59
Abb. 32 Strukturformel und Wirkungsweise von Omeprazol. Nach Umlagerung in seine aktiven Wirkform bindet das Schwefel Atom über eine SH Gruppe mit der H <sup>+</sup> /K <sup>+</sup> - ATP ase und führt diese in eine inaktive Form über [79].....	60
Abb. 33 Vergleich der Plasmakonzentrationen anhand des Beispiels einer Antramups Tablette 20 mg und einer Antra Kapsel 20 mg [7] .....	73
Tabelle 1 Einfluss des Substanz P Antagonisten L732,138 auf die peptiderge Komponente der elektrisch induzierten (16 Hz) Kontraktion (n.s. bedeutet nicht signifikant).....	22
Tabelle 2: Einfluss der Thujone $\alpha$ Thujon, $\alpha$ - $\beta$ Thujon und Mischthujon auf die Kontraktionsfrequenz der Muskelstreifen (n.s. bedeutet nicht signifikant).....	24
Tabelle 3 Einfluss der Thujone $\alpha$ Thujon, $\alpha$ - $\beta$ Thujon und Mischthujon auf die Kontraktionsamplitude der Muskelstreifen (n.s. bedeutet nicht signifikant) .....	25
Tabelle 4 Darstellung der Wirkung von $\alpha$ - $\beta$ Thujon auf die cholinerge Komponente der EFS am Beispiel der Stimulationsfrequenz 8 Hz (n.s. bedeutet nicht signifikant) ...	31
Tabelle 5 Darstellung der Wirkung von $\alpha$ - $\beta$ Thujon auf die peptiderge Kontraktionskomponente unter nicht adrenergen, nicht cholinergen Bedingungen der elektrischen Feldstimulation (n.s. bedeutet nicht signifikant) .....	33
Tabelle 6 Darstellung der Wirkung von (-)- Biccuculline auf die cholinerge Komponente der EFS am Beispiel der Stimulationsfrequenz 16 Hz (n.s. bedeutet nicht signifikant) .....	36
Tabelle 7 Einfluss von Omeprazol auf das durch Carbachol ( 1 $\mu$ M ) induzierte Kontraktionsplateau der glatten Muskelzelle im Vergleich zu basalen Konditionen (n.s. bedeutet nicht signifikant) .....	41
Tabelle 8 Einfluss von Omeprazol auf die durch elektrische Feldstimulation induzierte cholinerge Kontraktionsantwort .....	42
Tabelle 9 Neurochemie der menschlichen enterischen Neurone und die vermutete Funktion .....	49

## 9 Abkürzungs- und Synonymverzeichnis

(-)-Bicuculline	3-Hydroxy-5-aminomethyl-isoxazole 1(S),9(R)-(-)-Bicuculline methochloride
Abb.	Abbildung
ATP	Adenosintriphosphat
ACH	Acetylcholin
ca.	circa
CaCl	Kalzium Chlorid
cADPR	zyklische Diphospho- Ribose
CB1	Cannabinoidrezeptor Typ 1
CCH	Carbachol
ChAT	choline Acetyltransferase
CO <sub>2</sub>	Kohlendioxid
CYP	Cytochrom P
EFS	elektrische Feldstimulation
et al.	und andere
EU	Europäische Union
GABA	γ- Aminobuttersäure
GABA A	γ- Aminobuttersäure Typ A, (γ- Aminobutyric acid type A)
GR 82334	pGlu-Ala-Asp-Pro-Asn-Lys-Phe-Tyr- Pro(spiro-γ-lactam-Leu-Trp-NH <sub>2</sub> )
HT	Hydroxytryptamin
Hz	Hertz ( SI Einheit:1/s)
ICC	interstitial cells of Cajal
KCL	Kalium Chlorid
KRS	Krebs- Ringer Solution
lat.	lateinisch
MDL 29,913	Cyclo[Gln-Trp-Phe-Gly-Leu-CH <sub>2</sub> N(CH <sub>3</sub> )-

MgSO <sub>4</sub>	Leu]
min	Magnesiumsulfat
mN	Minuten
n	milli Newton (SI Einheit: m kg/s <sup>2</sup> )
n.s.	Anzahl
nAChR	nicht signifikant
NaCl	nicotinerge Rezeptoren
NADPH	Natrium Chlorid
NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	Nicotinamidadenindinukleotidphosphat
NaHCO <sub>3</sub>	Natriumdihydrogenphosphat
NANC	Natriumhydrogencarbonat
NK	nicht adrenerg, nicht cholinerg
NO	Neurokinin
NOS	Stickstoffmonoxid
O <sub>2</sub>	Stickstoffmonoxid Synthase
PACAP	Sauerstoff
PPI	pituitary adenylyl cyclase activating peptide
SB 218795	Protonenpumpeninhibitoren
SEM	-)-(R)-N-(α-Methoxycarbonylbenzyl)-2-phenylquinoline-4-carboxamide
Substanz P	standard error of the mean (Standardfehler)
SR141716A	Arg-Pro-Lys-Pro-Gln-Gln-Phe-Phe-Gly-Leu-Met-NH <sub>2</sub>
u.a.	N-(piperidin-1-yl)-5-(4-chlorophenyl)-1-(2,4-dichlorophenyl)-4-methyl-1H-pyrazol-3-carboxamid HCl
v.a.	unter anderem
VIP	vor allem
vgl.	vasoaktives intestinales Peptid
ZNS	vergleiche
μM	Zentrales Nervensystem
	micro Mol

## 10 Danksagung

Bei meinem Doktorvater, Herrn Prof. Dr. med. H.D. Allescher, möchte ich mich für die Überlassung des Themas, für die Aufnahme und Integration in seine Arbeitsgruppe bedanken.

Ganz besonderer Dank gebührt Herrn PD Dr. med. M. Storr für seine langjährige, gewissenhafte und motivierende Unterstützung, seine wissenschaftliche Anleitung und die ständige Bereitschaft mir mit Rat und Tat zur Seite zu stehen.

Danke auch an Herrn Dr.med A. Sibaev für seine wertvolle Unterstützung im Labor.

Zudem möchte ich Herrn Dr.med F. Hermann für Einführung und Hilfe bei der datentechnischen Verarbeitung dieser Arbeit danken.

Nicht zuletzt gilt mein Dank aber meinen Eltern, die mir stets bei der Verwirklichung meiner Ziele zur Seite standen, ohne sie wäre diese Arbeit nicht möglich gewesen.

## 11 Lebenslauf

Zu meiner Person

Stefan Huhnstock

geboren: 04.03.1977 in Staßfurt

Familienstand: ledig – keine Kinder

Staatsbürgerschaft: deutsch

Schulausbildung

1983 – 1989 EOS Ludwig Uhland / Staßfurt

1989 – 1997 Adalbert Stifter Gymnasium / Passau

Abgeschlossen am 27.06.1997

Bundeswehr

1997 – 1998 Gebirgssanitätsregiment 8/ Kempten

Hochschulstudium

1998 – 2000 Universität Regensburg

Vorklinischer Abschnitt

beendet mit Physikum 08/ 2000

2000 – 2005 Technische Universität München

klinischer Abschnitt

Abgeschlossen am 04.05.2005

## Praktisches Jahr

1. Tertial 2004      Orthopädie / Unfallchirurgie  
Zentralkrankenhaus Bozen, Italien
2. Tertial 2004      Viszeralchirurgie  
Krankenhaus München Bogenhausen
3. Tertial            Innere Medizin / Nephrologie  
Klinikum Rechts der Isar / München  
  
Queen Elisabeth Hospital/ Bridgetown  
University of the West Indies

## Beruflicher Werdegang

- |                         |   |
|-------------------------|---|
| 01.09.2005 – 15.10.2006 | BG Unfallklinik Murnau<br>Abteilung für Orthopädie  |
| 01.11.2006 – 22.02.2009 | Sykehus Østfold HF, Norwegen<br>Abteilung für Unfallchirurgie<br>Abteilung für Orthopädie             |
| 23.02.2009              | Oslo Universitetssykehus<br>Avdeling Kirkeveien<br>Ortopedisk Senter ( Abteilung für Unfallchirurgie) |