



universität
wien

DIPLOMARBEIT

Titel der Diplomarbeit

**Untersuchung der Wirkung eines Extraktes aus
Dianthus versicolor auf die Kontraktilität des Uterus
sowie Herz und glattmuskulären Organen**

angestrebter akademischer Grad

Magistra der Naturwissenschaften (Mag. rer.nat.)

Verfasserin / Verfasser:	Birgit Weisz-Pecher
Matrikel-Nummer:	0247348
Studienrichtung(lt. Studienblatt):	Ernährungswissenschaften
Betreuerin / Betreuer:	Ao. Univ.-Prof. Dr. Lemmens-Gruber

Wien, im Dezember 2008

***Die akademische Freiheit
ist die Freiheit,
soviel lernen zu dürfen,
wie man nur will.***

Rudolf Ludwig Karl Virchow (1821-1902)

Danksagung

Ich danke dem Leiter des Institutes für Ernährungswissenschaften, Herrn Univ.-Prof. Mag. Dr. Ibrahim Elmadfa, für die Möglichkeit der Durchführung dieser Diplomarbeit am Department für Pharmakologie und Toxikologie.

Mein besonderer Dank gilt Frau Univ.-Prof. Mag. Dr. Rosa Lemmens-Gruber für die Bereitstellung dieses interessanten Diplomarbeitsthemas sowie für die fachliche und freundliche Betreuung.

Frau Pakiza Rawnduzi möchte ich herzlichst für die nette Betreuung und Hilfestellung in allen Bereichen des praktischen Teils der Diplomarbeit danken. Ein Dankeschön auch an Herrn Univ.-Prof. Dr. Christian Studenik für das angenehme Arbeitsklima im Labor und Herrn Peter Höflich für das Entgegenkommen in labortechnischen Fragen. Frau Univ.-Prof. Dr. Sabine Glasl-Tazreiter, Frau Ass. Prof. Mag. Dr. Christa Kletter und Frau Mag. Astrid Obmann vom Department für Pharmakognosie danke ich für die Bereitstellung des Extraktes und der Hintergrundinformationen zur Droge *Dianthus versicolor* sowie zur traditionellen mongolischen Medizin.

Bedanken möchte ich mich auch bei meinen Studienkollegen, vor allem bei Claudia, Eva und Birgit, die mich während meiner Studienzeit immer unterstützt haben – es war eine sehr schöne Zeit! Außerdem möchte ich mich bei meiner Freundin Sylvia bedanken, die mich motiviert hat, diesen Schritt zu setzen und nach zehnjähriger Berufstätigkeit dieses Studium zu beginnen – es war die richtige Entscheidung!

Abschließend möchte ich mich ganz besonders bei meinen Eltern bedanken, vor allem bei meiner Mutter für ihre Unterstützung in allen Belangen während meines Studiums – DANKE Mama! Mein größter Dank gilt meinem Ehemann und meinen beiden Kindern für ihr Verständnis und ihren Beistand - besonders vor Prüfungen – DANKE meine Lieben!

Inhaltsverzeichnis

1 Einleitung und Fragestellung	1
2 Literaturübersicht.....	3
2.1 Traditionelle mongolische Medizin.....	4
2.2 <i>Dianthus versicolor</i>	8
2.2.1 Herkunft	8
2.2.2 Systematik	9
2.2.3 Morphologischer Aufbau	10
2.2.4 Verwendung in der traditionellen mongolischen Medizin	10
2.2.5 Inhaltsstoffe	13
3 Material und Methoden	16
3.1 Versuchstiere	16
3.2 Isolierung der Präparate	17
3.2.1 Herz und Arteria pulmonalis.....	18
3.2.1.1 Isolierung und Präparation des rechten Vorhofs	19
3.2.1.2 Isolierung und Präparation der Papillarmuskeln	19
3.2.1.3 Isolierung und Präparation der Arteria pulmonalis.....	20
3.2.2 Uterus	20
3.2.3 Terminales Ileum	21
3.2.4 Aorta	22
3.3 Physiologische Elektrolytlösung (Nährlösung)	23
3.3.1 Herstellung der physiologischen Nährlösung: rechter Vorhof, Papillarmuskel, Arteria pulmonalis, Aorta, terminales Ileum	23
3.3.2 Herstellung der physiologischen Nährlösung: Uterus	24

3.4 Kontraktionskraftmessung an isolierten Organen.....	25
3.4.1 Versuchsaapparatur	25
3.4.1.1 Versuchsaapparatur für Papillarmuskeln bzw. Vorhöfe	25
3.4.1.2 Versuchsaapparatur für Aorta, Arteria Pulmonalis, terminales leum, Uterus, rechter Vorhof	29
3.4.2 Versuchsaablauf	33
3.4.2.1 Versuchspräparat rechter Vorhof	33
3.4.2.2 Versuchspräparat Papillarmuskel.....	34
3.4.2.3 Versuchspräparate Aorta und Arteria pulmonalis	35
3.4.2.4 Versuchspräparat Uterus.....	36
3.4.2.5 Versuchspräparat terminales Ileum	37
3.5 Messgrößen.....	37
3.6 Statistik.....	39
3.7 Messung der intrazellulären Calcium-Konzentration	40
3.7.1 Verwendete Präparate.....	40
3.7.1.1 Arteria pulmonalis.....	40
3.7.1.2 Uterus.....	40
3.7.1.3 Kontraktionsauslösung der glatten Muskulatur.....	41
3.7.2 Material.....	43
3.7.3 Enzymatische Zellisolierung	45
3.7.3.1 Arteria pulmonalis.....	45
3.7.3.2 Uterus.....	46
3.7.4 Versuchsaablauf.....	49
3.8 Pflanzenmaterial	50
3.8.1 Aufsammlung.....	50
3.8.2 Extraktionsmethode - „Original water extract“	50
4 Ergebnisse und Diskussion	51
4.1 Isolierte Organpräparate	51
4.1.1 Uterus	53
4.1.2 Papillarmuskel	59

4.1.3 Rechter Vorhof.....	62
4.1.4 Aorta	66
4.1.5 Arteria pulmonalis	69
4.1.6 Terminales Ileum	73
4.2 Effekt auf die intrazelluläre Calcium-Konzentration.....	77
4.2.1 Arteria pulmonalis	77
4.2.2 Uterus	78
4.3 Diskussion.....	79
 5 Schlussbetrachtung	81
 6 Zusammenfassung.....	84
 7 Summary.....	85
 Literaturverzeichnis	86
 Lebenslauf	89

Verzeichnis der Abbildungen

Abb. 1: Vegetationszonen der Mongolei	3
Abb. 2: <i>Dianthus versicolor</i> Fisch - die Steppenpflanze	8
Abb. 3: Aufsammlungsgebiet in Hubsgul aimag.....	9
Abb. 4: <i>Dianthus versicolor</i> Fisch.....	10
Abb. 5: Zunahme des Gallenflusses bei Testung der Wasserextrakte von <i>Saussurea amara</i> , <i>Lilium pumilum</i> , <i>Dianthus versicolor</i> im Leberperusionsmodell.....	12
Abb. 6: Grundgerüst der Flavonoide	14
Abb. 7: Strukturformel von Chrysoeriol	14
Abb. 8: Strukturformel von Saponarin	15
Abb. 9: Utensilien für den Präparationsvorgang der isolierten Organe	17
Abb. 10: Brust-, Bauchhöhlensitus eines männlichen Meerschweinchens.....	18
Abb. 11: Präparation der Aorta	22
Abb. 12: Schematische Darstellung der Versuchsanordnung.....	25
Abb. 13: Originalabbildung der Versuchsanordnung	26
Abb. 14: Originalabbildung des Verstärkers inkl. Reizgerät und Schreiber	28
Abb. 15: Schematische Darstellung der Versuchsanordnung.....	29
Abb. 16: Originalabbildungen der Versuchsanordnung	30
Abb. 17: Originalabbildung des Verstärkers und des Schreibers	32
Abb. 18: Schematische Darstellung der Kraftmessung und Registrierung.....	32
Abb. 19: Graphische Darstellung der Konzentrations-Wirkungskurve des Extraktes aus <i>Dianthus versicolor</i> beim Uterus.....	55
Abb. 20: Graphische Darstellung der Wirkung eines Extraktes aus <i>Dianthus versicolor</i> auf die Amplitude spontaner Kontraktionen und Ruhespannung.....	56
Abb. 21: Originalaufzeichnung der Wirkung des Extraktes aus <i>Dianthus versicolor</i> auf die Kontraktionskraft des Uterus.....	57
Abb. 22: Graphische Darstellung der Konzentrations-Wirkungskurve des Extraktes aus <i>Dianthus versicolor</i> beim Papillarmuskel	60

Abb. 23: Originalaufzeichnung der Wirkung des Extraktes aus <i>Dianthus versicolor</i> auf die Kontraktionskraft des Papillarmuskels ...	61
Abb. 24: Graphische Darstellung der Konzentrations-Wirkungskurve des Extraktes aus <i>Dianthus versicolor</i> beim rechten Vorhof	63
Abb. 25: Originalaufzeichnung der Wirkung des Extraktes aus <i>Dianthus versicolor</i> auf die Schlagfrequenz des rechten Vorhofs	64
Abb. 26: Graphische Darstellung der Konzentrations-Wirkungskurve des Extraktes aus <i>Dianthus versicolor</i> bei der Aorta.....	67
Abb. 27: Originalaufzeichnung der Wirkung des Extraktes aus <i>Dianthus versicolor</i> auf die Kontraktionskraft der Aorta	68
Abb. 28: Graphische Darstellung der Konzentrations-Wirkungskurve des Extraktes aus <i>Dianthus versicolor</i> bei der Arteria pulmonalis.....	70
Abb. 29: Originalaufzeichnung der Wirkung des Extraktes aus <i>Dianthus versicolor</i> auf die Kontraktionskraft der Arteria pulmonalis .	71
Abb. 30: Graphische Darstellung der Konzentrations-Wirkungskurve des Extraktes aus <i>Dianthus versicolor</i> beim terminalen Ileum	74
Abb. 31: Originalaufzeichnung der Wirkung des Extraktes aus <i>Dianthus versicolor</i> auf die Kontraktionskraft des terminalen Ileums	75
Abb. 32: Wirkung eines Extraktes aus <i>Dianthus versicolor</i> auf die intrazelluläre Calcium-Konzentration	77
Abb. 33: Vergleich der untersuchten Organpräparate.....	80

Verzeichnis der Tabellen

Tabelle 1: Eigenschaften von <i>Dianthus versicolor</i> Fisch. in der TMM.....	12
Tabelle 2: Komponenten der physiologischen Nährlösung für rechten Vorhof, Papillarmuskel, Arteria pulmonalis, Aorta, terminales Ileum	24
Tabelle 3: Komponenten der physiologischen Nährlösung für den Uterus	24
Tabelle 4: Empirisch ermittelte Werte für die Vorspannung I	27
Tabelle 5: Empirisch ermittelte Werte für die Vorspannung II	31
Tabelle 6: Geräte	43
Tabelle 7: Reagenzien für die Zellisolierung	44
Tabelle 8: Wirkung des Extraktes aus <i>Dianthus versicolor</i> auf die Kontraktionskraft des isolierten Uterus.....	53
Tabelle 9: Wirkung des Extraktes aus <i>Dianthus versicolor</i> auf die Amplitudenfrequenz des isolierten Uterus.....	54
Tabelle 10: Wirkung des Extraktes aus <i>Dianthus versicolor</i> auf die Kontraktionskraft des isolierten Papillarmuskels	59
Tabelle 11: Wirkung des Extraktes aus <i>Dianthus versicolor</i> auf die Schlagfrequenz des isolierten rechten Vorhofs.....	62
Tabelle 12: Wirkung des Extraktes aus <i>Dianthus versicolor</i> auf die Kontraktionskraft der isolierten Aorta	66
Tabelle 13: Wirkung des Extraktes aus <i>Dianthus versicolor</i> auf die Kontraktionskraft der isolierten Arteria pulmonalis	69
Tabelle 14: Wirkung des Extraktes aus <i>Dianthus versicolor</i> auf die Kontraktionskraft des isolierten terminalen Ileums.....	73

Verzeichnis der Abkürzungen

Abb.	Abbildung
ARS	Agricultural Research Service
bzw.	beziehungsweise
ca.	zirka
Ca	Calcium
cm	Zentimeter
DMEM	Dulbecco's modified Eagle's Medium Nutrient Mixture F-12 HAM
DPBS	Dulbecco's Phosphat Buffered Saline ohne Ca, Mg
F	arithmetischer Mittelwert der Schlagfrequenz in Schläge/Minute
F_c	arithmetischer Mittelwert der gemessenen Kontraktionskraft
F_P	arithmetischer Mittelwert der Amplitude spontaner Kontraktionen in Peak/Minute
g	Gramm
Hz	Hertz
K	Kontrollphase
lt.	laut
mg	Milligramm
min	Minute
ml	Milliliter
mm/s	Millimeter/Sekunde
mN	Millinewton
mol/l	Mol pro Liter
ms	Millisekunde
mV	Millivolt
n	Anzahl der Versuche
N	normal
nm	Nanometer
n.s.	nicht signifikant
OWE	„Original- Wasser-Extrakt“ („Original water extract“)
PBS	Phosphat Buffered Saline

VIII

RSP	Ruhespannung
s	Sekunde
SEM	Standardfehler der Mittelwerte
TMM	Traditionelle Mongolische Medizin
U	Umdrehung
μ l	Mikroliter
μ M	Mikromol

1 Einleitung und Fragestellung

Das Department für Pharmakognosie der Universität Wien arbeitet seit 1998 mit der Health Sciences University of Mongolia bezüglich der Erforschung verschiedener mongolischer Arzneipflanzen, welche in der traditionellen mongolischen Medizin (TMM) verwendet werden, zusammen. Im Vordergrund steht die Analysierung der bioaktiven Zusammensetzung und des therapeutischen Effekts, sowie die botanische Identifizierung der mongolischen Pflanzen. Auch die in dieser Arbeit verwendete Droge *Dianthus versicolor* ist Bestandteil der wissenschaftlichen Versuchsdurchführungen.

Bei *Dianthus versicolor* handelt es sich um eine Steppenpflanze aus der Familie der *Caryophylloide*, welche in der mongolischen Volksmedizin in Form eines Tees zubereitet oder in gepulverter Form oral eingenommen wird. Dabei zeigt sich eine kontraktile Wirkung auf den Uterus. In Kombination mit anderen Pflanzenarten wird *Dianthus versicolor* bei Lebererkrankungen eingesetzt.

Da das Potential der in der TMM verwendeten Arzneipflanzen, zu denen auch *Dianthus versicolor* zählt, erst in den letzten Jahren erkannt wurde, sind wissenschaftliche Studien zu dieser Droge nur sehr spärlich vorhanden. Bezüglich der Kontraktilität des Uterus fanden bereits Voruntersuchungen am Department für Pharmakologie und Toxikologie statt. Diese Versuche zeigten, dass *Dianthus versicolor* die Kontraktilität des Uterus beeinflusst.

Ziel dieser Diplomarbeit war es nun, die Wirkung eines Extraktes aus der Droge *Dianthus versicolor* an isolierten Organpräparaten von Meerschweinchen, wie der Aorta, der Arteria pulmonalis, des Papillarmuskels, des spontan schlagenden rechten Vorhofs, des terminalen Ileums, aber auch des Uterus, zu untersuchen. Erforscht wurde die Reaktion der Droge *Dianthus versicolor*, zubereitet nach der Original-Wasser-Extrakt-Methode, auf die Kontraktilität der

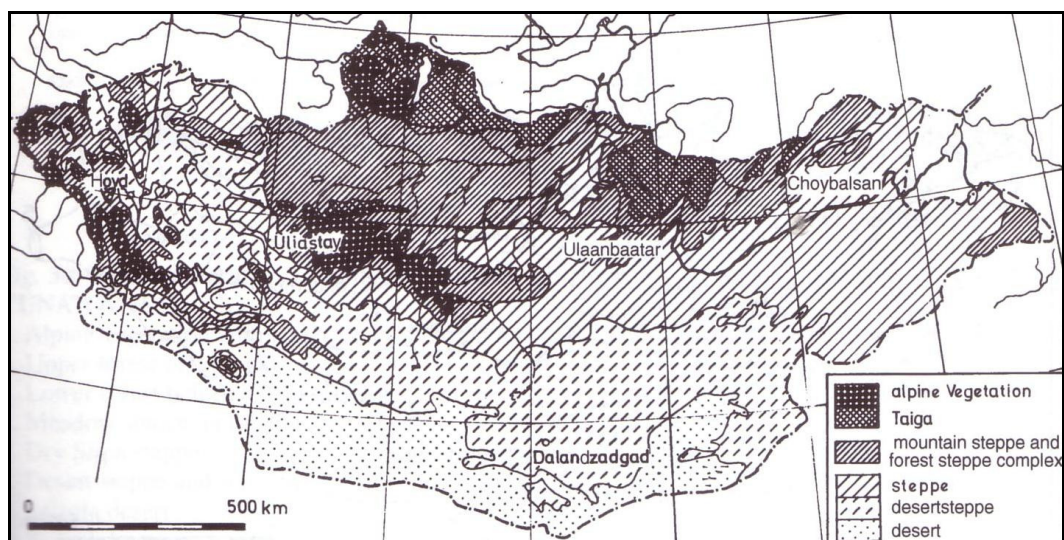
Organpräparate bzw. die Schlagfrequenz beim Vorhof. Dies wurde in Form von isometrischen Messungen durchgeführt.

Weiters wurde erforscht, wie sich der Extrakt aus *Dianthus versicolor* auf die isolierten Muskelzellen des Uterus und der Arteria pulmonalis von Meerschweinchen auswirkt. Da die Steigerung der intrazellulären Ca^{2+} -Konzentrationen für die Kontraktionsauslösung der glatten Muskulatur verantwortlich ist, wurde untersucht, ob *Dianthus versicolor* dies beeinflusst und folglich den Ca^{2+} -Einstrom ins Cytosol verstärkt oder hemmt.

2 Literaturübersicht

Die Mongolei liegt im nördlichen Teil von Zentralasien und grenzt nördlich an Russland (Zentralsibirien) sowie im Westen, Süden und Osten an China [HILBIG, 1995].

Abb. 1: Vegetationszonen der Mongolei



Quelle: HILBIG (1995)

Neun Millionen Mongolen leben in verschiedenen asiatischen Ländern, hauptsächlich bewohnen sie die Mongolei, China und Russland [KLETTER et al., 2008].

Die Flora des Himalayas und der angrenzenden Regionen ist eine der artenreichsten weltweit, jedoch sind die Aufzeichnungen, taxonomisch gesehen, überwiegend nur rudimentär vorhanden [KLETTER et al., 2008].

2.1 Traditionelle mongolische Medizin

Die traditionelle mongolische Medizin (TMM) repräsentiert eine asiatische medizinische Tradition, welche sehr vom tibetischen Buddhismus und folglich von der tibetischen Medizin beeinflusst wurde. In der Mongolei verbreitete sich die tibetische Medizin im 16. und 17. Jahrhundert. Die TMM beinhaltet auch einige Ansichten von anderen orientalischen Heilkunden wie die chinesische Medizin und Ayurveda. Das medizinische Wissen wurde lange Zeit, neben der mündlichen Weitergabe, nur in Form von tibetischen Schriften überliefert, das Tibetische wurde zur Medizinsprache. Nach und nach wurden viele tibetische Grundwerke wie das *rgyud bzhi* ins Mongolische übersetzt. Mongolische Heiler ergänzten die Werke laufend, brachten ihre eigenen Erfahrungen ein und passten sie der jeweiligen Region, aufgrund der unterschiedlichen Verfügbarkeit der Heilpflanzen, an. Folglich entstand die TMM als eigenständiges System, mit den tibetischen Schriften als Grundlage des medizinischen Wissens [KLETTER et al., 2008].

Eine wichtige Rolle im Gesundheitssystem spielten damals die Mönche. Sie wurden in den Klöstern bezüglich der traditionellen Medizin ausgebildet und wurden anschließend in der medizinischen Lehre und Versorgung von Patienten eingesetzt [KLETTER et al., 2008].

Die TMM florierte über Jahrhunderte in Regionen, welche von Mongolen bewohnt war. Erst im frühen 20. Jahrhundert, als der Kommunismus das Land beherrschte, wurde die westliche Medizin eingeführt und die TMM verboten. Jedoch lebte sie im Untergrund weiter und wurde von der Bevölkerung - vor allem bei chronischen Krankheiten – in Anspruch genommen. In den 60er Jahre wurde schrittweise begonnen, die traditionellen Heilmethoden in der Öffentlichkeit wiederzubeleben, doch erst seit Ende des letzten Jahrhunderts, nach dem Zusammenbruch der Sowjetunion, wurden alle Verbote bezüglich der TMM aufgehoben. Heute lehrt und praktiziert man sowohl die moderne

westliche als auch die traditionelle mongolische Medizin in der Mongolei [KLETTER et al., 2008].

Gemäß der traditionellen Medizin wird der menschliche Körper als eine Einheit gesehen. So steht das Wohlbefinden der gesamten Person im Vordergrund und nicht die Krankheit des Körpers. Im Gegensatz dazu, arbeitet die europäische Medizin behandlungsorientiert, sie beginnt mit der Krankheit und stellt die Behandlung in den Mittelpunkt [KLETTER et al., 2008].

Die TMM beruht auf drei lebensversorgenden Prinzipien, die im Mongolischen als *hii* (Atem), *šar* (Galle) und *badgan* (Schleim) bezeichnet werden. Sehr wichtig ist es, die Harmonie und die Balance dieser drei Körpersäfte durch Reinigungstechniken, Kräutermedizin und Lebensberatung auf einen Level zu halten. Eine Störung dieser drei Prinzipien resultiert in einer Krankheit. In der TMM werden Funktionsstörungen in kalt und heiß differenziert. Zur Diagnose einer Krankheit werden die Pulsdiagnose, die Untersuchung der Zunge, der Geruch, der Geschmack sowie die Farbe des Urins und die Befragung des Patienten über seine Lebensweise herangezogen. Überwiegend verwendet der traditionelle Mediziner die Pulsdiagnose, weil er damit den Typ der Krankheit - heiß oder kalt - und den Zustand der inneren Organe prüfen kann. Der Heiler muss anhand des Pulses differenzieren, ob es sich um eine spezifische Krankheit handelt oder ob der Patient gesund ist. Im Vordergrund der traditionellen Therapie einer Krankheit stehen eine Ernährungsumstellung und eine Änderung des Verhaltens im täglichen Leben. Weitere therapeutische Maßnahmen sind die medikamentöse Behandlung, Massagen, der Aderlass, Dampfbäder, das Trinken von Mineralwasser, die Akupunktur und die Behandlung mit Heilpflanzen [KLETTER et al., 2008].

Früher sammelte der traditionelle Heiler seine erforderlichen Pflanzen, Mineralien oder die tierischen Produkte, welche er für die Medikation benötigte, auf seinem eigenen Grundstück oder kaufte die fehlenden Drogen auf Märkten, manchmal auch an weit entfernten Orten. Die Arzneipflanzen wurden in Stücke

geschnitten und an geeigneten Plätzen getrocknet. Drogen mit einer kühlen Qualität wurden an windigen, schattigen Plätzen und Pflanzen mit einer warmen Qualität wurden an sonnigen Plätzen, die in der Nähe eines Feuers lagen, platziert [KLETTER und KRIECHBAUM, 2001; KLETTER et al., 2008].

Die Basisinformation über die Medikation und die Charakteristik zur Identifikation der Pflanzen, Mineralien oder der tierischen Produkte, wurde aus den traditionellen medizinischen Texten entnommen und beruhte auf verschiedenen mündlichen Überlieferungen. Die Folge war, dass unterschiedliche Inhaltsstoffe in ein und derselben Pflanze identifiziert wurden. Außerdem hat diese Entwicklung dazu geführt, dass ein mongolischer Pflanzennamen für mehrere Pflanzenarten stand und umgekehrt, dass verschiedene traditionelle Pflanzenbezeichnungen für nur eine Pflanze existierten, dies wird auch heute noch so praktiziert. Es wird jedoch kontinuierlich an der Aufarbeitung und Vereinheitlichung des Systems gearbeitet [KLETTER et al., 2008].

Heute werden in der Mongolei die benötigten Heilpflanzen von Einheimischen auf dem Land gesammelt oder sie werden von verschiedenen Märkten in und außerhalb der Mongolei zugekauft. Eine große Menge wird anschließend in großen Zentren der traditionellen Medizin sowie von mongolischen Firmen nach modernen Produktionsmethoden zubereitet. Die Erzeugnisse werden innerhalb des Landes verkauft oder exportiert. Die Drogen werden auf ihre Identität, auf ihre Wirksamkeit und auf die Sicherheit geprüft, wobei aber bis heute die organoleptische Untersuchung im Vordergrund steht – die westlichen Standards sind somit noch nicht erfüllt [KLETTER et al., 2008].

Bei einer Pilotuntersuchung in Darkan, der zweitgrößten Stadt in der Mongolei, wurden 90 Personen interviewt, wie häufig sie die TMM und/oder die westliche Medizin in Anspruch nehmen. Auch wurden sie nach den Beweggründen für ihre Entscheidung befragt. Innerhalb eines Jahres besuchten 51 % der Befragten ausschließlich Ärzte, welche in der westlichen Medizin ausgebildet

wurden, 8 % traditionelle Mediziner und 38 % nahmen beide Typen in Anspruch. Nutzer und Nichtnutzer der TMM unterschieden sich nicht in Bezug auf Alter, Geschlecht, Beruf und städtischen oder ländlichen Wohnsitz. Die Art der Krankheit war entscheidend, für welche Behandlungsform sich der Patient entschied. Die TMM ist somit eine wichtige Komponente im mongolischen Gesundheitssystem, bedeutender als in der internationalen Literatur berichtet wird [BERNSTEIN et al., 2002].

Die TMM stellt eine ausgezeichnete Möglichkeit dar, mit der westlichen Medizin eine Symbiose aufzubauen, und folglich das westliche Medizinwissen zu erweitern bzw. zu ergänzen. Das Potential der in der TMM verwendeten Arzneipflanzen wurde bereits in den europäischen Ländern erkannt, auch wurde bereits mit der Analysierung der Systematik der mongolischen Flora begonnen, zu welcher auch die Droge *Dianthus versicolor* zählt.

2.2 *Dianthus versicolor*

2.2.1 Herkunft

Das Pflanzenmaterial, welches in dieser Arbeit untersucht wurde, stammte aus dem Hubsgul (auch Hövsgöl) aimag. Dieses Gebiet befindet sich im äußersten Norden der Mongolei und grenzt an Russland. Die Vegetationszonen des Hubsgul aimag bestehen aus Taiga, alpiner Landschaft sowie Wald- und Bergsteppen [HILBIG, 1995]. *Dianthus versicolor* bevorzugt trockene Böden und ist folglich eine typische Steppenpflanze.

Abb. 2: *Dianthus versicolor* Fisch. - die Steppenpflanze



Quelle: Kletter et al. (2008)

Abb. 3: Aufsamlungsgebiet in Hubsgul aimag



Quelle: mod. nach <http://www.globaldefence.net/karten/mongolei.jpg>,

Stand: 15.09.08

2.2.2 Systematik

Der Taxon *Dianthus versicolor* gehört zur Gattung *Dianthus*, sie ist ein typischer Vertreter der Familie der *Caryophyllaceae* (Nelkengewächse) und ist Mitglied der Unterfamilie der *Caryophylloideae* und des Tribus *Caryophylleae*. Der Name wurde am 12. Jänner 2004 von ARS (Agricultural Research Service) Systematic Botanists verifiziert [USDA, Stand: 28.10.2008].

Der Gattungsname *Dianthus* setzt sich aus den griechischen Wörtern „dios“ (= Zeus) und „anthos“ (= Blüte) zusammen. Dies bedeutet soviel wie „Blume des Zeus“ [BÖHMIG und CHROBOK, 1963].

2.2.3 Morphologischer Aufbau

Bei der Droge *Dianthus versicolor* handelt es sich um eine kurzstengelige Steppen-Nelke mit ungestielten, lanzettlichen, ganzradigen Blättern - die Blattstellung ist gegenständig. Der Blütenstand setzt sich aus rosa gefärbten Kronblättern und fünf bräunlichen Nektarien an der Basis der Staubblätter zusammen.

Abb. 4: *Dianthus versicolor* Fisch.



Quelle: Frau Ass. Prof. Mag. Dr. Christa Kletter

2.2.4 Verwendung in der traditionellen mongolischen Medizin

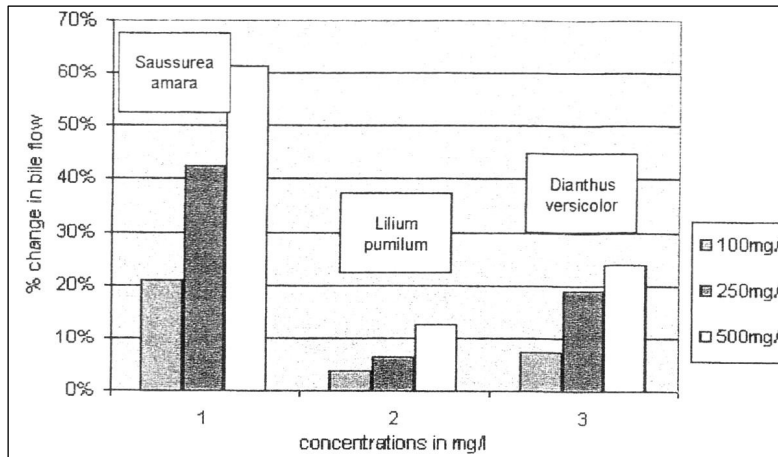
In der TMM werden nur die oberirdischen Anteile der Droge *Dianthus versicolor* eingesetzt. Die Pflanzenteile werden entweder in Form eines Tees zubereitet (Heißauszug) oder sie werden pulverisiert. Die gepulverte Droge wird oral eingenommen, anschließend wird reichlich Wasser nachgetrunken.

Die Herstellung des Tees erfolgt lt. einer Rezeptur aus einer Apotheke aus Ulaanbaatar, der Hauptstadt der Mongolei, folgendermaßen: Zu 10 - 15 g des Krautes von *Dianthus versicolor* werden 250 ml Wasser zugefügt, dies wird 15 Minuten gekocht, anschließend extrahiert und danach filtriert. Man sollte 2 - 3 mal täglich, je 100 ml dieses Extraktes trinken. Diese Form der Zubereitung hat im Körper folgende Wirkungen zur Folge: Kontraktionen des Uterus, Entzündungshemmung, Ablösung der restlichen Plazenta nach der Geburt und Lochimetra. In der Volksmedizin wird die Einnahme von *Dianthus versicolor* als Einzelkomponente, meistens niedrig dosiert, in der Human- sowie in der Veterinärmedizin verwendet.

Jedoch wird *Dianthus versicolor* selten als Einzelkomponente eingesetzt, häufiger kommt es zur Anwendung von Mischungen verschiedener Pflanzengattungen. Diese Pflanzenmischungen kommen vor allem bei verschiedenen Lebererkrankungen zum Einsatz [OBMANN et al., 2007].

Um als Lebertherapeutikum eingesetzt werden zu können, soll eine Arzneipflanze eine möglichst hohe choleretische Wirkung aufweisen und die Droge darf nicht zytotoxisch wirken. Es wurden die vier Pflanzen *Dianthus versicolor*, *Saussurea amara*, *Lilium pumilum* und *Gentiana barbata* getestet, jede wäre zum Einsatz als Lebermittel geeignet, wobei *Saussurea amara* die höchste choleretische Wirkung im Leberperfusionstest zeigte, die zweite Stelle nahm *Dianthus versicolor* ein [MAYR, 2006].

Abb. 5: Zunahme des Gallenflusses bei Testung der Wasserextrakte von *Saussurea amara*, *Lilium pumilum*, *Dianthus versicolor* im Leberperfusionsmodell



Quelle: Mayr (2006)

Der Pflanze *Dianthus versicolor* werden in der TMM bestimmte Qualitäten, wie in Tabelle 1 angeführt, zugeteilt. Diese beeinflussen die drei lebensversorgenden Prinzipien im Körper, wie bereits in Kapitel 2.1 beschrieben [KLETTER et al., 2008].

Tabelle 1: Eigenschaften von *Dianthus versicolor* Fisch. in der TMM

Geschmack	bitter
Natur - Eigenschaft	kühlend
Spezifische Qualität	kalt
Sekundärqualität	rau, stumpf, leicht

Quelle: mod. nach [KLETTER et al., 2008]

In der Regel werden in der TMM „heiße“ Krankheiten mit Arzneimitteln, welche eine kühlende Eigenschaft aufweisen, behandelt. Umgekehrt verlangen „kalte“ Krankheiten nach wärmenden Medikamenten [KLETTER et al., 2008].

2.2.5 Inhaltsstoffe

Da das Potential der in der TMM verwendeten Arzneipflanzen zu denen auch *Dianthus versicolor* zählt, erst in den letzten Jahren erkannt und mit deren intensiver Untersuchung erst danach begonnen wurde, sind wissenschaftlich dokumentierte Informationen über *Dianthus versicolor* und deren Inhaltsstoffe nur sehr spärlich vorhanden.

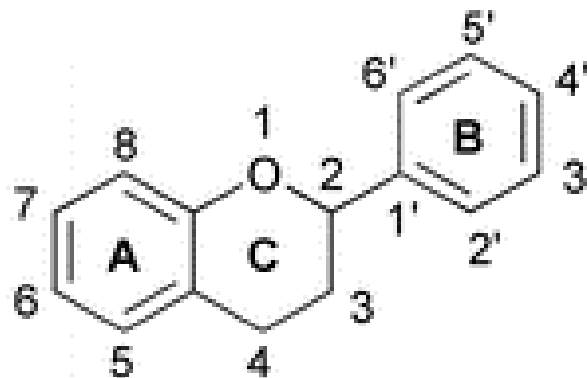
Flavonoide sind eine Gruppe von Stoffwechselprodukten der Pflanzen, diese aus der Droge *Dianthus versicolor* isoliert wurden. Sie sind phenolische Substanzen und sind die am häufigsten vorkommenden sekundären Pflanzeninhaltsstoffe der höheren Pflanzen. Innerhalb der Gruppe der Polyphenole stellen sie eine große Strukturvielfalt dar, ca. 8000 Verbindungen sind bekannt, jedoch sind sie in folgende Untergruppen eingeteilt: Flavonole, Flavanole, Flavanone, Flavone, Anthocyane und Isoflavonoide [PIETTA, 2000].

Der Name der Flavonoide leitet sich vom lateinischen Wort *flavus* ab, was gelb bedeutet. Die meisten dieser Substanzen kommen in den Pflanzen nicht frei, sondern als Glykoside vor. Sie weisen Farbtöne von blau, dunkelrot, orange und gelb auf. Diese Farben sind in den Blättern, den Blüten und den Früchten enthalten. Außer in Früchten und Gemüse kommen Flavonoide noch in Samen, Nüssen, Getreide und Gewürzen sowie in Wein, Tee und in geringen Mengen in Bier vor [PIETTA, 2000].

In Arzneipflanzen liegen Flavonoide entweder als Haupt- oder als Nebenwirkstoff vor. Besonders bei Arzneidroge, deren Wirksubstanz oft noch unbekannt ist, kann durch Standardisierung der enthaltenen Flavonoide eine Qualitätssicherung durchgeführt werden.

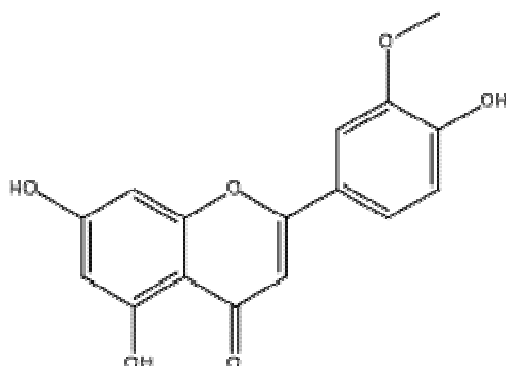
Flavonoide werden in Pflanzen aus aromatischen Aminosäuren wie Phenylalanin und Tyrosin sowie Malonaten gebildet. Das Grundgerüst ist der Flavan-Kern, welcher 15 C-Atome, aufgeteilt in 3 Ringe (A, B, C), besitzt [PIETTA, 2000].

Abb. 6: Grundgerüst der Flavonoide



Bei einer Publikation aus dem Jahre 1983 wurde das Flavonoid Chrysoeriol aus den oberirdischen Teilen der Pflanze *Dianthus versicolor* isoliert. Dabei handelt es sich um ein 6-C-Glycosid, das früher in der Literatur nur unter dem Namen Isoscoparin beschrieben wurde, erstmals wurde es in den Pflanzen der Familie der *Caryophyllaceae* entdeckt [BOGUSLAVSKAYA et al., 1983].

Abb. 7: Strukturformel von Chrysoeriol



Chemische Namen:

Chrysoeriol

3'-Methoxy-4',5,7-trihydroxyflavon

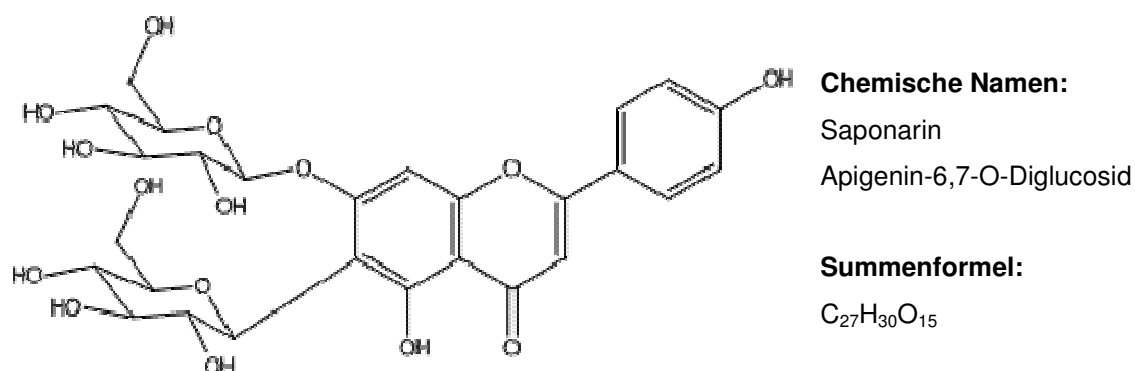
5,7,4'-Trihydroxy-3'-methoxyflavon

Summenformel:

$C_{16}H_{12}O_6$

Bei einer weiteren Studie, welche am Department für Pharmakognosie der Universität Wien 2007 durchgeführt wurde, isolierte man aus einem wässrigen Extrakt (OWE) (siehe Kapitel 3.8.2) aus *Dianthus versicolor* das Flavonoid Apigenin-6,7-O-Diglucosid (Saponarin). Dabei beobachtete man auch, dass dieses Flavonoid zum Anstieg des Gallenflusses in der isolierten Rattenleber führte (siehe Abb. 5) [OBMANN et al., 2007].

Abb. 8: Strukturformel von Saponarin



C-Glycosyl-Flavonoide besitzen folgende biologischen Eigenschaften:

- antioxidative Wirkung
- antibakterielle Wirkung
- antinociceptive Wirkung
- antispasmodische Wirkung: *Arum palastinum* beinhaltet die Flavonoide Isoorientin und Vitexin. Isoorientin führt in Konzentrationen von 10^{-7} bis 6×10^{-4} zu einer Abnahme der Häufigkeit und der Amplituden bei der Kontraktion vom isolierten Uterus bei Ratten und Meerschweinchen.
- sedative Wirkung
- antihepatotoxische Wirkung
- antiinflammatorische Wirkung
- antidiabetische Wirkung
- antihypersensitive Wirkung [JAY, 2006]

3 Material und Methoden

3.1 Versuchstiere

Für diese Diplomarbeit wurden die Versuche an verschiedenen isolierten Organen männlicher und weiblicher Meerschweinchen durchgeführt. Dabei verwendete man folgende Präparate: Uterus, Arteria pulmonalis, Papillarmuskel, rechter Vorhof, Aorta und terminales Ileum.

Das durchschnittliche Körpergewicht der Meerschweinchen betrug zwischen 300 und 600 g. Die Tiere stammten aus dem Forschungsinstitut für Versuchstierzucht und –haltung in Himberg (Niederösterreich), wobei die Züchtungsverfahren, Inzucht wie Auszucht, angewendet wurden. Diese hatten jedoch keinerlei Auswirkung auf die Versuchsreihen.

Meerschweinchen wurden als Versuchstiere gewählt, da sie in der Charakteristik der Ionenkanäle und des Hormonprofils dem Menschen sehr ähnlich sind, außerdem reagiert der Uterus sehr sensibel bei Kontraktionen.

Die Tiere wurden am Tag vor der Verwendung für alle Versuche, wenn möglich, nüchtern gehalten, um einen konstanten Tonus der glatten Muskulatur am terminalen Ileum im Ruhezustand zu gewährleisten. Die Tötung der Tiere erfolgte durch einen gezielten Genickschlag, der einen schnellen und schmerzlosen Tod verursachte.

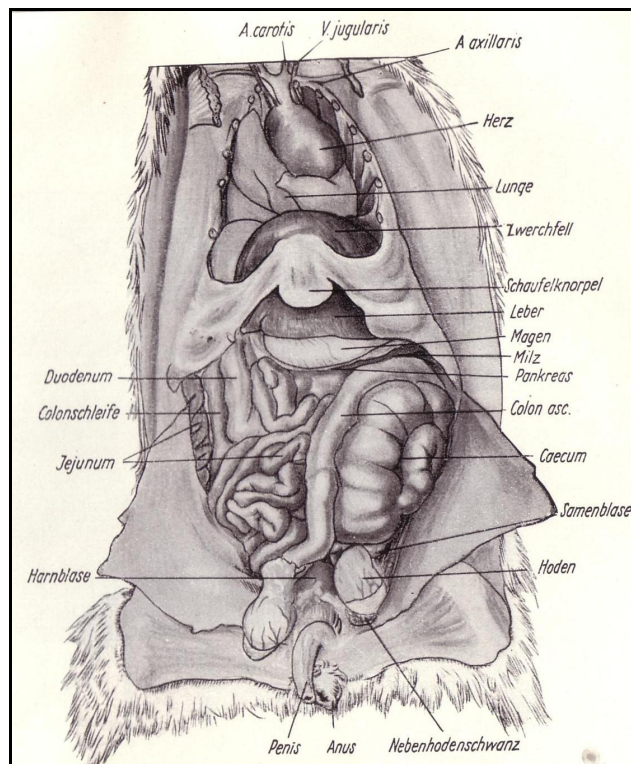
3.2 Isolierung der Präparate

Anschließend sind die Isolierungs- und Präparationsmethoden der verschiedenen Meerschweinchenorgane beschrieben. Unmittelbar nach der Entnahme der benötigten Organe wurden diese in einer physiologischen Nährlösung, die mit Oxymix (95% O₂, 5% CO₂) perfundiert wurde, aufbewahrt. Die Inhaltsstoffe der Nährlösung des Uterus unterschieden sich von jener, die für die restlichen Organe verwendet wurde. Die genaue Zusammensetzung dieser physiologischen Nährlösungen sind in Kapitel 3.3 ersichtlich.

Der Präpariervorgang erfolgte, aufgrund der geringen Größe der Meerschweinchenorgane, mittels Lichtmikroskop (Nikon SMZ-10A, Japan). In einer mit einer Korkplatte ausgelegten Petrischale war es möglich die Organe mit Nadeln zu fixieren. Darin befand sich begaste physiologische Nährlösung. Als Hilfsmittel zur Präparation wurden Präpariernadeln, eine Pinzette, eine Schere sowie eine Federschere verwendet. Die präparierten Organe wurden bis zur weiteren Verwendung in einem Becherglas, befüllt mit Nährlösung und perfundiert mit Oxymix, aufbewahrt.

Abb. 9: Utensilien für den Präparationsvorgang der isolierten Organe



Abb. 10: Brust-, Bauchhöhlensitus eines männlichen Meerschweinchens

Quelle: HOFFMANN (1956)

3.2.1 Herz und Arteria pulmonalis

Direkt nach der Tötung wurde der Thorax des Meerschweinchens mit Hilfe einer Schere geöffnet und das Herz und die Arteria pulmonalis rasch entnommen, um einen möglichen Sauerstoffmangel zu verhindern. Sofort wurde das Organ in die unter Kapitel 3.3 beschriebene Nährlösung gegeben. Diese Methode verhinderte Hypoxie und Blutkoagulation.

Danach wurde das Herz, in der in einem Becherglas befindlichen Nährlösung, mehrmals komprimiert. Folglich wurde das gesamte Organ von Blut gereinigt und gleichmäßig mit Nährlösung benetzt. Anschließend erfolgte die Präparation des Herzens. Dabei wurde das isolierte Herz mit Hilfe einer Federschere von anhaftenden Lungenteilen, dem Perikard, dem Fettgewebe und den Gefäßen befreit. Während dieses Vorgangs befanden sich alle Herzteile in der

kontinuierlich mit Oxy mix begasten Nährlösung, um eine ausreichende Versorgung mit Sauerstoff zu gewährleisten. Das zirka 2 cm große Herz wurde an zwei gegenüberliegenden Stellen, mit je einer Präpariernadel fixiert.

3.2.1.1 Isolierung und Präparation des rechten Vorhofs

Der rechte Vorhof wurde entlang des Sulcus coronarius von den Ventrikeln getrennt. Dabei musste besonders vorsichtig gearbeitet werden, um den Sinusknoten, der in der rechten Vorhofwand in der Nähe der Einmündung der Vena cava superior lokalisiert ist, nicht zu verletzen. Zwischen rechtem und linkem Vorhof konnte aufgrund der Lage und der Spontanaktivität des Sinusknotens unterschieden werden. Anschließend fixierte man das Präparat mit zwei Stecknadeln. Damit der Vorhof in die Apparatur eingespannt werden konnte, wurde am rechten Herzohr, dem Übergang zum linken Atrium, und am gegenüberliegenden Fettgewebe ein Silberdrahthäkchen mittels eines Fadens befestigt und der rechte Vorhof vom übrigen Herzen abgetrennt. Um ein Ausreißen des Häkchens im Laufe des Versuches aufgrund der starken Zugbelastung zu unterbinden, wurde es mit einem Faden unter Durchführung eines Doppelknotens fixiert. Wichtig war auch, während des Präparationsvorganges den Vorhof nicht zu sehr zu dehnen, um die Muskulatur nicht zu irritieren.

3.2.1.2 Isolierung und Präparation der Papillarmuskeln

Nach Abtrennung des Vorhofs wurde der rechte Ventrikel von der Arteria pulmonalis entlang des Septums bis zur Herzspitze aufgeschnitten und aufgeklappt, um zu den Papillarmuskeln zu gelangen. Die Purkinje-Fasern, die über Herzschrittmacheraktivität verfügen, mussten entfernt werden, da sie aufgrund der Spontanaktivität den Versuchsablauf beeinflussen hätten können. Am Ansatz der Papillarmuskelsehne wurde mit einem Faden wieder ein Silberdrahthäkchen angebracht, die Sehne des Muskels durchtrennt und der Muskel vorsichtig entnommen.

Überwiegend wurden Papillarmuskeln aus der rechten Herzkammer bis zu einem Durchmesser von 0,87 mm verwendet. Diese sind unter Normalbedingungen dünner entwickelt als jene der linken Herzkammer und gewährleisten eine ausreichende Versorgung mit Sauerstoff [KOCH-WESER, 1963]. Die Papillarmuskeln des linken Ventrikels weisen einen größeren Durchmesser auf, deshalb konnten diese nicht verwendet werden.

3.2.1.3 Isolierung und Präparation der *Arteria pulmonalis*

Die Arteria pulmonalis wurde so nahe wie möglich beim Herzen entnommen. Man verwendete das direkt vom Herzen wegführende 5-10 mm lange Stück. Dieses wurde mit Präpariernadeln fixiert, das von außen anhaftende Muskel- und Fettgewebe wurde entfernt und in ringförmige Stücke mit einer Länge von 2-3 mm geschnitten, die man danach direkt in die Versuchsanordnung einspannen konnte.

3.2.2 Uterus

Nach Entnahme des Herzens wurde der Bauchraum weiter geöffnet. Nun wurden, sofern es sich um weibliche Meerschweinchen handelte, beide Uterushörner mittels Schere und Pinzette entnommen. Vom y-förmigen Uterus wurde vom Horn ein zirka 1 cm großes Stück leicht schräg abgetrennt und mit Präpariernadeln fixiert. Danach wurde an den Enden jeweils ein Silberdrahhäkchen mit Hilfe eines Fadens mittels Doppelknoten befestigt, jedoch musste das Häkchen, aufgrund der starken Eigenkontraktion des Uterus, durch das Organ gestochen werden. Es war darauf zu achten, dass das Lumen des Uterus an beiden Enden offen blieb, um ein Durchströmen der Substanz zu gewährleisten.

3.2.3 Terminales Ileum

Als nächstes wurde ein Teil des terminalen Ileums herausgeschnitten. Es wurde jenes Stück entnommen, welches vor dem Caecum liegt, dies ist der Übergang des Dünndarms in den Dickdarm. Man entnahm zirka 20 cm des Dünndarms in Richtung Magen. Bei diesem Schritt musste darauf geachtet werden, dass es zu keiner Beschädigung durch zu starken Druck oder Zug kam. Mit einem Bindefaden kennzeichnete man das dem Jejunum zugewandte Ende, um einer Verwechslung der beiden Enden des Darmstücks entgegenzuwirken. Die vor dem Caecum liegenden Peyerschen Plaques wurden entsorgt.

Für die Präparation des Ileums wurden ca. 1-2 cm lange Stücke schräg abgeschnitten und mittels Präpariernadeln befestigt. Der Schrägschnitt ermöglichte ein einfacheres Einspannen in die Darmhalterung bei der Versuchsdurchführung. War das Darmstück mit Chymusresten befüllt, wurde es mit einer Pasteurpipette, gefüllt mit physiologischer Nährlösung, vom jejunalen zum caecalen Ende sorgfältig durchspült. Hierbei war darauf zu achten, den Ileumteil weder zu verletzen noch zu überdehnen. Danach entfernte man mit einer Federschere das am Darm anhaftende Mesenterium sowie das Fettgewebe. Zur Befestigung des Darmstückes an der Versuchsanordnung wurde an jedem Darmende ein Silberdrahthäkchen mittels eines Fadens durch einen Doppelknoten fixiert. Dabei wurde das obere Ende mit einem roten und das untere Ende mit einem schwarzen Faden gekennzeichnet, um eine Verwechslung der Darmenden zu verhindern. Es war sehr wichtig, dass das Ileumstück beidseitig geöffnet blieb, um ein Durchströmen der Substanz zu gewährleisten und folglich ein verbessertes Einwirken der Lösung auf die Darminnenseite zu ermöglichen.

3.2.4 Aorta

Zuletzt wurde ein 2-3 cm langes Stück der thorakalen Aorta isoliert. Aus diesem Grund wurde der Brustkorb noch weiter geöffnet, dabei wurden die Rippen durchtrennt. Folglich war es möglich, das Brustbein mit den Teilen der Rippen wegzuklappen. Um leichteren Zugang zur Aorta zu erlangen, wurde die davor liegende Lunge entfernt. Mittels Schere und Pinzette schnitt man die Aorta entlang des Rückgrats heraus. Anschließend wurde diese mit zwei Präpariernadeln fixiert und mit der Federschere entfernte man das umgebene Muskel- und Fettgewebe. Daraufhin schnitt man die Aorta in 2-3 mm große Ringe, wichtig war dabei, die Aorta nicht zu sehr zu dehnen. Diese Stücke wurden auch direkt in die Versuchsanordnung eingespannt, jedoch musste man darauf achten das Endothel nicht zu verletzen.

Abb. 11: Präparation der Aorta



3.3 Physiologische Elektrolytlösung (Nährlösung)

An jedem Versuchstag wurde eine physiologische Nährlösung mit Hilfe von bereits bereitgestellten Stocklösungen frisch hergestellt. Es handelte sich dabei um eine modifizierte Krebs-Henseleit-Lösung unter der Vorschrift von REITER (1967). Die Zusammensetzung der Nährlösung vom rechten Vorhof, des Papillarmuskels, der Arteria pulmonalis, der Aorta und des terminalen Ileums (siehe Tabelle 2) unterschied sich von jener des Uterus (siehe Tabelle 3).

3.3.1 Herstellung der physiologischen Nährlösung: rechter Vorhof, Papillarmuskel, Arteria pulmonalis, Aorta, terminales Ileum

Zur Zubereitung der Elektrolytlösung wurden die Stocklösungen NaCl, KCl und NaHCO₃ mit einer Pürette in einen Messkolben der gewünschten Größe gefüllt. Die kleineren Mengen, MgSO₄ und KH₂PO₄, wurden mit einer Kolbenhubpipette in das Gefäß eingebracht, die Glucose wurde abgewogen und ebenfalls dazugefügt. Dies wurde mit Aqua bidestillata auf zirka $\frac{3}{4}$ des Volumens aufgefüllt und 20 Minuten mit Oxymix (Mischung aus 95% O₂ und 5% CO₂) begast. Um eine Ausfällung des schwerlöslichen Calciumsalzes zu verhindern, erfolgte die Zugabe von CaCl₂ nach der Begasung mit Oxymix. Schließlich wurde die Lösung mit Aqua bidestillata bis zum Meniskus aufgefüllt und kräftig durchgeschüttelt.

Die physiologische Nährlösung wurde während des gesamten Versuchsablaufes mit Oxymix begast, damit die isolierten Organe ausreichend mit Sauerstoff versorgt werden konnten und um einen konstanten pH-Wert im physiologischen Bereich (7,2 bis 7,4) zu gewährleisten.

Tabelle 2: Komponenten der physiologischen Nährlösung für rechten Vorhof, Papillarmuskel, Arteria pulmonalis, Aorta, terminales Ileum

Komponenten	Stocklösung	Stocklösung/l Tyrode	mmol/l
NaCl	1000,25 g/5 l	33,60 ml	114,90
KCl	50,33 g/5 l	35,00 ml	4,73
NaHCO ₃	125,00 g/5 l	83,70 ml	24,90
CaCl ₂	147,02 g/5 l	3,20 ml	3,29
MgSO ₄	62,00 g/250 ml	1,18 ml	1,18
KH ₂ PO ₄	34,00 g/250 ml	1,18 ml	1,18
Glucose	Reinsubstanz	1,98 g	10,00

3.3.2 Herstellung der physiologischen Nährlösung: Uterus

Die Herstellung der Nährlösung für den Uterus unterschied sich in der Zusammensetzung zu jener der anderen untersuchten Organe. Die Komponenten dieser Elektrolytlösung sind in Tabelle 3 angeführt und sie wurde wie im Kapitel 3.3.1 beschrieben, hergestellt. Für die Durchperlung der Lösung mit Oxymix waren zirka fünf Minuten ausreichend.

Tabelle 3: Komponenten der physiologische Nährlösung für den Uterus

Komponenten	Stocklösung	Stocklösung/l Tyrode	mmol/l
NaCl	1000,25 g/5 l	45,03 ml	154,00
KCl	50,33 g/5 l	41,44 ml	5,60
NaHCO ₃	125,00 g/5 l	3,36 ml	5,95
CaCl ₂	147,02 g/5 l	0,40 ml	2,50
Glucose	Reinsubstanz	0,50 g	0,40

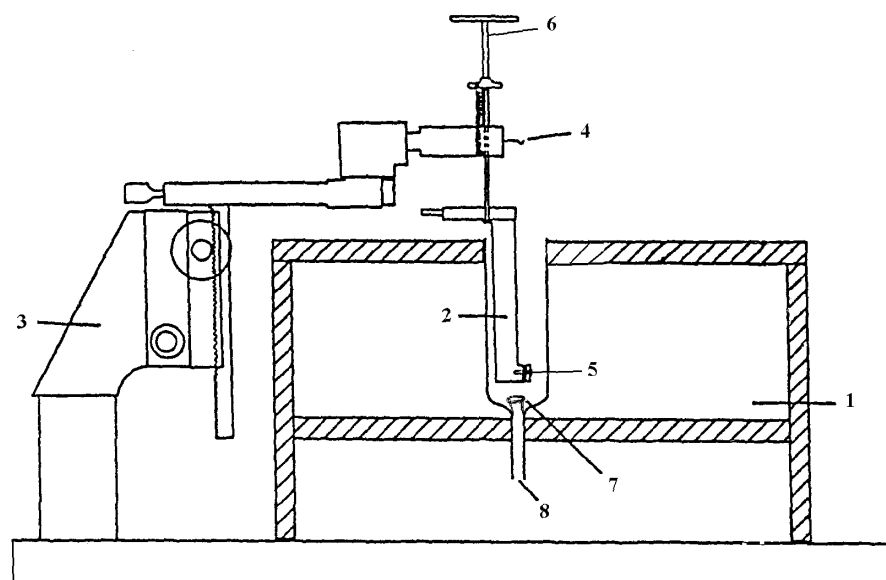
3.4 Kontraktionskraftmessung an isolierten Organen

3.4.1 Versuchsapparatur

Nachfolgend eine Erläuterung der Versuchsaapparaturen, welche für die Versuchsreihen der Organpräparate dieser Diplomarbeit verwendet wurden.

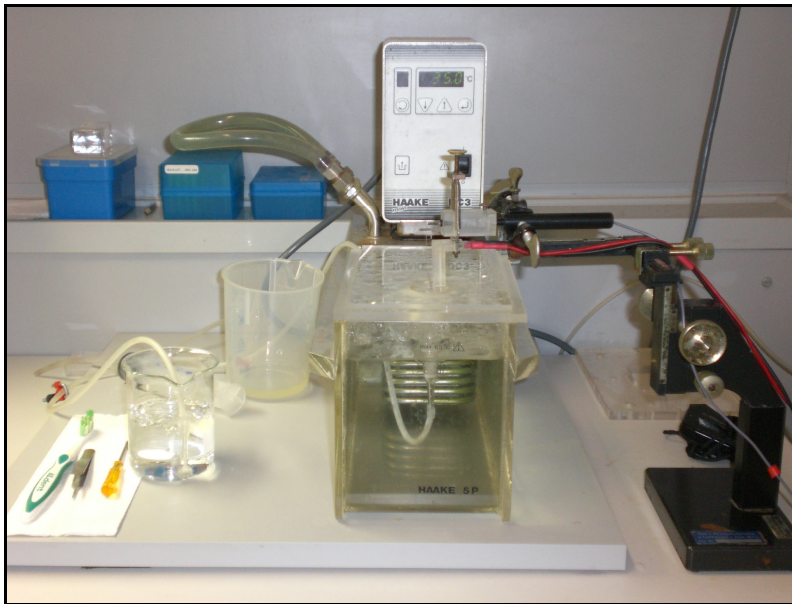
3.4.1.1 Versuchsaapparatur für Papillarmuskeln bzw. Vorhöfe

Abb. 12: Schematische Darstellung der Versuchsaapparatur



Legende zu Abb. 12

- 1 Wasserbad
- 2 Organhalterung
- 3 Stativ
- 4 Aufhängevorrichtung für Präparate, Kraftwandler
- 5 Fixierung, Reizelektroden
- 6 Feintrieb zum Vorspannen
- 7 Muskelkammer
- 8 Gaszufuhr, Glasfritte, Abfluss

Abb. 13: Originalabbildung der Versuchsanordnung

Die Versuchsanordnung, die in Abbildung 12 schematisch und in Abbildung 13 dargestellt ist, wurde zur isometrischen Messung der Kontraktionskraft elektrisch gereizter Papillarmuskeln sowie der Frequenz spontan schlagender Vorhöfe eingesetzt.

Wichtig für die Versuchsdurchführung war, dass die physiologischen Bedingungen aufrecht erhalten wurden. Daher beinhaltete die Apparatur ein Wasserbad (1), welches mittels Thermostat – das mit einem Heizgerät verbunden war – die Temperaturen konstant auf $35 \pm 1 \text{ }^{\circ}\text{C}$ (bei Herzpräparaten) gehalten hat. Die modifizierte Krebs-Henseleit-Lösung wurde in ein rundes Gefäß, die Muskelkammer (7), gefüllt. Dieses Organbad wurde in das beheizte Wasserbad getaucht. Während der gesamten Versuchsdurchführung wurde das Gefäß über eine Gaszufuhr (8) mit Hilfe einer Glasfritte (8) mit Oxymix begast. So konnte die Lösung in der Muskelkammer ausreichend mit Sauerstoff versorgt werden und der physiologische pH-Wert konnte aufrecht erhalten werden. Die Zufuhr von Oxymix wurde so reguliert, dass es nicht zum Herausspritzen der physiologischen Nährlösung kam, jedoch auch kein Sauerstoffmangel auftrat. Geringe Volumensverluste, die durch Verdunstung

von Wasser erklärbar waren, wurden mit physiologischer Nährlösung vorsichtig ergänzt. Der Wechsel der Lösung erfolgte händisch mit einer Kunststoffspritze mit befestigtem Gummischlauch.

Das an der Oberseite mit einem Silberdrahthäkchen befestigte Präparat wurde auf die Aufhängevorrichtung (4) – Silberdraht – gehängt. Dieser Draht diente als Verbindung zum Kraftwandler (4). Das untere freie Ende wurde zwischen zwei Plexiglasstückchen in die Muskelhalterung (5) eingeklemmt, sodass es auf der Platin-Kathode auflag. Wichtig war, dass es zu keiner Überdehnung kam, und dass die Befestigung des Präparates rasch durchgeführt wurde, um keine Unterversorgung der Organe zu riskieren. Nun wurde die Organhalterung mit dem am Stativ (3) beweglichen Stativschlitten in das Organbad abgesenkt, bis das Präparat komplett mit Nährlösung umspült war.

Zur Entwicklung der maximalen Kontraktionskraft wurde mit Hilfe des Feintriebs (6) die notwendige Vorspannung eingestellt, welche sich abhängig vom Organ unterschied und empirisch fixiert wurde.

Tabelle 4: Empirisch ermittelte Werte für die Vorspannung I

Organ	Vorspannung (mN)
Rechter Vorhof	10,4
Papillarmuskel	3,9

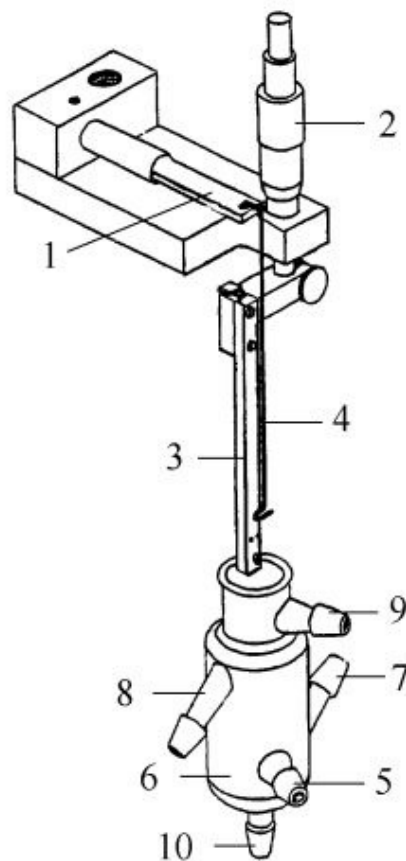
Um die isometrische Kontraktion auch messen zu können, benötigte man einen Kraftwandler und einen Verstärker der Marke Transbridge TM 4-Channel Transducer Amplifier der Firma World Precision Instruments (Sarasota, FL, USA) (Abb. 14). Die Reizung der Papillarmuskeln erfolgte über ein A310 ACCUPULSERTM derselben Firma (Abb. 14). Die Aufzeichnung der Kontraktionsamplituden der Papillarmuskeln und die Schlagfrequenzen der rechten Vorhöfe erfolgte mit Hilfe des Schreibers der Marke Flatbed Recorder BD 112 der Firma Kipp & Zonen (Niederlande) (Abb. 14).

Abb. 14: Originalabbildung des Verstärkers inkl. Reizgerät und Schreiber



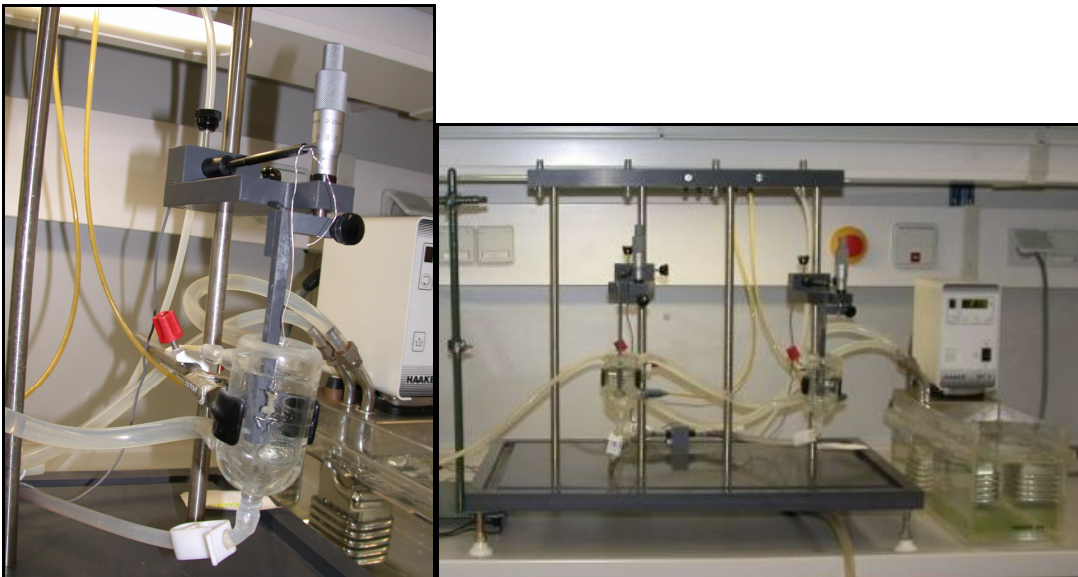
3.4.1.2 Versuchsanordnung für Aorta, Arteria Pulmonalis, terminales Ileum, Uterus, Vorhof

Abb. 15: Schematische Darstellung der Versuchsanordnung



Legende zu Abb. 15

1	Kraftwandler	6	Organbad
2	Feintrieb	7	Wasserzufuhr
3	Organhalter	8	Wasserablauf
4	Aufhängevorrichtung	9	Nährlösungszufluss
5	Gaszufuhr	10	Nahrungsablauf

Abb. 16: Originalabbildungen der Versuchsanordnung

Die Versuchsanordnung, die in Abbildung 15 schematisch und in Abbildung 16 dargestellt ist, wurde zur isometrischen Messung der Kontraktionskraft isolierter Stücke der Aorta, der Arteria pulmonalis, des Uterus und des terminalen Ileums sowie der Frequenz spontan schlagender Vorhöfe eingesetzt. Im Funktionsprinzip unterschied sich diese Apparatur nicht von jener in Kapitel 3.4.1.1 beschriebenen.

Da die physiologischen Bedingungen aufrecht erhalten werden mussten, beinhaltete diese Apparatur ein Wasserbad, welches mittels Thermostat – das mit einem Heizgerät verbunden war – die Temperaturen konstant auf $37 \pm 1 \text{ }^{\circ}\text{C}$ gehalten hat. Hier tauchte das Organbad (6) nicht direkt ins Wasserbad, sondern wurde in die Gefäßwand des Organbades über einen Zufluss (7) eingeleitet. Dieses Gefäß bestand aus zwei Glasschichten, in deren Zwischenraum sich das Wasserbad befand. Das Organbad wurde mit einer physiologischen Nährlösung – 25 ml bzw. 8 ml, abhängig von der Größe des Behälters – befüllt und mit Oxymix über eine Fritte (5) gleichmäßig durchperlt. Der Wechsel der Nährlösung erfolgte durch Öffnen der Kunststoffklemme an einem Abflussschlauch (10).

Die Präparate von Uterus, terminalem Ileum und Vorhof wurden mittels des bereits am Organ befestigten Silberdrahthäkchens am Silberdraht befestigt, der die Verbindung zum Kraftwandler (1) darstellte. Das am unteren Ende befestigte Häkchen wurde in einem an der Organhalterung (3) befestigten Draht eingespannt. Die Präparate von Aorta und Arteria pulmonalis wurden unmittelbar zwischen zwei Silberdrähten eingespannt. Der obere stellte die Verbindung zum Kraftwandler dar, und der untere war an der Organhalterung befestigt. Wichtig war, dass es zu keiner Überdehnung der Muskeln bzw. zu keiner Schädigung des Endothels kam, und dass die Befestigung des Präparates rasch durchgeführt wurde, um keine Unterversorgung der Organe zu riskieren. Die gesamte Versuchsanordnung war an einem Stativ befestigt. Mit dem Stativschlitten wurde die Organhalterung in das Organbad abgesenkt, bis das Präparat komplett mit Nährlösung umspült war. Mit einem Mikrometer (2) wurde die für die Versuche notwendige Vorspannung genau eingestellt.

Tabelle 5: Empirisch ermittelte Werte für die Vorspannung II

Organ	Vorspannung (mN)
Aorta	19,6
Arteria pulmonalis	9,81
Terminales Ileum	4,9
Uterus	4,9

Die Kontraktionskraft wurde mit dem Kraftwandler und dem Verstärker der Marke Transbridge TM 4-Channel Transducer Amplifier der Firma World Precision Instruments (Sarasota, FL, USA) (Abb. 17) gemessen. Die Versuchsergebnisse wurden mit dem Schreiber der Marke Flatbed Recorder BD 112 der Firma Kipp & Zonen (Niederlande) (Abb. 17) registriert.

Abb. 17: Originalabbildung des Verstärkers und des Schreibers

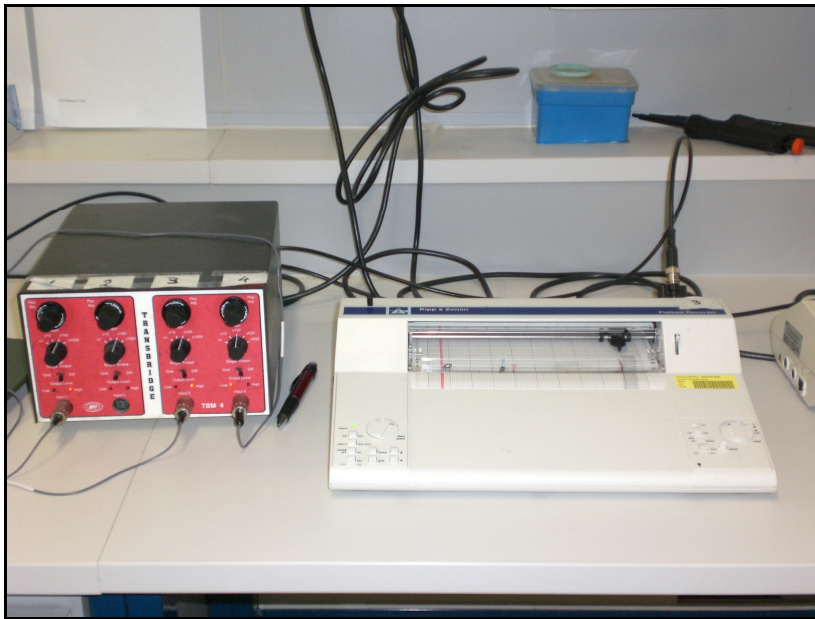
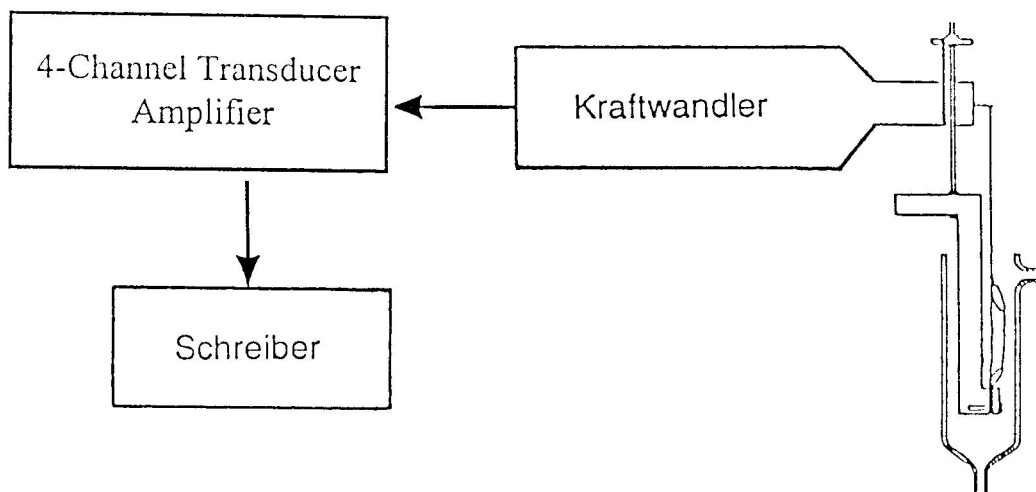


Abb. 18: Schematische Darstellung der Kraftmessung und Registrierung



Die Kontraktionskraft – ein mechanischer und nicht elektrischer Vorgang – wurde von einem Koppelglied erfasst und von einem Kraftwandler oder „Transducer“ in eine elektrische Größe umgewandelt. Ansonsten könnte die Kontraktionskraft nicht registriert werden.

Dazu verwendet wurde ein Widerstandswandler mit Dehnungsmessstreifen in Wheatstone'scher Brückenschaltung. Durch Dehnung wurde der elektrische Widerstand des Messstreifens verändert, folglich floss bei Krafteinwirkung ein Strom proportional den Dehnungskräften [THER, 1965]. Die durch Muskelkontraktion ausgelösten Signale wurden mit einem Amplifier verstärkt. Die Registrierung der Kontraktion erfolgte mit einem Schreiber, der die Amplituden bzw. Kurven aufzeichnete.

3.4.2 Versuchsablauf

Wie in Kapitel 3.4.1 beschrieben wurden die präparierten Organe in die Versuchssapparat eingespant. Zu beachten war, die Präparate nicht zu lange im trockenen und unbegasten Zustand zu belassen.

Die zu untersuchende Substanz wurde mit Hilfe einer Kolbenhubpipette wie folgt zugegeben: Gestartet wurde mit einer Menge des gelösten Extraktes (Konzentration im Durchschnitt von 501,09 mg/250 µl H₂O) von 10 µl, die dann durch weitere Zugabe auf 30 µl und 100 µl gesteigert wurde. Die Substanz sollte nahe am Organ, möglichst immer an der gleichen Stelle, ohne Berühren des Präparates bzw. des Kraftwandlers, eingespritzt werden.

Nach Beendigung der Aufzeichnung wurde bei allen Präparaten, außer beim Papillarmuskel und beim Vorhof, das Organbad ausgelassen und zwei Mal mit physiologischer Nährlösung gespült. Danach wurde das Organbad nochmals mit Nährlösung befüllt und eine weitere Registrierung von zehn Minuten folgte. Dieser Vorgang wurde als „auswaschen“ bezeichnet, dabei wurde beobachtet, ob die Substanzwirkung reversibel war.

3.4.2.1 Versuchspräparat rechter Vorhof

Nach Absenkung des Präparats in das Organbad wurde der Schreiber eingeschaltet und der Stift auf der Nulllinie fixiert. Danach wurde der Amplifier

aufgedreht und der Stift wiederum – nach Entsperren des Regelknopfes – auf die oben genannte Linie hinversetzt. Anschließend wurde eine Vorspannung von 10,4 mN vorgenommen. Gemessen wurde bei 5 mV – bei Bedarf auch bei 2 mV – und einer Geschwindigkeit („speed“) von 5 mm/s. Mittels Regulation des Feintriebes wurde während des Versuches die Vorspannung konstant erhalten.

Für ca. 20 Minuten wurde nun die spontane Schlagfrequenz des rechten Vorhofes beobachtet, daraufhin wurden die Kontrollwerte aufgezeichnet. In Abständen von 5 Minuten wurde eine Aufzeichnung der Schläge vorgenommen, die Schlagfrequenz wurde abgezählt und dokumentiert. Ein konstanter Wert entstand nach ca. 45 Minuten. Nach dieser Phase konnte mit der Zugabe der Testsubstanz begonnen werden, wobei die Konzentration im Muskelbad kumulativ erhöht wurde. Die Einwirkzeit pro Konzentrationsstufe betrug 20 Minuten, die Schlagfrequenz wurde alle 5 Minuten gemessen und auf Millimeterpapier auf einer Länge von 6 cm, dies entsprach 12 s, aufgezeichnet. Die Anzahl der Schläge wurde mit 5 multipliziert, das Ergebnis war die Schlagfrequenz pro Minute.

Zur Versuchsdurchführung des Vorhofes konnte sowohl die Versuchsaapparatur wie im Kapitel 3.4.1.1 als auch die Apparatur wie im Kapitel 3.4.1.2 beschrieben, verwendet werden.

3.4.2.2 Versuchspräparat Papillarmuskel

Nach Absenkung des Präparats in das Organbad wurde der Schreiber eingeschaltet und der Stift auf die Nulllinie gesetzt. Danach wurde der Amplifier aufgedreht und der Stift wiederum – nach Entsperren des Regelknopfes – auf die oben genannte Linie hinversetzt. Anschließend wurde eine Vorspannung von 3,9 mN bei 5 mV vorgenommen. Gemessen wurde bei 2 mV und einer Geschwindigkeit („speed“) von 5 mm/s.

Da der Papillarmuskel nicht spontan schlug – Purkinjefasern wurden entfernt – wurde er durch elektrische Reizung mit Hilfe eines Reizgerätes (siehe Kapitel 3.4.1.1) über Silber-Silberchloridelektroden kontrahiert. Im Laufe des Versuchs wurde immer wieder nachjustiert, um eine Abnahme der Kontraktionskraft durch Verringerung der Ausgangsspannung zu verhindern. Nach einer Anpassungszeit von ca. 10 Minuten wurde mit Rechteckimpulsen von 3 ms Dauer gereizt, die Frequenz lag bei 1 Hz. Die Reizstromstärke sollte bei 10 Prozent über der muskelabhängigen Reizschwelle liegen, damit in Sekundenabständen eine Kontraktion ausgelöst werden konnte. Darüber hätte eine Entleerung der Katecholaminspeicher stattfinden können. Während der gesamten Versuchsdauer sollte die Reizschwelle überprüft werden, um - wenn nötig – die Reizstromstärke anzupassen. Während einer darauffolgenden Kontrollphase von 45 Minuten, wurde in Abständen von fünf Minuten, fünf Amplituden der Kontraktion auf Millimeterpapier registriert und danach abgemessen – Ziel war es eine konstante Amplitudenhöhe zu erreichen. Danach konnte mit der kumulativen Substanzzugabe begonnen werden. 45 Minuten dauerte die Einwirkzeit einer Konzentration innerhalb derer, alle fünf Minuten fünf Amplituden aufgezeichnet und abgemessen wurden.

3.4.2.3 Versuchspräparate Aorta und Arteria pulmonalis

Nach Absenkung des Präparats Aorta in das Organbad wurde der Schreiber eingeschaltet und der Stift auf die Nulllinie gesetzt. Danach wurde der Amplifier aufgedreht und der Stift wiederum – nach Entsperren des Regelknopfes – auf die oben genannte Linie hinversetzt. Anschließend wurde bei 10 mV eine Vorspannung von 19,6 mN (2 g) vorgenommen, die für die maximale Kraftentwicklung der Aorta notwendig war. Daraufhin wurde der Stift wieder auf der Nulllinie positioniert. Gemessen wurde bei einer Geschwindigkeit („speed“) von 0,5 mm/s und 5 mV.

Nach einer Anpassungszeit von 20 Minuten, in dieser nicht aufgezeichnet wurde, jedoch mit Hilfe des Feintriebs immer wieder auf die definierte Nulllinie nachjustiert wurde, begann man mit der Aufzeichnung der Nulllinie, die – wenn nötig – nachgestellt wurde. Nach 15 Minuten wurde diese Kontrollphase beendet und es konnte mit der Substanzzugabe, beginnend mit der niedrigsten Menge, begonnen werden. Nach Erreichen eines „steady state“, der nach zirka 15 Minuten eintrat, erfolgte eine neuerliche Zugabe der Substanz in das Organbad. Nachdem die letzte Konzentrationszugabe erfolgte und aufgezeichnet wurde, entfernte man die substanzhaltige Badlösung, spülte zweimal mit der physiologischen Nährlösung und zeichnete anschließend das Ergebnis 10 Minuten am Schreiber auf. Dieser Vorgang wird als „auswaschen“ bezeichnet und dokumentiert, die Reversibilität der Substanzwirkung.

Die Versuchsdurchführung an der Arteria pulmonalis war analog zu jener an der Aorta. Einzige Abweichung war die Vorspannung, die hier 9,81 mN (1 g) betrug.

3.4.2.4 Versuchspräparat Uterus

Nach Absenkung des Präparats in das Organbad wurde der Schreiber eingeschaltet und der Stift auf die Nulllinie gesetzt. Danach wurde der Amplifier aufgedreht und der Stift wiederum – nach Entsperren des Regelknopfes – auf die oben genannte Linie hinversetzt. Anschließend wurde bei 10 mV eine Vorspannung von 4,9 mN vorgenommen, die für die maximale Kraftentwicklung des Uterus notwendig war. Daraufhin wurde der Stift wieder auf der Nulllinie positioniert. Gemessen wurde bei einer Geschwindigkeit („speed“) von 0,2 mm/s und 10 mV. Bei einer Aufzeichnung von zu großen Amplituden wurde auf 20 mV umgestellt.

Nach einer Anpassungszeit von ca. 30 Minuten begann die Aufzeichnung der Kontrollphase von 30 Minuten, dabei mussten sich Spontankontraktionen zeigen. Danach konnte mit der Substanzzugabe in Abständen von 30 Minuten begonnen werden. Nachdem die letzte Substanzzugabe erfolgte und

aufgezeichnet wurde, entfernte man die substanzhaltige Nährlösung, spülte zweimal mit der physiologischen Nährlösung und zeichnete anschließend das Ergebnis 10 Minuten am Schreiber auf. Dieser Vorgang wird als „auswaschen“ bezeichnet und dokumentiert, ob die Substanzwirkung reversibel ist.

3.4.2.5 Versuchspräparat terminales Ileum

Nach Absenkung des Darmpräparats in das Organbad wurde der Schreiber eingeschaltet und der Stift auf die Nulllinie gesetzt. Danach wurde der Amplifier aufgedreht und der Stift wiederum – nach Entsperren des Regelknopfes – auf der oben genannten Linie positioniert. Danach wurde bei 5 mV eine Vorspannung von 4,9 mN vorgenommen, die für die maximale Kraftentwicklung des terminalen Ileums notwendig war. Daraufhin wurde der Stift wieder auf der Nulllinie positioniert. Gemessen wurde bei einer Geschwindigkeit („speed“) von 0,5 mm/s.

Während der Anpassungszeit von ca. 15 Minuten wurde immer wieder mit Hilfe des Feintriebs die definierte Nulllinie nachjustiert. Danach begann die Aufzeichnung der Kontrollphase von 15 Minuten, dabei sollten sich leichte Spontankontraktionen zeigen. Danach konnte mit der Substanzzugabe in Abständen von 30 Minuten begonnen werden. Auch bei diesem Organpräparat wurde eine Auswaschung der Substanz durchgeführt.

3.5. Messgrößen

Für die Auswertung der Versuchsreihen der Arteria pulmonalis, der Aorta, des terminalen Ileums und des Uterus war es wichtig, den Zugabezeitpunkt der Substanz auf der Kontraktionskurve zu vermerken. Gemessen wurde mit einem Lineal.

Beim Uterus wurde eine Nulllinie definiert und danach von dieser Linie ausgehend jeder einzelne Peak in cm gemessen und mit dem Kalibrationsfaktor

von 0,98 multipliziert. Bei einer Aufnahme der Kontraktionskraft abweichend von 5mV – wie es beim Uterus der Fall war (20 mV) - musste dies berücksichtigt werden. Folglich wurde der Wert mit vier multipliziert. Daraus resultierte das Ergebnis in mN. Die Kontrollphase wies bereits Spontankontraktionen auf. Von den Peaks in der Kontrollphase und den Peaks der einzelnen Konzentrationen wurde der Mittelwert berechnet. Zusätzlich wurde die Ruhespannung definiert, die ab einer Konzentrationszugabe von 3 mg/ml auftrat. Dabei wurde der Abstand zwischen Nulllinie und der Amplitude, die Richtung Nulllinie zeigte, in cm gemessen, anschließend mit dem Eichfaktor und mit vier multipliziert sowie der Mittelwert berechnet. Auch wurden die Anzahl der Peaks pro Minute in der Kontrollphase und nach Zugabe der verschiedenen Konzentrationen ermittelt.

Bei den Versuchsreihen der Papillarmuskeln wurde die registrierte Amplitude in cm gemessen und wieder mit dem Eichfaktor von 0,98 multipliziert, um ein Ergebnis in mN zu erhalten.

Um die Spontanfrequenz des rechten Vorhofs zu ermitteln, wurden die Schläge innerhalb der Zeitspanne von 12 Sekunden auf dem Schreiber registriert. Danach wurden die abgezählten Impulse mit 5 multipliziert. Folglich erhielt man die Anzahl der Schläge pro Minute.

Für die Auswertung der Arteria pulmonalis und der Aorta wurden die Abstände zwischen der Nulllinie und den markierten Punkten auf der Aufzeichnungslinie, an denen die Substanzzugabe erfolgte, gemessen. Der ermittelte Wert in cm musste in mN umgerechnet werden, dazu musste eine Multiplikation mit dem Eichfaktor des Kraftwandlers - nämlich 0,98 – durchgeführt werden. Der Kontrollwert der Arteria pulmonalis betrug 9,81 mN (1 g). Bei der Aorta wurde ein Kontrollwert von 19,6 mN (2 g) berechnet. Diese Kontrollwerte wurden als 100 % definiert.

Beim terminalen Ileum wurde eine Nulllinie definiert und danach von dieser Linie ausgehend jeder einzelne Peak in cm gemessen und mit dem Kalibrationsfaktor von 0,98 multipliziert. Bereits in der Kontrollphase zeigten sich Spontankontraktionen. Von den Peaks in der Kontrollphase und den Peaks der einzelnen Konzentrationen wurde der Mittelwert berechnet.

Bei jedem Versuch, der oben angeführten Organe, wurde ausgehend vom Kontrollwert, der einen Prozentsatz von 100 entsprach, die Relationen der einzelnen Konzentrationen in Prozent berechnet.

3.6 Statistik

Aus den Messdaten der einzelnen Parameter wurden nach der Auswertung der Versuchsreihen mit der Sigma-Plot 8.0-Software, die arithmetischen Mittelwerte inklusive der Standardfehler der Mittelwerte (SEM) von n-Versuchen ermittelt. Anschließend wurde mittels Paired-t-Test die Signifikanz der Ergebnisse jeder Konzentration geprüft, wobei die Messwerte in mN verwendet wurden. Als „signifikant“ wurden jene Messwerte bezeichnet, die mit einer Irrtumswahrscheinlichkeit $< 5 \%$ ($p < 0,05$) bzw. $< 1 \%$ ($p < 0,01$) eingestuft wurden. Werte mit einer Irrtumswahrscheinlichkeit von $< 0,1 \%$ ($p < 0,001$) galten als „hochsignifikant“. Danach wurden mit der oben genannten Software sowie mit Microsoft Office Excel 2007 Diagramme erstellt.

3.7 Messung der intrazellulären Calcium-Konzentration

3.7.1 Verwendete Präparate

3.7.1.1 *Arteria pulmonalis*

Die Wand der *Arteria pulmonalis* ist aus drei Schichten aufgebaut:

- *Tunica interna (Intima)*: Sie besteht aus einer Schicht von Endothelzellen, welche von feinen kollagenen Fasern sowie einer gefensterten elastischen Membran, der *Elastica interna*, umgeben ist.
- *Tunica media (Media)*: Sie enthält eine dichte Schicht zirkulär oder spiralförmig angeordneter, glatter Muskelzellen, zwischen denen Bindegewebsfasern liegen.
- *Tunica externa (Adventitia)*: Sie verbindet das Gefäß mit der Umgebung und besitzt längs verlaufende, elastische und kollagene Fasern, in dieser auch glatte Muskelzellen eingebettet sind.

Die *Arteria pulmonalis* besitzt viele glatte Muskelfasern sowie weniger elastische Fasern, sie zählt daher zu den Arterien vom muskulären Typ [THEWS et al., 1999].

3.7.1.2 *Uterus*

Die Uteruswand ist aus drei Schichten aufgebaut:

- *Perimetrium* (der Peritonealüberzug)
- *Myometrium*: Den Hauptteil der Uteruswand bildet das Myometrium, dies ist aus Bündeln spiralförmig angeordneter glatter Muskelzellen aufgebaut.
- *Endometrium* (Uterusschleimhaut): Diese Schicht schließt unmittelbar an die Muskulatur an und enthält zwei Teile - die *Lamina basalis* und die *Lamina functionalis* [THEWS et al., 1999].

Wichtig für die Versuchsdurchführung waren jene Schichten, die glatte Muskelzellen enthielten.

3.7.1.3 Kontraktionsauslösung der glatten Muskulatur

Genauso wie beim Skelett- und Herzmuskel bewirkt eine Erhöhung der zytosolischen Ca^{2+} -Konzentration eine Kontraktionsauslösung beim glatten Muskel. Aufgrund der geringen Dicke der Zellen und des – je nach Muskeltyp – wenig ausgebildeten sarkoplasmatischen Retikulums sind außer dem Ca^{2+} aus intrazellulären Speichern besonders Ca^{2+} -Ströme aus dem Extrazellularraum von Bedeutung. Bei Zunahme der zytosolischen Konzentration freier Ca^{2+} -Ionen von $< 10^{-7}$ auf $5 \cdot 10^{-5}$ mol/l, werden Kontraktionen ausgelöst. [THEWS et al., 1999]

Eine Steigerung der zytosolischen Ca^{2+} -Konzentration wird - je nach Funktion sowie Lokalisation des glatten Muskels – über einen der folgenden Mechanismen durchgeführt: elektro- bzw. pharmakomechanische Kopplung und mechanische Dehnung [THEWS et al., 1999].

Bei der pharmakomechanischen Kopplung erreichen die meisten steuernden Einflüsse den glatten Muskel von außen, entweder durch Neurotransmitter, Hormone, lokale Mediatoren oder Arzneistoffe. Sie binden vorerst an spezifische Membranrezeptoren und bewirken danach den Ca^{2+} -Einstrom ins Cytosol, jedoch ohne merkliche Änderung des Ruhemembranpotentials. Bei dieser Kopplung kommt es entweder zu einer Öffnung der rezeptorgesteuerten Ca^{2+} -Kanäle in der Zellmembran oder zu einer Freisetzung von Ca^{2+} -Ionen aus dem sarkoplasmatischen Retikulum [THEWS et al., 1999].

Der Hintergrund der im Kapitel 3.7.3 durchgeführten Methode an glatten Muskelzellen der Arteria pulmonalis und des Uterus bestand darin, zu untersuchen, ob *Dianthus versicolor* für die Kontraktionsauslösung dieser Organe, aufgrund einer Steigerung der Ca^{2+} -Konzentrationen, verantwortlich

war. Es wurden die Muskelzellen dieser Organe gewählt, da aufgrund der isometrischen Kontraktionsmessungen (siehe Kapitel 4.1), an diesen isolierten Präparaten die stärkste Wirkung beobachtet wurde.

3.7.2 Material

Tabelle 6: Geräte

Geräte	Marke
Tischzentrifuge	HETTICH EBA 3S
Universalzentrifuge	Hermle Z323 K
Wasserbad	GFL 1086
Sterile Werkbank	Waldner Electronics FAZ 3
Mikroskop	Zeiss, Axiovert 100, Germany
Inkubator 37 °C, 5 % CO ₂	Heraeus, HERA CELL 240
Vortexer	Heidolph REAX 2000
Eisbereiter, Crushed Eis	Scotsman AF 10

Weiters wurden noch Sterilpipetten, Kolbenhubpipetten, Eprouvetten, Sezierbesteck, Petrischalen und Bechergläser verwendet.

Tabelle 7: Reagenzien für die Zellisolierung

Reagenzien	ml
Lösung 1	
Phosphat Buffered Saline (PBS) mit CaCl_2 , MgCl_2 ; pH 7,4 (GIBCO)	100,00
Penicillin – Streptomycin (SIGMA PO781)	1,00
Lösung 2	
Dulbecco's PBS Phosphat Buffered Saline ohne Ca, Mg (DPBS)	49,00
Penicillin – Streptomycin (SIGMA PO781)	0,50
L-Glutamin (GIBCO 25030)	0,50
Lösung 3	
Dulbecco's modified Eagle's Medium Nutrient Mixture F-12 HAM (DMEM)	90,00
Calf Serum (SIGMA C856)	10,00
Penicillin – Streptomycin (SIGMA PO781)	1,00
Enzyme für die Zellisolation	
Collagenase (SIGMA EC 3.4.24.3) – Mengenangabe siehe Kap. 3.7.3	
Protease (SIGMA EC 3.4.24.31) – Mengenangabe siehe Kap. 3.7.3	

Weiters wurde noch gecrashtes Eis benötigt.

3.7.3 Enzymatische Zellisolierung

Während der Versuche wurde steril gearbeitet, als Arbeitsplatz diente eine sterile Werkbank, der sogenannte Laminar Flow (siehe Tabelle 6).

3.7.3.1 *Arteria pulmonalis*

Für die Isolierung der Muskelzellen benötigte man ein ca. 1 cm langes Stück der Arteria pulmonalis, das bis zur weiteren Verwendung in der physiologischen Nährlösung (siehe Kapitel 3.3.1) aufbewahrt wurde.

Zunächst wurde das Pulmonalis-Stück mit PBS, ergänzt durch Penicillin und Streptomycin (siehe Tabelle 7 – Lösung 1) gespült, um das Blut aus dem Gewebe zu waschen. Dieser Schritt wurde einige Male wiederholt, um das Gewebe möglichst komplett von Blut zu befreien. Danach wurde das Stück mit Hilfe einer Pinzette und einer Schere zerkleinert.

Nach der Präparation wurde das gewaschene Gewebe in eine verschließbare Kunststoffeprouvette gegeben und mit 5 ml der Lösung aus DPBS, Penicillin, Streptomycin und L-Glutamin (siehe Tabelle 7 – Lösung 2) und dem darin gelösten 5 mg Collagenase und 0,5 mg Protease (siehe Tabelle 7 – Enzyme für die Zellisolation) aufgefüllt. Diese Lösung musste zuvor im Wasserbad auf 37 °C vorgewärmt werden. Anschließend wurde die Mischung im Brutschrank bei 37 °C und 5 % CO₂ für 1½ Stunden inkubiert. Dabei wurde alle 15 Minuten die Epruvette mittels Vortexer kräftig geschüttelt, um eine Durchmischung des Gewebes mit der Kollagenlösung und folglich eine gute Verdauung zu gewährleisten.

Anschließend wurde der Überstand abpipettiert, in eine Kunststoffeprouvette gefüllt und zwischenzeitlich auf Eis gelagert. Das in der Epruvette verbliebene Gewebe wurde mit 3 ml der Lösung aus DPBS, Penicillin, Streptomycin und L-Glutamin wieder aufgefüllt und 3 Minuten, bei 4 °C und 500 U zentrifugiert

(Universalzentrifuge - siehe Tabelle 6). Dieser Vorgang wurde noch zweimal wiederholt. Wobei sich bei der letzten Zentrifugation das Gewebe schon völlig aufgelöst hatte oder nur mehr sehr wenig vorhanden war. Alle – auf Eis gelagerten - gesammelten Überstände und der gesamte Inhalt der letzten zentrifugierten Epruvette wurden vermischt und 2 Minuten bei 4 °C und 500 U und danach 10 Minuten bei 4 °C und 1000 U zentrifugiert. Der Überstand wurde abgesaugt und verworfen, die Gewebepellets mit 2 ml der Lösung aus DMEM, Calf Serum, Pencillin und Streptomycin (siehe Tabelle 7 – Lösung 3) vermengt, in einer Petrischale verteilt und kultiviert (modifiziert nach [ECKARDT, 2006]).

3.7.3.2 Uterus

Für die Isolierung der Muskelzellen benötigte man die Uterushörner, die bis zur weiteren Verwendung in der physiologischen Nährlösung (siehe Kapitel 3.3.2) aufbewahrt wurden.

Zunächst wurden die Uterushörner mit PBS, ergänzt durch Penicillin und Streptomycin (siehe Tabelle 7 – Lösung 1) gespült, um das Blut aus dem Gewebe zu waschen. Dieser Schritt wurde einige Male wiederholt, um das Gewebe möglichst komplett von Blut zu befreien. Danach wurde das Stück mit Hilfe einer Pinzette und einer Schere zerkleinert.

Nach der Präparation wurde das gewaschene Gewebe in zwei verschließbare Kunststoffeprouvetten aufgeteilt (jeweils ein Horn) und nach folgenden Methoden weiterbehandelt (modifiziert nach [ECKARDT, 2006]):

Methode mit DPBS

Die Hälfte des Uterusgewebe wurde mit 5 ml der Lösung aus DPBS, Penicillin, Streptomycin und L-Glutamin (siehe Tabelle 7 – Lösung 2) und dem darin gelösten 5 mg Collagenase und 0,5 mg Protease (siehe Tabelle 7 – Enzyme für die Zellisolation) aufgefüllt. Diese Lösung musste im Wasserbad auf 37 °C vorgewärmt werden. Anschließend wurde die Mischung im Brutschrank bei 37 °C und 5 % CO₂ für 1¾ Stunden inkubiert. Dabei wurde alle 15 Minuten die Epruvette mittels Vortexer kräftig geschüttelt, um eine Durchmischung des Gewebes mit der Kollagenlösung und folglich eine gute Verdauung zu gewährleisten.

Danach wurde der Überstand abgesaugt und 7 Minuten bei 4° C und 1000 Umdrehungen zentrifugiert (Universalzentrifuge – siehe Tabelle 6). Anschließend wurde der Überstand verworfen und das restliche Gewebepellet mit 2 ml der Lösung 2 aufgefüllt und auf Eis gelagert. Die Zentrifugation dieses Überstandes erfolgte umgehend, um die verbleibende Kollagenase – wenn vorhanden – auszuwaschen und folglich Zellschäden durch zu starke Verdauung auszuschließen. Das nach 1¾ Stunden Inkubation in der Epruvette verbliebene Gewebe wurde mit 3 ml der Lösung aus DPBS, Penicillin, Streptomycin und L-Glutamin wieder aufgefüllt und 3 Minuten, bei 4 °C und 500 U zentrifugiert (Universalzentrifuge - siehe Tabelle 6). Dieser Vorgang wurde noch zweimal wiederholt. Alle – auf Eis gelagerten - Überstände und der Inhalt der letzten zentrifugierten Epruvette wurden vermischt und 2 Minuten bei 4 °C und 500 U und danach 10 Minuten bei 4 °C und 1000 U zentrifugiert. Der Überstand wurde abgesaugt und verworfen, die Gewebepellets mit 2 ml der Lösung aus DMEM, Calf Serum, Pencillin und Streptomycin (siehe Tabelle 7 – Lösung 3) vermengt und filtriert, da noch Geweberückstände vorhanden waren. Danach wurde das Filtrat wieder mit 2 ml der Lösung 3 vermengt, in einer Petrischale verteilt und kultiviert (modifiziert nach [ECKARDT, 2006]).

Methode mit DMEM

Die Hälfte des Uterusgewebes wurde mit 5 ml der Lösung aus DMEM, Calf Serum, Pencillin und Streptomycin (siehe Tabelle 7 – Lösung 3) und dem darin gelösten 5 mg Collagenase und 0,5 mg Protease (siehe Tabelle 7 – Enzyme für die Zellisolation) aufgefüllt. Diese Lösung musste im Wasserbad auf 37 °C vorgewärmt werden. Anschließend wurde die Mischung im Brutschrank bei 37 °C und 5 % CO₂ für 1¾ Stunden inkubiert. Dabei wurde alle 15 Minuten die Eprouvette mittels Vortexer kräftig geschüttelt, um eine Durchmischung des Gewebes mit der Kollagenlösung und folglich eine gute Verdauung zu gewährleisten.

Danach wurde die Lösung 10 Minuten bei 1000 U mit der Tischzentrifuge (siehe Tabelle 6) zentrifugiert, zweimal filtriert mit 2 ml Lösung 3 versetzt und nochmals zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Gewebepellet mit 2 ml der Lösung 3 versetzt und in einer Petrischale verteilt und im Brutschrank bei 37 °C und 5% CO₂ kultiviert (modifiziert nach [BRACKEN et al., 1997]).

Am nächsten Tag wurde bei beiden Varianten das Medium entfernt. Die Petrischalen wurden mit Trypsin gewaschen, um einerseits das restliche Medium zu entfernen und andererseits die Zellen zu lösen. Daher wurde ca. 10 Minuten inkubiert und anschließend das neue Medium (Lösung 3) hinzugefügt. Die isolierten Zellen stellten eine Mischkultur dar, welche unter anderem auch glatte Muskelzellen enthielt.

3.7.4 Versuchsablauf

Die Zellen wurden in Nährlösung mit dem membranpermeablen Fluoreszenzfarbstoff und Pluronic, das die Aufnahme des Farbstoffes in die Zelle erleichtert, bei Zimmertemperatur für 45 Minuten geladen. Zur Messung des freien intrazellulären Ca^{2+} wurden die Zellen mit 4 μM Fura 2AM geladen. Nach dem Auswaschen des Farbstoffes und einer Äquilibrationsphase von 30 Minuten wurde die Petrischale mit dem Deckglas auf dem Mikroskopisch fixiert. Für die Versuche wurde ein invertes Epifluoreszenz-Mikroskop (Axiovert 100, Zeiss), ausgestattet mit einem Fluar x40/1.30 NA Ölimmersions-Objektiv verwendet. Als Lichtquelle diente eine Xenonlampe und die gewünschte Wellenlänge erhielt man durch einen Lichtfilter (optical filter changer Lambda 10-2, Sutter Instruments, CA). Das emittierte Licht wurde über eine CCD Kamera (Extended ISIS, Photonic Science Ltd., UK) aufgenommen. Die Lichtintensität konnte mit zwischengeschalteten Filtern (Omega Optical, Inc., VT) und einem Verschlussmechanismus geregelt werden. Die Belichtungszeit musste möglichst kurz gehalten werden, um eine photodynamische Schädigung der Zellen zu verhindern. Der Farbstoff wurde alternierend bei Wellenlängen von 340 und 380 nm erregt und die emittierte Fluoreszenz bei 510 nm registriert. Nach einer Kontrollperiode von 5 Minuten wurde die Testsubstanz in das Versuchsbad pipettiert und der Eintritt und der Verlauf verfolgt und registriert. Die Daten wurden als Quotient aus F_{340}/F_{380} angegeben. Bei der Auswertung der Daten wurde die Hintergrundfluoreszenz mitberücksichtigt. Die Registrierung und Datenanalyse erfolgte mit Hilfe von Axon Imaging Workbench 2.2 (Axon Instruments).

3.8 Pflanzenmaterial

3.8.1 Aufsammlung

Die Aufsammlung der Droge *Dianthus versicolor* fand im August 2004 statt. Für alle Versuche in dieser Diplomarbeit wurden ausschließlich Extrakte aus den oberirdischen Teilen der Pflanze von dieser Charge verwendet.

3.8.2 Extraktionsmethode – „Original water extract“

Die Herstellung der Droge erfolgte am Department für Pharmakognosie, dabei wurde eine wässrige Extraktion durchgeführt, diese setzte sich aus 1 Teil Droge und 20 Teilen Wasser zusammen. Die frisch gemahlene Droge wurde mit 0,1 N Trifluoressigsäure auf pH-Wert 2, den physiologischen pH-Wert des Magens, eingestellt. Danach wurde eine Stunde am Wasserbad bei 40 °C unter leichtem Schütteln extrahiert. Dies bewirkte eine Simulation der Muskelbewegungen und der Temperatur im Magen. Diese Methode wird als OWE – „Original water extract“ („Original-Wasser-Extrakt“) bezeichnet. Mittels dieser sollte durch Zusammenwirkung von pH-Wert, Temperatur und Schütteln ein Milieu entstehen wie es im Magen vorherrscht, man simulierte somit die Passage der Arzneispezialität durch den Magen [OBMANN et al., 2007].

Die fertige Testsubstanz wurde in 250 µl-Kunststoffeprouvetten bereitgestellt. Pro Proberöhrchen waren im Mittel 501,09 mg Extrakt in 250 µl H₂O enthalten, folglich war dieser Extrakt wasserlöslich. Die für die Versuchsdurchführungen verwendeten Konzentrationen sind in Kapitel 4.1 und 4.2. ersichtlich.

4 Ergebnisse und Diskussion

4.1 Isolierte Organpräparate

Die Versuchsdurchführung und –auswertung der Präparate erfolgte wie in Kapitel 3.4.2 bzw. 3.5 beschrieben.

In diesem Kapitel werden die Ergebnisse der Versuchsreihen an den isolierten Meerschweinchenorganen wie Uterus, Papillarmuskel, Arteria pulmonalis, Aorta, rechter Vorhof und terminales Ileum beschrieben. Die Ergebnisse jedes Präparats werden in tabellarischer Form dargestellt.

In den Tabellen wurden folgende Werte angegeben:

F	arithmetischer Mittelwert der Schlagfrequenz in Schläge/Minute
F _c	arithmetischer Mittelwert der gemessenen Kontraktionskraft
F _p	arithmetischer Mittelwert der Amplitude spontaner Kontraktionen in Peak/Minute
Irrtumswahrscheinlichkeit mittels Paired-t-Test	
n	Anzahl der Versuche
RSP	Ruhespannung
SEM	Standardfehler der Mittelwerte

Die Substanzzugabe erfolgte in drei Konzentrationsstufen: Pro Proberöhrchen waren im Mittel 501,09 mg Extrakt in 250 µl H₂O enthalten, hergestellt nach der OWE-Methode (siehe Kapitel 3.8.2). Daraus ergaben sich folglich: 20,04 mg/10 µl, 60,13 mg/30 µl und 200,44 mg/100 µl. Diese Mengen wurden mit dem Organbad (Nährlösung) von 25 ml oder 8 ml vermengt. Um die Werte besser miteinander vergleichen zu können, wurde sie auf eine Maßeinheit gebracht: 1 mg/ml, 3 mg/ml, 9 mg/ml und 25 mg/ml.

Anschließend wurden anhand von Linien– bzw. Säulendiagrammen die Ergebnisse diskutiert, wobei die Korrelation zwischen der Kontraktionskraft bzw. den Schlägen/Minute mit den Konzentrationen (mg Extrakt/ μ l H₂O) verglichen wurde. Die Relativwerte der Kontraktionskraft bzw. die Schlagfrequenz beim rechten Vorhof wurden auf der Ordinate und die Kontrollwerte sowie die Konzentrationen (mg/ml) auf der Abszisse aufgetragen. Zusätzlich wurde für jedes Präparat eine Originalaufzeichnung bezüglich der Wirkung des Extraktes angeführt.

4.1.1 Uterus

Insgesamt wurden vier Versuche durchgeführt, wobei pro Versuch ein isoliertes Uterusstück verwendet wurde.

Tabelle 8: Wirkung des Extraktes aus *Dianthus versicolor* auf die Kontraktionskraft des isolierten Uterus

Konzentration	F _c +/- SEM (mN)	F _c +/- SEM (%)	n	Irrtumswahrscheinlichkeit (Paired-t-Test)
<i>Kontrolle</i>	34,40 ± 7,80	100	4	-----
<i>1 mg/ml</i>	36,80 ± 7,17	109,68 ± 5,14		n.s.
<i>3 mg/ml</i>	37,54 ± 3,90 inkl. RSP	121,14 ± 17,65 inkl. RSP		n.s.
<i>Ruhespannung</i>	9,00 ± 4,44	26,24 ± 12,69		n.s.
<i>9 mg/ml</i>	38,76 ± 3,97 inkl. RSP	126,81 ± 23,03 inkl. RSP		n.s.
<i>Ruhespannung</i>	27,25 ± 2,28	71,45 ± 5,65		n.s.

Legende zu Tabelle 8

Die arithmetischen Mittelwerte der vier Versuche sind in Tabelle 8 ersichtlich. Während der Kontrollphase (0 mg/25 ml) wurde ein Mittelwert von 34,40 ± 7,80 mN berechnet. Die prozentuelle Zunahme der Konzentrationen bezieht sich auf den Kontrollwert. Die Kontraktionskraft verstärkt sich bei Zugabe der nächst höheren Konzentration und endet mit einem Wert von 38,76 ± 3,97 mN im Mittel bei der Zugabe der höchsten Konzentration. Der Prozentwert der Ruhespannung, bei einer Konzentration von 3 mg/ml und 9 mg/ml auftretend, bezieht sich auf den Wert der jeweiligen Konzentration. Als statistisch signifikant wurden bei diesen Versuchsreihen keine Ergebnisse errechnet.

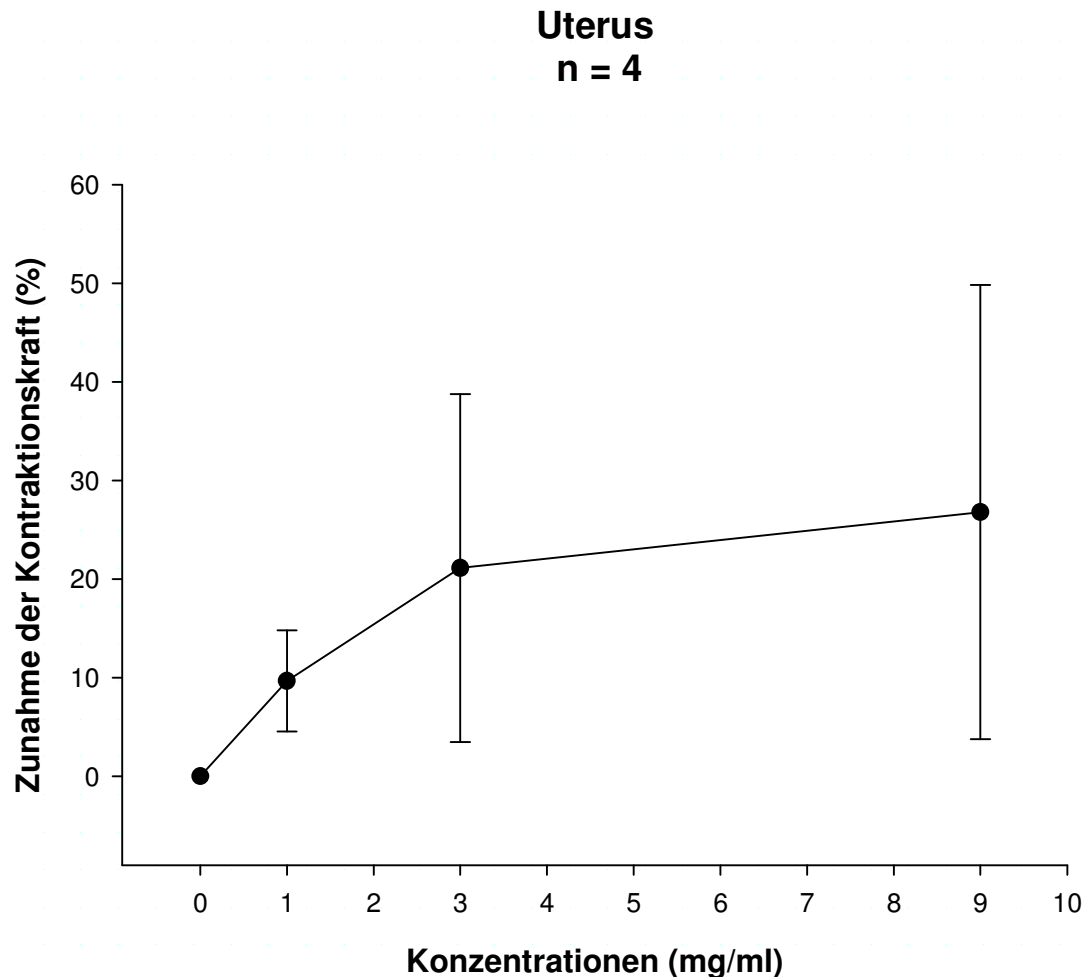
Tabelle 9: Wirkung des Extraktes aus *Dianthus versicolor* auf die Amplitudenfrequenz des isolierten Uterus

Konzentration	F _p +/- SEM (Peak/min)	F _p +/- SEM (%)	n	Irrtumswahrscheinlichkeit (Paired-t-Test)
<i>Kontrolle</i>	2 ± 0,33	100	4	-----
<i>1 mg/ml</i>	3 ± 0,30	122,45 ± 22,32		n.s.
<i>3 mg/ml</i>	3 ± 0,51	118,41 ± 19,08		n.s.
<i>9 mg/ml</i>	5 ± 0,28	196,38 ± 34,61		p < 0,05

Legende zu Tabelle 9

Die arithmetischen Mittelwerte der vier Versuche bezüglich der Peaks pro Minute sind in Tabelle 9 ersichtlich. Während der Kontrollphase (0 mg/25 ml) wurden im Mittel 2 Peaks pro Minute gezählt. Die prozentuelle Veränderung bezieht sich auf den Kontrollwert. Die Anzahl der Peaks pro Minute erreichten bei der Zugabe der höchsten Konzentration einen Wert von 5 ± 0,28. Eine signifikante Zunahme der Kontraktionskraft war nur bei einer Konzentration von 9 mg/ml gegeben.

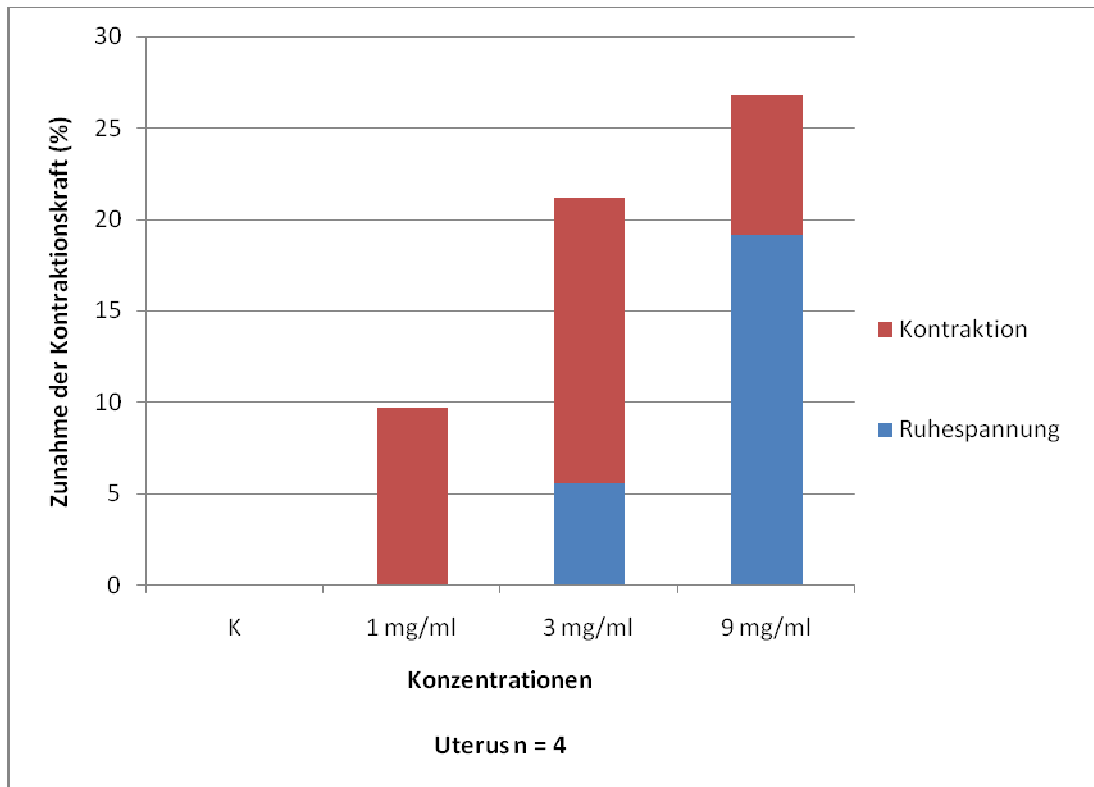
Abb. 19: Graphische Darstellung der Konzentrations-Wirkungskurve des Extraktes aus *Dianthus versicolor* beim Uterus



Legende zu Abb. 19

Diese Abbildung stellt graphisch die prozentuelle Zunahme der Kontraktionskraft (im Bezug auf den Kontrollwert) vom Uteruspräparat, durch die Einwirkung von einem Extrakt aus *Dianthus versicolor*, dar. Auf der Abszisse wurden die verschiedenen Konzentrationen aufgetragen, die Zunahme der Kontraktionskraft wurde auf der Ordinate markiert. Die schwarzen Punkte des Graphen entsprechen den Mittelwerten der Versuchsergebnisse und die dazugehörigen Balken den Standardfehlern der Mittelwerte.

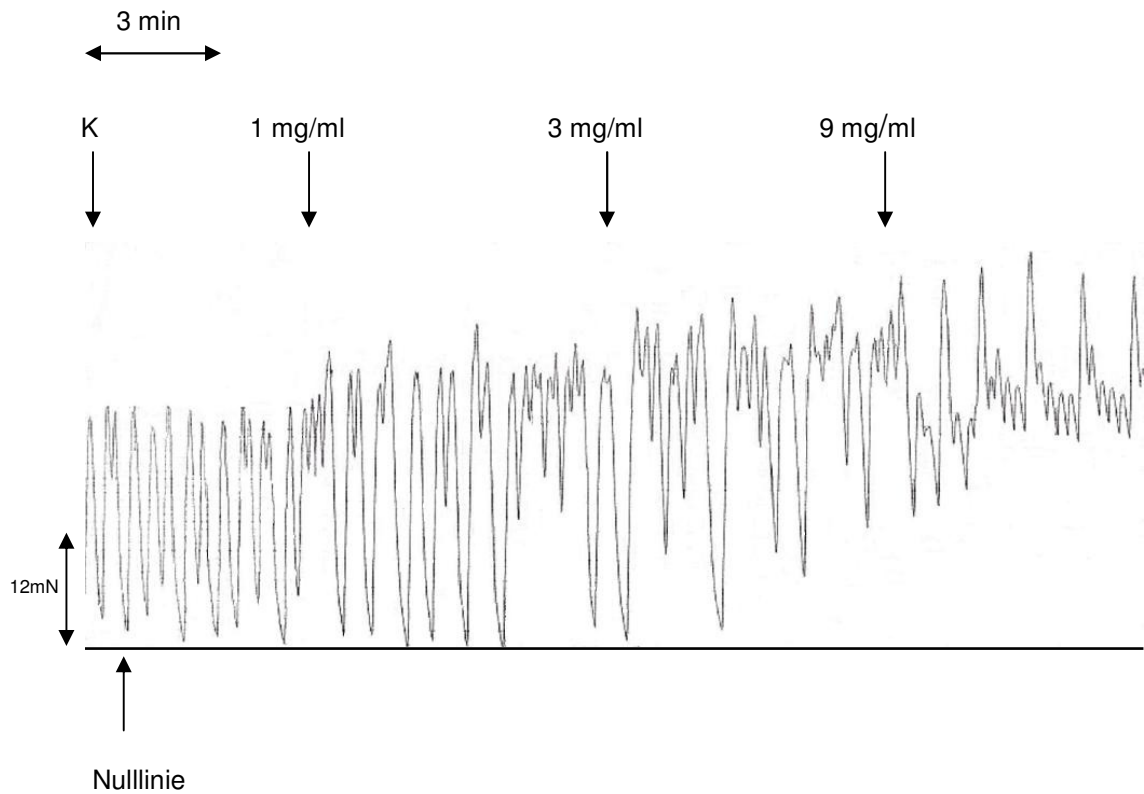
Abb. 20: Graphische Darstellung der Wirkung eines Extraktes aus *Dianthus versicolor* auf die Amplitude spontaner Kontraktionen und Ruhespannung



Legende zu Abb. 20

Abbildung 20 zeigt graphisch die prozentuelle Zunahme der Kontraktionskraft (im Bezug auf den Kontrollwert) vom isolierten Uterus, durch die Einwirkung von einem Extrakt aus *Dianthus versicolor*. Die Säulen stellen die prozentuellen Mittelwerte der drei Konzentrationen und des Kontrollwertes dar. Bei den Konzentrationen von 3 mg/ml und 9 mg/ml wurde der Anteil der Ruhespannung dargestellt.

Abb. 21: Originalaufzeichnung der Wirkung des Extraktes aus *Dianthus versicolor* auf die Kontraktionskraft des Uterus



Legende zu Abb. 21

In dieser Abbildung ist eine Originalaufnahme mittels Schreiber ersichtlich. Dabei wurde ein Versuch, welcher am Uterus durchgeführt wurde, herangezogen. Die Aufzeichnung wurde bei 20 mV und 0,2 mm/s registriert. Die Pfeile (↓) markieren die Kontrollphase (K) und den Zeitpunkt der Substanzzugabe.

Diskussion der Ergebnisse

Die Versuchsdurchführungen beim Uterus bestätigen die Einsetzung der Droge *Dianthus versicolor* in der TMM zur Auslösung von Kontraktionen des Uterus. Im Mittel kommt es bereits zu einer Zunahme auf $109,68 \pm 5,14$ Prozent nach Zugabe der ersten Konzentration (1 mg/ml), bei 3 mg/ml stieg die Wirkung auf $121,14 \pm 17,65$ Prozent vom Ausgangswert an. Die höchste Konzentrationszugabe von 9 mg/ml zeigte unterschiedliche Ergebnisse, bei einem Versuch stieg die Kontraktion auf 193,36 Prozent an, im Mittel waren es jedoch nur $126,81 \pm 23,03$ Prozent. Die starke Streuung der Werte und die geringe Anzahl der Versuche ($n = 4$) bewirkte einen großen Standardfehler und einen nicht signifikanten Unterschied zum Kontrollwert. Erwähnenswert ist, dass es bei den Konzentrationen 3 mg/ml und 9 mg/ml zum Eintreten einer erhöhten Ruhespannung (siehe Abb. 20) kam. Im Mittel betrug sie bei der Konzentration von 3 mg/ml $26,24 \pm 12,69$ Prozent, wobei es bei einem Versuch zu einem Anstieg auf 59,54 Prozent kam, bei zwei Versuchen wurden Werte unter 10 Prozent beobachtet. Bei der Konzentration von 9 mg/ml wurde eine erhöhte Ruhespannung von $71,45 \pm 5,65$ Prozent im Mittel beobachtet. Eine Ruhespannung weist auf einen Tetanus uteri, d.h. eine Dauerkontraktion des Uterus hin, dies ist wiederum ein Zeichen von starker Wirkung des Extraktes (OWE) aus *Dianthus versicolor*. Die Zunahme der Ruhespannung lief proportional mit der Zunahme der Kontraktion, auch kam es zu einer Abnahme der Relaxation. Weiters wurde beobachtet, dass die Anzahl der Peaks pro Minute im Mittel von zwei, in der Kontrollphase, auf fünf, bei Zugabe der höchsten Konzentration, anstiegen. Bei dieser Konzentration war auch eine signifikante Zunahme ($p < 0,05$) zu erkennen. Hier bestätigt sich wiederum die starke Wirkung des Extraktes aus *Dianthus versicolor* auf den Uterus. Man kam auch zu dem Resultat, dass die Wirkung des untersuchten Extraktes reversibel war, da es nach der Auswaschung des Organbades mit der physiologischen Nährlösung zu einem Rückgang der Amplituden in die Ausgangsposition kam.

4.1.2 Papillarmuskel

Insgesamt wurden vier Versuche durchgeführt, wobei pro Versuch ein isolierter Papillarmuskel verwendet wurde.

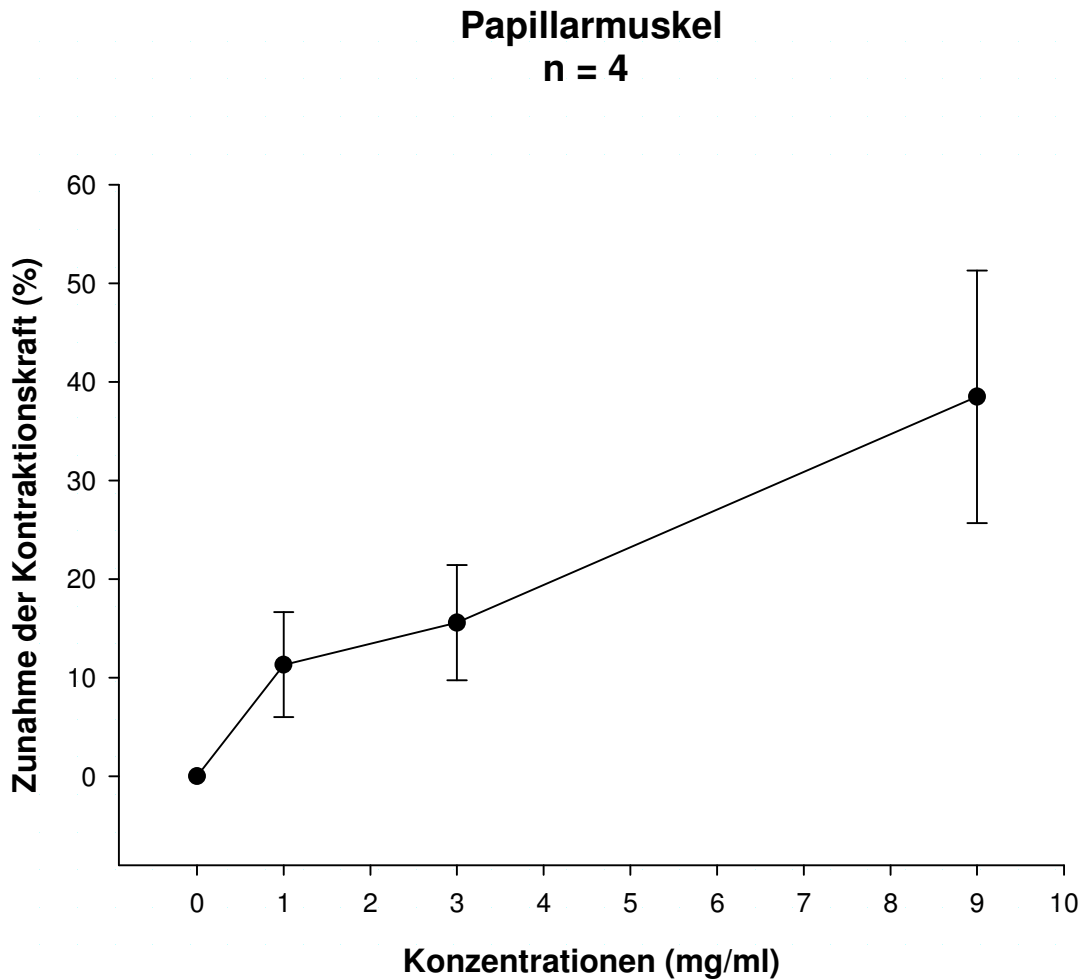
Tabelle 10: Wirkung des Extraktes aus *Dianthus versicolor* auf die Kontraktionskraft des isolierten Papillarmuskels

Konzentration	F _c +/- SEM (mN)	F _c +/- SEM (%)	n	Irrtumswahrscheinlichkeit (Paired-t-Test)
Kontrolle	0,97 ± 0,13	100	4	-----
1 mg/ml	1,06 ± 0,11	111,33 ± 5,32		p < 0,05
3 mg/ml	1,14 ± 0,16	115,58 ± 5,84		n.s.
9 mg/ml	1,35 ± 0,24	138,50 ± 12,80		n.s.

Legende zu Tabelle 10

Die arithmetischen Mittelwerte der vier Versuche sind in Tabelle 10 ersichtlich. Während der Kontrollphase (0 mg/25 ml) wurde ein Mittelwert von $0,97 \pm 0,13$ mN berechnet. Die prozentuelle Zunahme bezieht sich auf den Kontrollwert. Die Kontraktionskraft veränderte sich leicht steigend bei Zugabe der nächst höheren Konzentration und endete mit einem Wert von $1,35 \pm 0,24$ mN im Mittel bei der Zugabe der höchsten Konzentration. Eine signifikante Zunahme der Kontraktionskraft war nur bei einer Konzentration von 1 mg/ml zu erkennen.

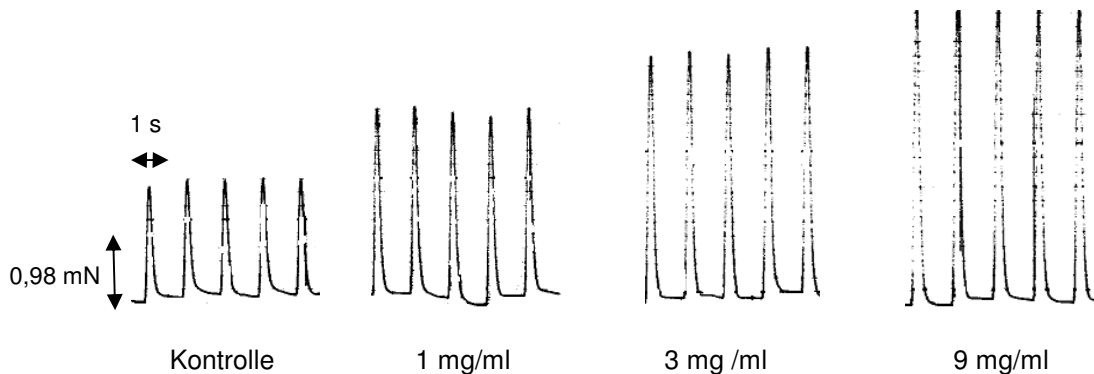
Abb. 22: Graphische Darstellung der Konzentrations-Wirkungskurve des Extraktes aus *Dianthus versicolor* beim Papillarmuskel



Legende zu Abb. 22

Diese Abbildung stellt graphisch die prozentuelle Zunahme der Kontraktionskraft (im Bezug auf den Kontrollwert) von Papillarmuskeln durch die Einwirkung von einem Extrakt aus *Dianthus versicolor* dar. Auf der Abszisse wurden die verschiedenen Konzentrationen aufgetragen, die Zunahme der Kontraktionskraft wurde auf der Ordinate aufgetragen. Die schwarzen Punkte des Graphen entsprechen den Mittelwerten der Versuchsergebnisse und die dazugehörigen Balken den Standardfehlern der Mittelwerte.

Abb. 23: Originalaufzeichnung der Wirkung des Extraktes aus *Dianthus versicolor* auf die Kontraktionskraft des Papillarmuskels



Legende zu Abb. 23:

In dieser Abbildung ist eine Originalaufzeichnung der isometrischen Messung an einem Papillarmuskel ersichtlich. Dabei wurde ein Versuch, welcher an isolierten Papillarmuskeln durchgeführt wurde, herangezogen. Die Aufzeichnung wurde bei 2 mV und 5 mm/s registriert. Die Abbildung zeigt die Kontraktionskraft am Ende der Kontrollphase bzw. zum Zeitpunkt der Substanzzugabe.

Diskussion der Ergebnisse

Die Versuche zeigten eine stetige Zunahme der Kontraktionskraft des isolierten Papillarmuskels abhängig von der Höhe der Konzentration. Der Extrakt aus *Dianthus versicolor* wies bei den Konzentrationen 1 mg/ml und 3 mg/ml im Mittel ($111,33 \pm 5,32$ bzw. $115,58 \pm 5,84$ Prozent) eine geringe Wirkung auf. Die Zunahme der Kontraktionskraft erreichte nur bei einer Konzentration von 1 mg/ml einen statistisch signifikanten Wert von $p < 0,05$, im Bezug auf den Kontrollwert. Erst bei der Substanzzugabe von 9 mg/ml kam es zu einem prozentuellen Anstieg auf $138,50 \pm 12,80$ Prozent im Mittel. Jedoch zeigte sich der Standardfehler etwas erhöht, dies weist auf unterschiedliche Versuchsergebnisse hin, die Zunahmen, innerhalb dieser Konzentration befanden sich in einem Bereich von 10 % bis 69 %.

4.1.3 Rechter Vorhof

Insgesamt wurden drei Versuche durchgeführt, wobei pro Versuch ein spontan schlagender rechter Vorhof verwendet wurde.

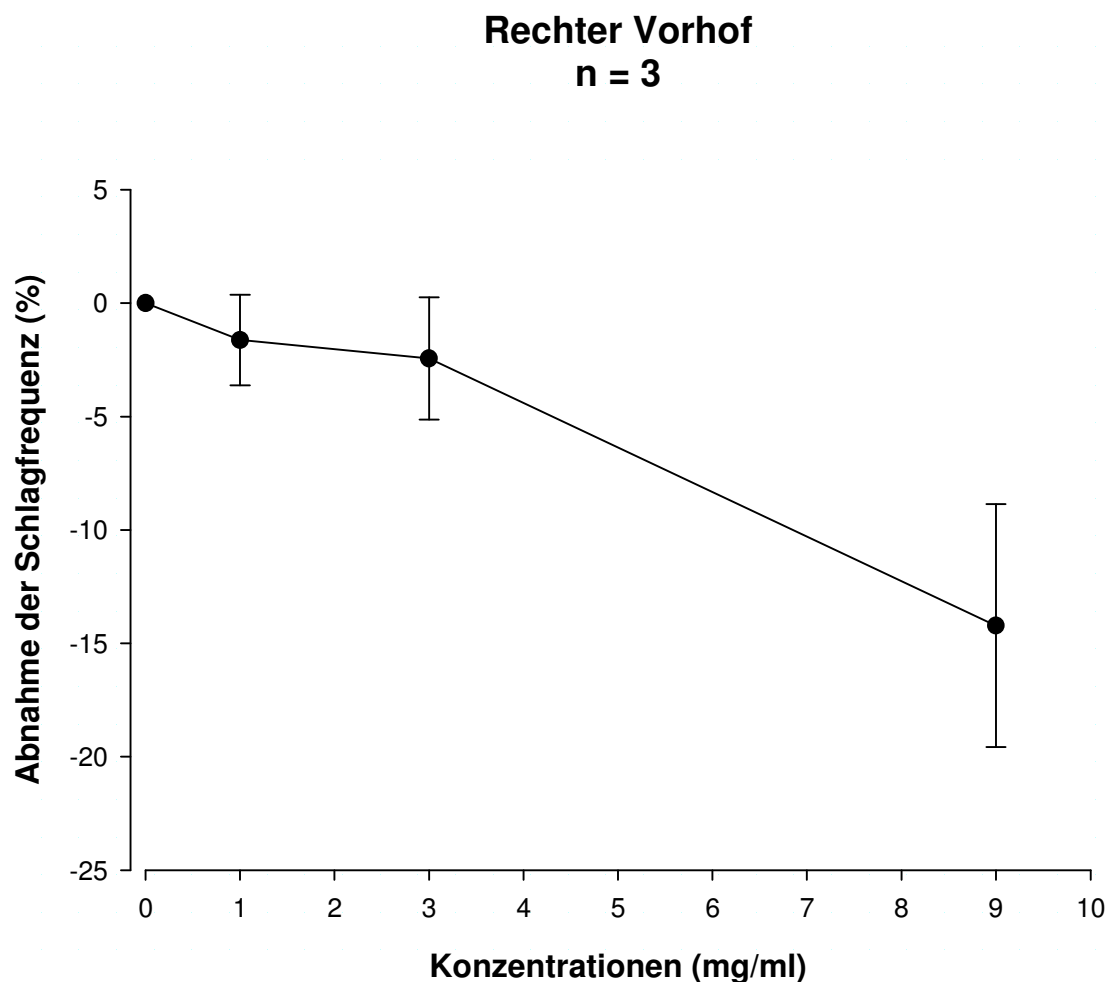
Tabelle 11: Wirkung des Extraktes aus *Dianthus versicolor* auf die Schlagfrequenz des isolierten rechten Vorhofs

Konzentration	F +/- SEM (Schläge/min)	F +/- SEM (%)	n	Irrtumswahrscheinlichkeit (Paired-t-Test)
Kontrolle	231,67 ± 13,64	100	3	-----
1 mg/ml	228,33 ± 16,67	98,37 ± 1,99		n.s.
3 mg/ml	226,67 ± 18,33	97,56 ± 2,70		n.s.
9 mg/ml	200,00 ± 22,55	85,78 ± 5,36		n.s.

Legende zu Tabelle 11

Die arithmetischen Mittelwerte der drei Versuche sind in Tabelle 11 ersichtlich. Während der Kontrollphase (0 mg/25 ml) wurde ein Mittelwert von 231,67 ± 13,64 Schläge pro Minute berechnet. Die prozentuelle Abnahme bezieht sich auf den Kontrollwert. Die Anzahl der Schläge pro Minute verringerte sich kontinuierlich auf 200,00 ± 22,55 mN im Mittel bei der Zugabe der höchsten Konzentration von 9 mg/ml. Als statistisch signifikant wurden bei diesen Versuchsreihen keine Ergebnisse errechnet.

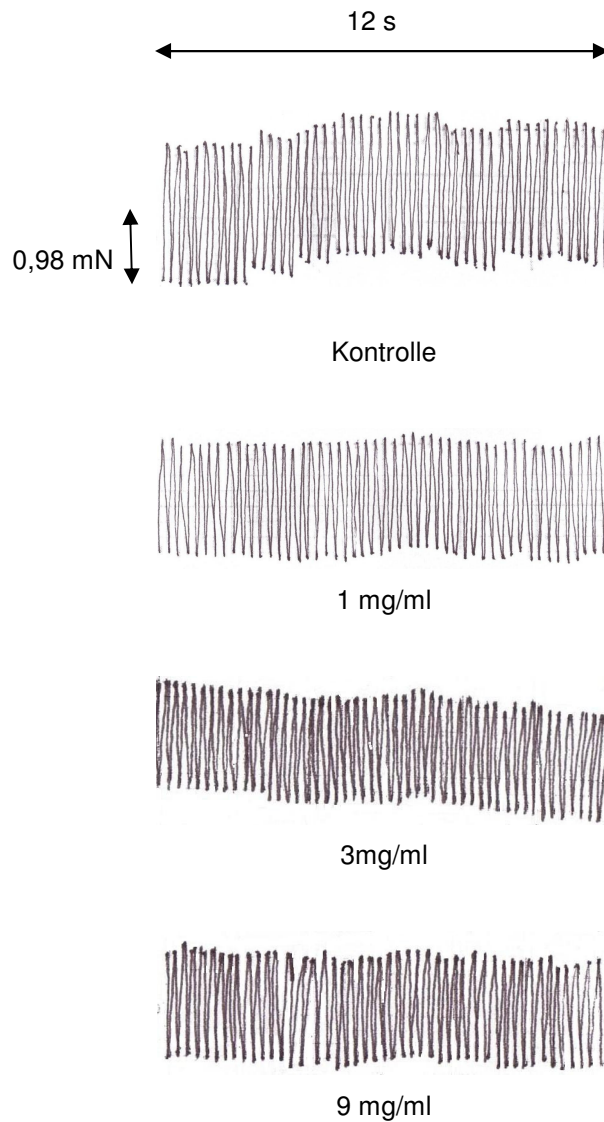
Abb. 24: Graphische Darstellung der Konzentrations-Wirkungskurve des Extraktes aus *Dianthus versicolor* beim rechten Vorhof



Legende zu Abb. 24

Diese Abbildung zeigt graphisch die prozentuelle Abnahme der Schläge pro Minute (im Bezug auf den Kontrollwert von $231,67 \pm 13,64$ Schläge/min) vom rechten Vorhof durch die Einwirkung eines Extraktes aus *Dianthus versicolor*. Auf der Abszisse wurden die verschiedenen Konzentrationen aufgetragen, die Abnahme der Schlagfrequenz wurde auf der Ordinate aufgetragen. Die schwarzen Punkte des Graphen entsprechen den Mittelwerten der Versuchsergebnisse und die dazugehörigen Balken den Standardfehlern der Mittelwerte.

Abb. 25: Originalaufzeichnung der Wirkung des Extraktes aus *Dianthus versicolor* auf die Schlagfrequenz des rechten Vorhofs



Legende zu Abb. 25

Diese Abbildung zeigt eine Originalaufzeichnung eines Versuches, welcher am spontan schlagenden rechten Vorhof durchgeführt wurde. Die Aufzeichnung wurde bei 5 mV und 5 mm/s registriert. Die Abbildungen zeigen die Schlagfrequenz in der Kontrollphase bzw. die Schlagfrequenz der verschiedenen Konzentrationen.

Diskussion der Ergebnisse

Beim rechten Vorhof wurde bei der Substanzzugabe eine geringe Abnahme der Schläge pro Minute beobachtet. Die Versuche zeigten eine stetige Abnahme der Schlagfrequenz abhängig von der Konzentration der Substanz. Der Extrakt aus *Dianthus versicolor* wies bei den Konzentrationen 1 mg/ml bzw. 3 mg/ml im Mittel eine geringe Abnahme von $1,63 \pm 1,99$ bzw. $2,44 \pm 2,70$ Prozent auf. Bei der Substanzzugabe von 9 mg/ml kam es zu einer Abnahme, relativ gesehen, um $14,22 \pm 5,36$ Prozent im Mittel, allerdings war die negativ chronotrope Wirkung nicht signifikant.

4.1.4 Aorta

Insgesamt wurden vier Versuche durchgeführt, wobei pro Versuch ein isoliertes Aortapräparat verwendet wurde.

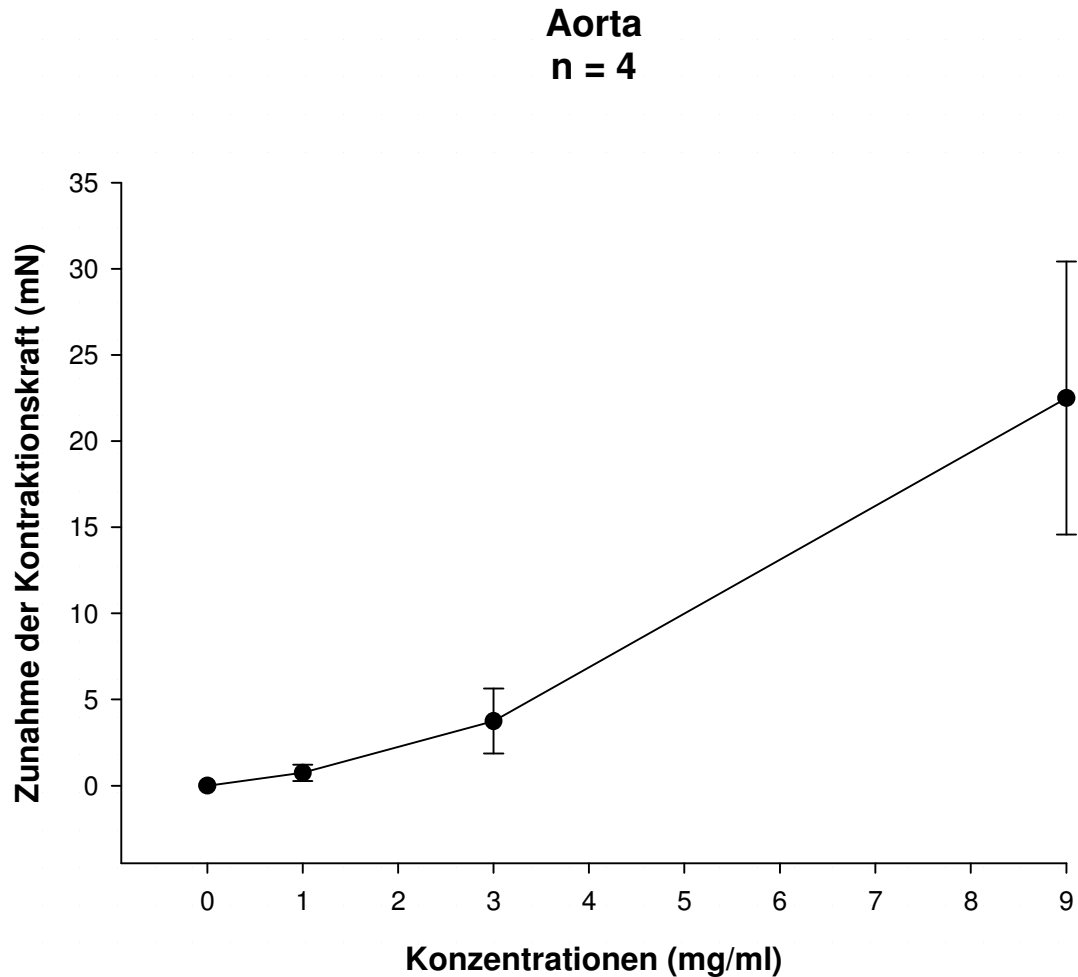
Tabelle 12: Wirkung des Extraktes aus *Dianthus versicolor* auf die Kontraktionskraft der isolierten Aorta

Konzentration	F _c +/- SEM (mN)	F _c ± SEM (%)	n	Irrtumswahrscheinlichkeit (Paired-t-Test)
Kontrolle	19,60 ± 0,00	100	4	-----
1 mg/ml	19,75 ± 0,09	100,75 ± 0,48		n.s.
3 mg/ml	20,34 ± 0,37	103,75 ± 1,89		n.s.
9 mg/ml	24,01 ± 1,55	122,50 ± 7,92		n.s.

Legende zu Tabelle 12

In Tabelle 12 sind die arithmetischen Mittelwerte der vier Versuche ersichtlich. Als Kontrollwert (0 mg/25 ml) wurde der Wert der Vorspannung von 19,60 mN herangezogen. Die prozentuelle Zunahme bezieht sich auf den Kontrollwert. Die Kontraktionskraft veränderte sich leicht steigend bei Zugabe der nächst höheren Konzentration und endete mit einem Wert von 24,01 ± 1,55 mN im Mittel bei der Zugabe der höchsten Konzentration von 9 mg/ml. Als statistisch signifikant wurden bei diesen Versuchsreihen keine Ergebnisse errechnet.

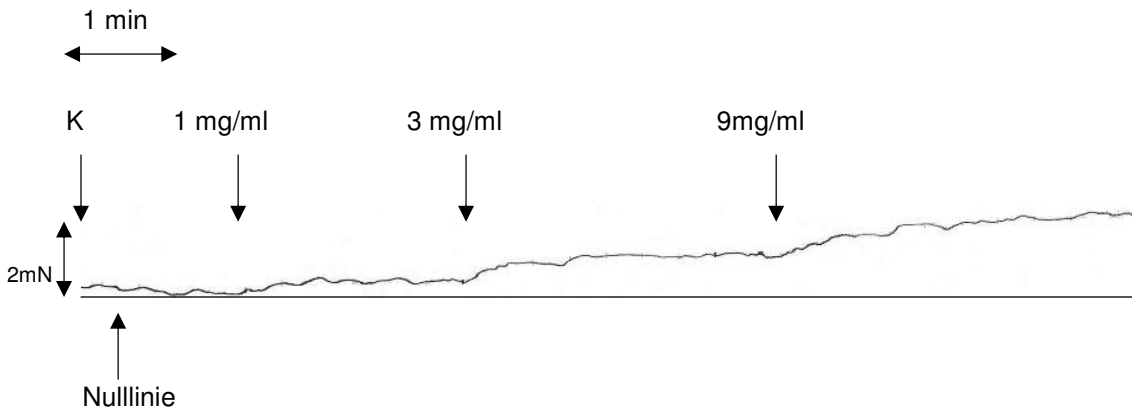
Abb. 26: Graphische Darstellung der Konzentrations-Wirkungskurve des Extraktes aus *Dianthus versicolor* bei der Aorta



Legende zu Abb. 26

Diese Abbildung stellt graphisch die prozentuelle Zunahme der Kontraktionskraft (im Bezug auf den Kontrollwert von 19,60 mN) der Aorta durch die Einwirkung eines Extraktes aus *Dianthus versicolor* dar. Auf der Abszisse wurden die verschiedenen Konzentrationen aufgetragen, die Zunahme der Kontraktionskraft wurde auf der Ordinate markiert. Die schwarzen Punkte des Graphen entsprechen den Mittelwerten der Versuchsergebnisse und die dazugehörigen Balken den Standardfehlern der Mittelwerte.

Abb. 27: Originalaufzeichnung der Wirkung des Extraktes aus *Dianthus versicolor* auf die Kontraktionskraft der Aorta



Legende zu Abb. 27

In dieser Abbildung ist eine Originalaufnahme des Schreibers ersichtlich. Dabei wurde ein Versuch, welcher an der Aorta durchgeführt wurde, herangezogen. Die Aufzeichnung wurde bei 5 mV und 0,5 mm/s registriert. Die Pfeile (↓) markieren die Kontrollphase (K) und den Zeitpunkt der Substanzzugabe.

Diskussion der Ergebnisse

Die Versuchsreihen der Aorta zeigten einen stetigen Anstieg der Kontraktionskraft abhängig von der Konzentration. Der Extrakt aus *Dianthus versicolor* wies bei den Konzentrationen 1 mg/ml bzw. 3 mg/ml im Mittel ($100,75 \pm 0,48$ bzw. $103,75 \pm 1,89$ Prozent) eine sehr geringe Zunahme auf. Erst bei der Substanzzugabe von 9 mg/ml kam es zu einer prozentuellen Zunahme von $22,50 \pm 7,92$ Prozent im Mittel, wobei bei es bei einem Versuch zu einem Anstieg auf 146 Prozent kam. Man kam auch zu dem Resultat, dass die Wirkung der eingesetzten Substanz reversibel war, da es nach der Auswaschung des Organbades mit der physiologischen Nährlösung zu einem Rückgang der Werte in die Ausgangsposition kam.

4.1.5 Arteria pulmonalis

Insgesamt wurden fünf Versuche durchgeführt, wobei pro Versuch ein isoliertes Pulmonalisstück verwendet wurde.

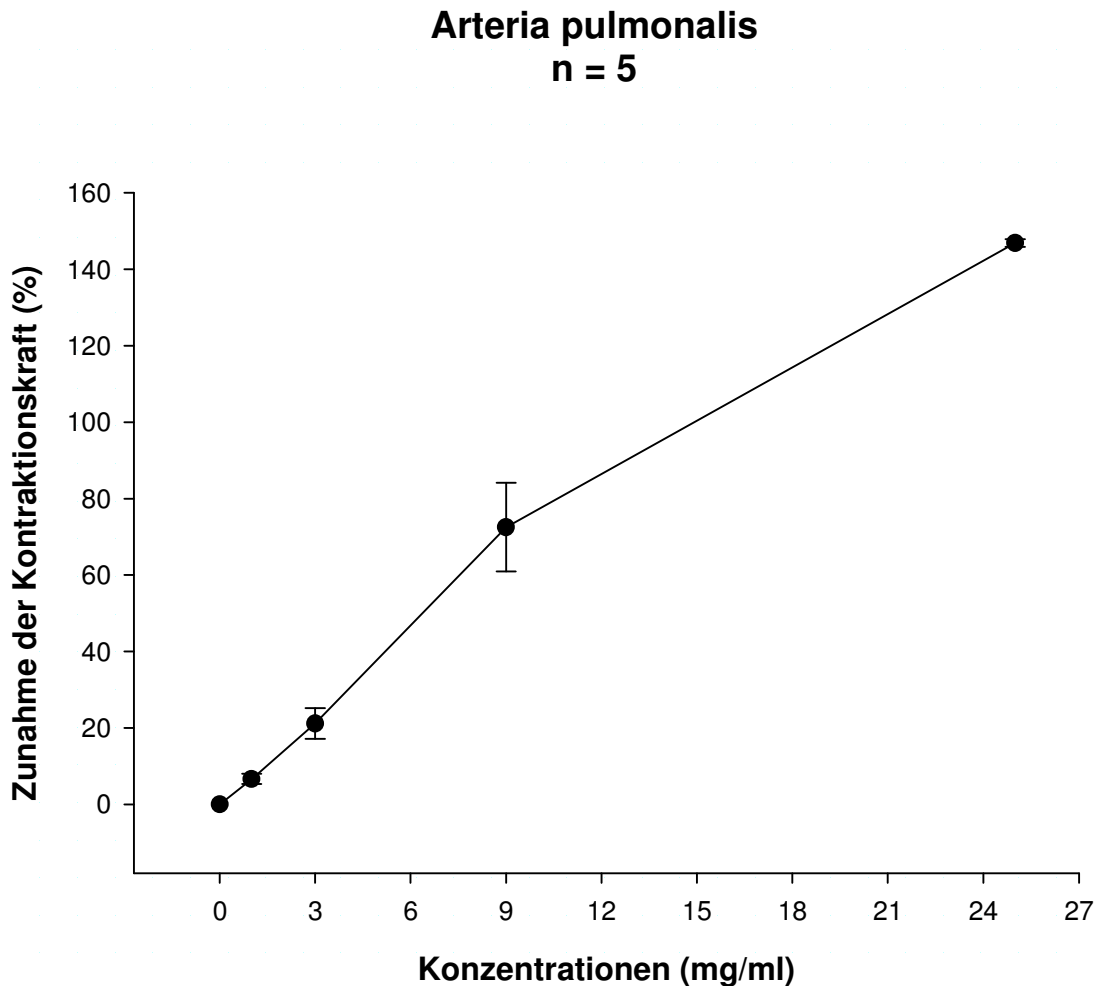
Tabelle 13: Wirkung des Extraktes aus *Dianthus versicolor* auf die Kontraktionskraft der isolierten Arteria pulmonalis

Konzentration	F _c +/- SEM (mN)	F _c ± SEM (%)	n	Irrtumswahrscheinlichkeit (Paired-t-Test)
Kontrolle	9,81 ± 0,00	100	5	-----
1 mg/ml	10,46 ± 0,13	106,66 ± 1,33	3	p < 0,05
3 mg/ml	11,88 ± 0,39	121,18 ± 4,03	5	p < 0,01
9 mg/ml	16,92 ± 1,13	172,53 ± 11,56	5	p < 0,01
25 mg/ml	24,21 ± 0,10	246,85 ± 1,00	2	p < 0,01

Legende zu Tabelle 13

In Tabelle 13 sind die arithmetischen Mittelwerte von drei Versuchen in der Konzentration von 1 mg/ml sowie jeweils fünf Versuche der Konzentrationen 3 mg/ml und 9 mg/ml und zwei Versuche in der Konzentration von 25 mg/ml dargestellt. Als Kontrollwert (0 mg/25 ml) wurde der Wert der Vorspannung von 9,81 mN herangezogen. Die prozentuelle Zunahme bezieht sich auf den Kontrollwert. Die Kontraktionskraft veränderte sich steigend bei Zugabe der nächst höheren Konzentration und endete mit einem Wert von 24,21 ± 0,10 mN im Mittel bei der Zugabe der höchsten Konzentration von 25 mg/ml. Bei allen Konzentrationen kam es zu einer signifikanten Erhöhung der Kontraktionskraft bezogen auf den Kontrollwert.

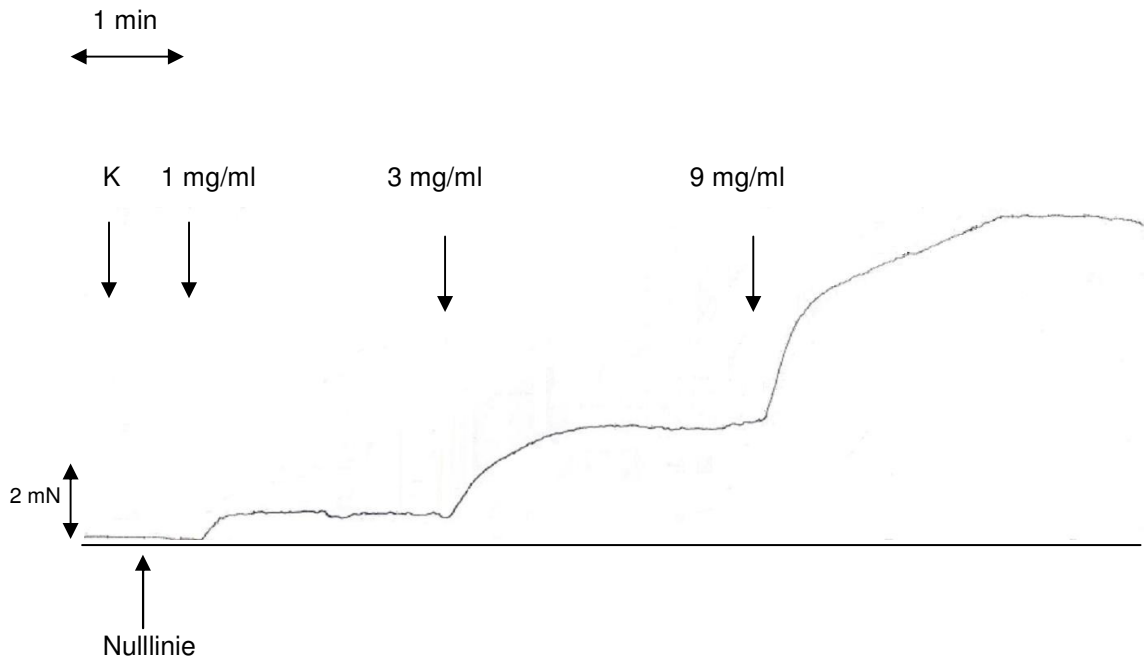
Abb. 28: Graphische Darstellung der Konzentrations-Wirkungskurve des Extraktes aus *Dianthus versicolor* bei der Arteria pulmonalis



Legende zu Abb. 28

Diese Abbildung präsentiert graphisch die prozentuelle Zunahme der Kontraktionskraft (im Bezug auf den Kontrollwert von 9,81 mN) der Arteria pulmonalis durch die Einwirkung eines Extraktes aus *Dianthus versicolor*. Auf der Abszisse wurden die verschiedenen Konzentrationen markiert, die Zunahme der Kontraktionskraft wurde auf der Ordinate aufgetragen. Die schwarzen Punkte des Graphen entsprechen den Mittelwerten der Versuchsergebnisse und die dazugehörigen Balken den Standardfehlern der Mittelwerte.

Abb. 29: Originalaufzeichnung der Wirkung des Extraktes aus *Dianthus versicolor* auf die Kontraktionskraft der Arteria pulmonalis



Legende zu Abb. 29

In dieser Abbildung ist eine Originalaufnahme der Arteria pulmonalis ersichtlich. Dabei wurde ein Versuch, welcher an der Arteria pulmonalis durchgeführt wurde, herangezogen. Die Aufzeichnung wurde bei 5 mV und 0,5 mm/s registriert. Die Pfeile (↓) markieren die Kontrollphase (K) und den Zeitpunkt der Substanzzugabe.

Diskussion der Ergebnisse

Der Extrakt aus *Dianthus versicolor* zeigte auf die Kontraktionskraft der isolierten Arteria pulmonalis im Vergleich zu den anderen Organpräparaten die größte Wirkung. Man beobachtete bei den Versuchsreihen der Arteria pulmonalis einen Anstieg der Kontraktionskraft mit steigender Konzentrationszugabe. Der Extrakt aus *Dianthus versicolor* wies bei der Konzentration von 1 mg/ml im Mittel eine prozentuelle Zunahme auf $106,66 \pm 1,33$ Prozent auf und war statistisch signifikant im Bezug auf den Kontrollwert ($p < 0,05$). Die Konzentration von 3 mg/ml zeigte einen Wert von $121,18 \pm 4,03$ Prozent. Auf einen Anstieg der Kontraktionskraft auf $172,53 \pm 11,56$ Prozent kam es bei einer Konzentration von 9 mg/ml. Die Zugabe von 25,06 mg/ml bewirkte eine Zunahme, relativ gesehen, auf $246,85 \pm 1,00$ Prozent. Die drei letzten Konzentrationen zeigten eine statistische Signifikanz von $p < 0,01$. Bei einem Versuch waren von der Kontrollphase an leichte Spontankontraktionen zu beobachten, welche mit steigender Konzentration immer intensiver wurden. Man kam auch bei der Arteria pulmonalis zu dem Resultat, dass die Wirkung der eingesetzten Substanz reversibel war, da es nach der Auswaschung des Organbades mit der physiologischen Nährlösung zu einer Abnahme in die Ausgangsposition kam. Die erhöhte Substanzwirkung auf die Arteria pulmonalis könnte zu starken Kontraktionen dieses Organs in vivo führen und folglich die Gesundheit gefährden.

4.1.6 Terminales Ileum

Insgesamt wurden drei Versuche durchgeführt, wobei pro Versuch ein Ileumstück verwendet wurde.

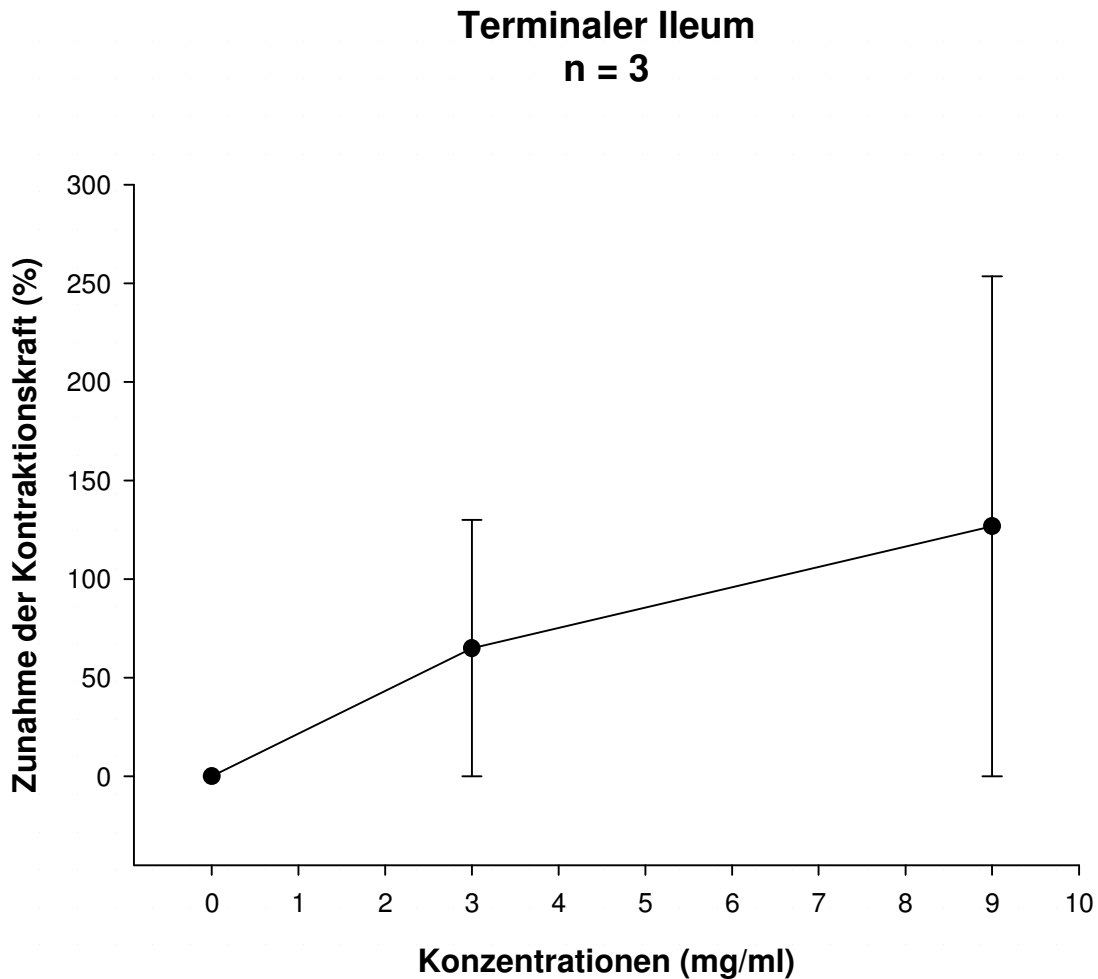
Tabelle 14: Wirkung des Extraktes aus *Dianthus versicolor* auf die Kontraktionskraft des isolierten terminalen Ileums

Konzentration	$F_c \pm \text{SEM}$ (mN)	$F_c \pm \text{SEM}$ (%)	n	Irrtumswahrscheinlichkeit (Paired-t-Test)
Kontrolle	$0,61 \pm 0,00$	100	3	-----
3 mg/ml	$1,01 \pm 0,40$	$165,03 \pm 65,03$		n.s.
9 mg/ml	$1,38 \pm 0,77$	$226,78 \pm 126,78$		n.s.

Legende zu Tabelle 14

In Tabelle 14 sind die arithmetischen Mittelwerte der drei Versuche ersichtlich. Die prozentuelle Zunahme bezieht sich auf den Kontrollwert. Während der Kontrollphase (0 mg/25 ml) wurde ein Mittelwert von $0,61 \pm 0,02$ mN berechnet. Die Kontraktionskraft erhöhte sich bei Zugabe der Konzentration von 3 mg/ml auf $1,01 \pm 0,40$ mN und endete mit einem Wert von $1,38 \pm 0,77$ mN im Mittel bei der höchsten Konzentration von 9 mg/ml.

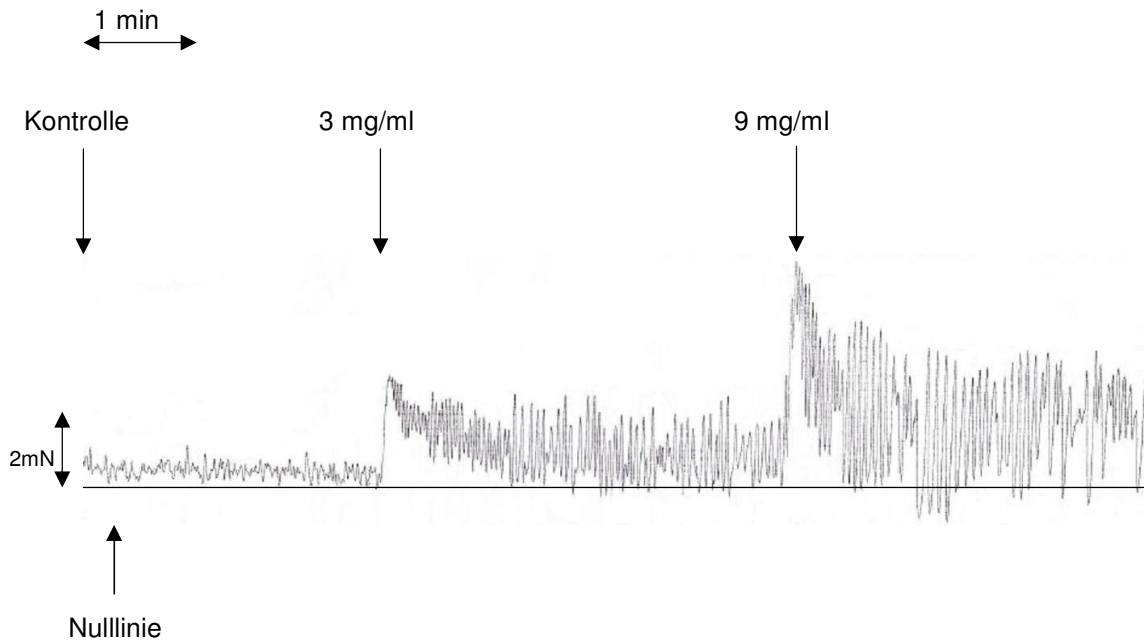
Abb. 30: Graphische Darstellung der Konzentrations-Wirkungskurve des Extraktes aus *Dianthus versicolor* beim terminalen Ileum



Legende zu Abb. 30

Diese Abbildung stellt graphisch die prozentuelle Zunahme der Kontraktionskraft (im Bezug auf den Kontrollwert) des terminalen Ileums durch die Einwirkung eines Extraktes aus *Dianthus versicolor* dar. Auf der Abszisse wurden die verschiedenen Konzentrationen markiert, die Zunahme der Kontraktionskraft wurde auf der Ordinate aufgetragen. Die schwarzen Punkte des Graphen entsprechen den Mittelwerten.

Abb. 31: Originalaufzeichnung der Wirkung des Extraktes aus *Dianthus versicolor* auf die Kontraktionskraft des terminalen Ileums



Legende zu Abb. 31

In dieser Abbildung ist eine Originalaufzeichnung, mittels eines Schreiber aufgezeichnet, ersichtlich. Dabei wurde ein Versuch, welcher am terminalen Ileum durchgeführt wurde, herangezogen. Die Aufzeichnung wurde bei 5 mV und 0,5 mm/s registriert. Die Pfeile (↓) markieren die Kontrollphase und den Zeitpunkt der Substanzzugabe.

Diskussion der Ergebnisse

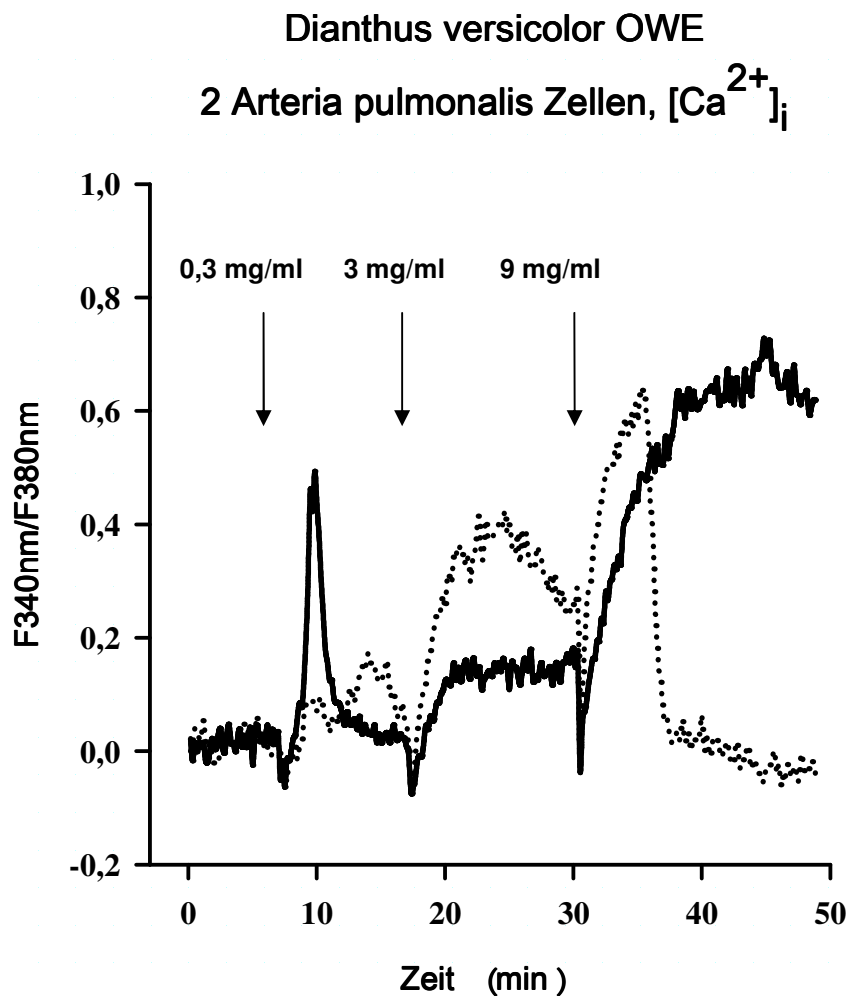
Beim terminalen Ileum wurden drei Versuche durchgeführt, wobei nur bei einem Versuch eine Wirkung beobachtet wurde. Die Aufzeichnungen zeigten bereits in der Kontrollphase Spontankontraktionen. Zu einer Zunahme der Kontraktionskraft auf $165,03 \pm 65,03$ Prozent im Mittel kam es bei der Konzentration von 3 mg/ml. Bei der Konzentration von 9 mg/ml wurde ein Anstieg auf $226,78 \pm 126,78$ Prozent beobachtet. Jedoch sind diese Werte nicht repräsentativ, da bei zwei Versuchen kein signifikanter Anstieg der Kontraktionskraft beobachtet wurde. Trotzdem weist es daraufhin, dass die Droge *Dianthus versicolor* eine kontraktile Wirkung auf das terminale Ileum bewirken könnte und dies folglich zu verstärkten Kontraktionen im Magen-Darmtrakt bis zu Koliken führen könnte. Auch bei diesem Organpräparat war die Wirkung der eingesetzten Substanz reversibel, da es nach der Auswaschung des Organbades mit der physiologischen Nährlösung zu einem Abfall der Kurve in die Ausgangsposition kam.

4.2 Effekt auf die intrazelluläre Calcium-Konzentration

4.2.1 Arteria pulmonalis

In Abbildung 32 ist die Wirkung des Extraktes auf 2 Zellen dargestellt. Wie aus dem Beispiel hervorgeht, reagierten die isolierten Zellen der Arteria pulmonalis unterschiedlich auf die Zugabe des Extraktes. Einige Zellen zeigten bereits bei der niedrigsten Konzentration von 3 mg/ml eine transiente Zunahme der intrazellulären Calcium-Konzentration, während bei manchen Zellen erst in höheren Konzentrationen ein vorwiegend bleibender Anstieg der intrazellulären Calcium-Konzentration beobachtet wurde.

Abb. 32: Wirkung eines Extraktes aus *Dianthus versicolor* auf die intrazelluläre Calcium-Konzentration



4.2.2 Uterus

Die Wirkung des Dianthus-Extraktes auf die intrazelluläre Calcium-Konzentration von isolierten Uteruszellen war ähnlich wie auf die isolierten Zellen der Arteria pulmonalis. Allerdings wurde dieser Effekt in Uteruszellen weniger häufig beobachtet.

Diskussion der Ergebnisse

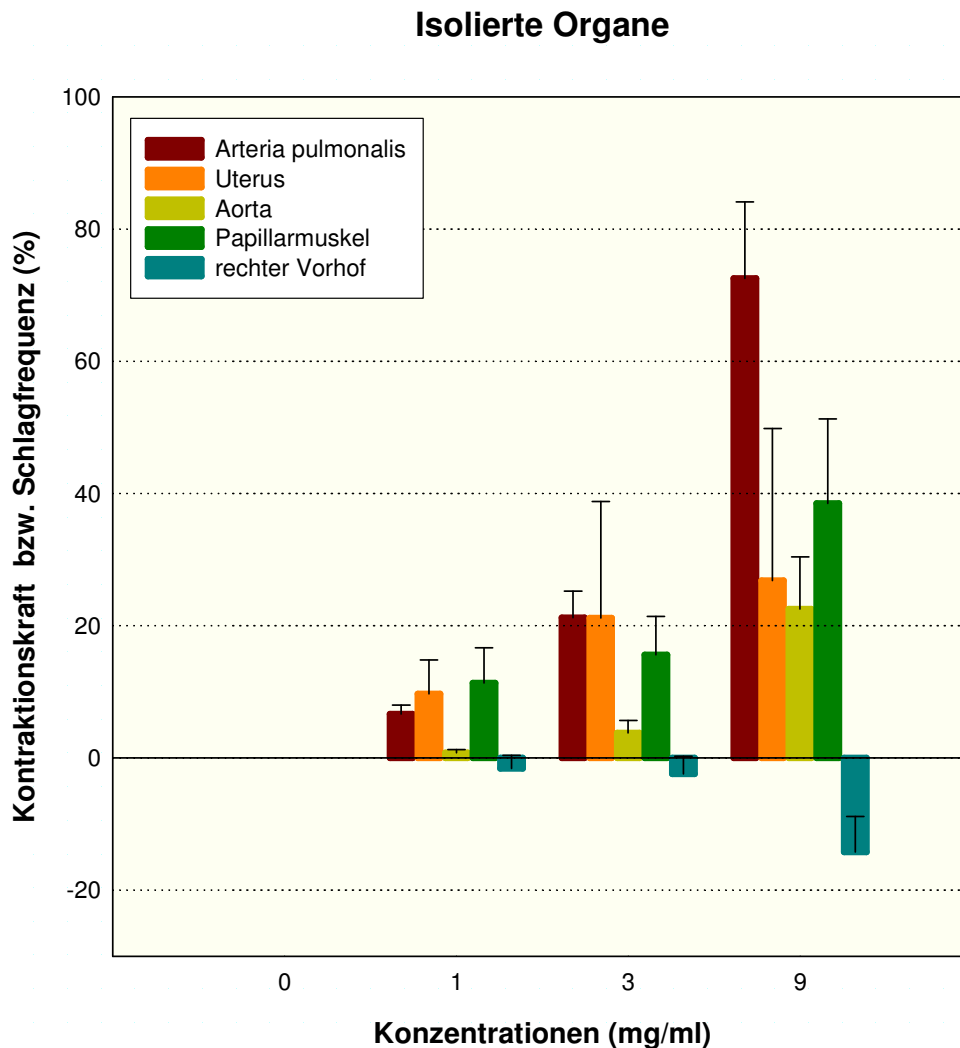
Die Zunahme der Kontraktionskraft isolierter Präparate kann durch vermehrten Calcium-Einstrom oder Calcium-Freisetzung aus intrazellulären Speichern bedingt sein. Aus diesem Grund wurde die intrazelluläre Calcium-Konzentration bei steigenden Extrakt-Konzentrationen untersucht. Sowohl an isolierten, glattmuskulären Zellen der Arteria pulmonalis als auch an isolierten, glattmuskulären Zellen des Uterus konnte ein Anstieg der intrazellulären Calcium-Konzentration beobachtet werden. Die Zellen reagierten jedoch unterschiedlich: Einige zeigten einen konzentrationsabhängigen Anstieg der intrazellulären Calcium-Konzentration, manche reagierten kaum und einige Zellen zeigten einen sehr raschen und starken Anstieg, was eine Calcium-Überladung der Zelle zur Folge hatte und zum Zelltod führte. Der genaue Mechanismus des Anstiegs der intrazellulären Calcium-Konzentration muss durch weitere Versuche abgeklärt werden.

4.3 Diskussion

Im Zuge dieser Diplomarbeit wurde die Wirkung eines Extraktes aus *Dianthus versicolor* auf die verschiedenen Organpräparate von Meerschweinchen, wie Aorta, Arteria pulmonalis, Papillarmuskel, rechten Vorhof, terminales Ileum sowie dem Uterus untersucht. Erforscht wurde die Reaktion des Pflanzenextraktes, hergestellt nach der OWE-Methode, auf die Kontraktilität der isolierten Organe bzw. die Schlagfrequenz beim rechten Vorhof.

Die aufgrund der TMM gemäßen Anwendung erwarteten Wirkungen des untersuchten Extraktes aus *Dianthus versicolor* konnten in dieser Arbeit bestätigt werden, wobei die Steigerung der Kontraktilität bei der Aorta und beim Papillarmuskel gering, beim terminalen Ileum etwas stärker und beim Uterus und der Arteria pulmonalis sehr stark ausgeprägt waren. Zu einer leichten Abnahme der Schlagfrequenz kam es beim rechten Vorhof. Wie in Abb. 33 ersichtlich, reagierten die verschiedenen Organpräparate konzentrationsabhängig. In den Versuchsreihen wurde beobachtet, dass die Wirkung des untersuchten Extraktes reversibel ist, da es nach der Auswaschung des Organbades mit der physiologischen Nährlösung zu einem Rückgang der Amplituden beim Uterus, dem terminalen Ileum, der Arteria pulmonalis und der Aorta in die Ausgangsposition kam.

Weiters wurde geprüft, welche Wirkung der Extrakt aus *Dianthus versicolor* auf die intrazelluläre Calcium-Konzentration isolierter Muskelzellen des Uterus und der Arteria pulmonalis zeigt. Sowohl an isolierten, glattmuskulären Zellen der Arteria pulmonalis als auch an isolierten, glattmuskulären Zellen des Uterus konnte ein Anstieg der intrazellulären Calcium-Konzentration beobachtet werden.

Abb. 33: Vergleich der untersuchten Organpräparate**Legende zu Abb. 33**

Diese Abbildung stellt graphisch die prozentuelle Zunahme der Kontraktionskraft der untersuchten Organpräparate bzw. die prozentuelle Abnahme der Schlagfrequenz des rechten Vorhofs (in Bezug auf den Kontrollwert) durch die Einwirkung eines Extraktes aus *Dianthus versicolor* dar. Ersichtlich sind nur jene isolierten Organe, deren Versuche mit den Konzentrationen 1mg/ml, 3 mg/ml und 9 mg/ml durchgeführt wurden. Auf der Abszisse wurden die verschiedenen Konzentrationen aufgetragen, die Kontraktionskraft bzw. Schlagfrequenz wurde auf der Ordinate gekennzeichnet. Die farbigen Säulen des Graphen entsprechen den Mittelwerten der Versuchsergebnisse und die dazugehörigen Balken den Standardfehlern der Mittelwerte.

5 Schlussbetrachtung

Ziel dieser Diplomarbeit war es, die Wirkung eines Extraktes aus der Droge *Dianthus versicolor* an isolierten Organpräparaten des Meerschweinchens, wie die Aorta, die Arteria pulmonalis, dem Papillarmuskel, den spontan schlagenden rechten Vorhof, dem terminalen Ileum, aber auch dem Uterus zu untersuchen. Die Droge wird in der TMM in Form eines Tees eingenommen und zeigt eine kontraktile Wirkung auf den Uterus. Weiters wurde geprüft, welche Wirkung der Extrakt aus *Dianthus versicolor* auf die intrazelluläre Calcium-Konzentration isolierter Muskelzellen des Uterus und der Arteria pulmonalis zeigt. Da die Steigerung der intrazelluläre Ca^{2+} -Konzentrationen für die Kontraktionsauslösung der glatten Muskulatur verantwortlich ist, wurde eruiert, ob *Dianthus versicolor* dies beeinflusst und folglich den Ca^{2+} -Einstrom ins Cytosol verstärkt oder hemmt.

In den Versuchsreihen am isolierten Uterus, durchgeführt mit isometrischen Messungen, konnten die kontraktile Effekte bestätigt werden. Interessant war, dass die Kontraktionskraft bei niedrigen Konzentrationen stärker zunahm, als bei der höchsten Konzentration. Dies erklärt vielleicht auch die Anwendung in der TMM in niedrigen Dosierungen. Wichtig ist auch zu erwähnen, dass es bei den Konzentration von 3 mg/ml und 9 mg/ml zum Eintreten einer erhöhten Ruhespannung kam, dies weist auf einen Tetanus uteri, d.h. eine Dauerkontraktion des Uterus, hin, was wiederum ein Zeichen von starker Wirkung des Extraktes (OWE) aus *Dianthus versicolor* ist. Die Zunahme der Ruhespannung lief proportional mit der Zunahme der Kontraktion, auch kam es zu einer Abnahme der Relaxation. Weiters wurde beobachtet, dass sich die Frequenz der Peaks pro Minute beim Uterus, nach Zugabe der höchsten Konzentration, im Mittel verdoppelte. Hier bestätigt sich wiederum der starke Effekt der Droge.

Sehr starke Wirkung zeigten auch die Ergebnisse an der Arteria pulmonalis, besonders bei höheren Konzentrationen. Bei einer Konzentration von 9 mg/ml kam es zu einer Kontraktionskraftzunahme auf $172,53 \pm 11,56$ Prozent und bei 25 mg/ml stieg der Wert auf $246,85 \pm 1,00$ Prozent. Die erhöhte Wirkung des Extraktes aus *Dianthus versicolor* auf die Arteria pulmonalis könnte zu starken Kontraktionen dieses Organs in vivo führen und folglich die Gesundheit gefährden.

Die Aufzeichnungen der Versuchsreihen des terminalen Ileums verdeutlichten die Zunahme der Kontraktionskraft bei Zugabe eines Extraktes aus *Dianthus versicolor*, was zu verstärkten Kontraktionen im Magen-Darmtrakt bis zu Krämpfen führen könnte.

Kaum kontrahierende Effekte zeigte die Aorta, die Kontraktionszunahme stieg bei der höchsten Konzentration auf einen Wert von $122,50 \pm 7,92$ Prozent, bezogen auf den Kontrollwert, an.

Beim Papillarmuskel wurde nur bei der höchsten Konzentration ein Anstieg auf $138,50 \pm 12,80$ Prozent beobachtet, die niedrigen Dosierungen zeigten nur leichte Veränderungen.

Erwähnenswert ist auch, dass es beim rechten Vorhof zu einem leichten Abfall der Schlagfrequenz kam.

In den Versuchsreihen wurde beobachtet, dass die Wirkung des untersuchten Extraktes aus *Dianthus versicolor* reversibel ist.

Die Versuche an den isolierten glattmuskulären Zellen der Arteria pulmonalis und des Uterus untermauern die Effekte, die an den isolierten Präparaten gefunden wurden, denn die intrazelluläre Calcium-Konzentration stieg unter Einwirkung des Dianthus-Extraktes konzentrationsabhängig an.

In der Literatur weisen C-Glycoside unter anderem auf eine antispasmodische hin [JAY, 2006]. C-Glykoside, wie Chrysoeriol und Saponarin, wurden auch aus der Droge *Dianthus versicolor* isoliert [BOGUSLAVSKAYA et al., 1983; OBMANN et al., 2007]. Im Rahmen dieser Arbeit konnte jedoch kein spasmolytischer sondern ein kontraktiler Effekt auf die isolierten Organe festgestellt werden. Folglich müssen noch nicht erforschte Substanzen aus *Dianthus versicolor* für die kontraktile Wirkung verantwortlich sein.

Weitere Untersuchungen zur Droge *Dianthus versicolor* wären wünschenswert, um eine genaue Identifikation der Inhaltsstoffe zu erreichen und folglich den oder die für die Wirkung verantwortlichen Inhaltsstoff(e) pharmakologisch genauer charakterisieren zu können.

6 Zusammenfassung

Die Droge *Dianthus versicolor*, eine mongolische Steppenpflanze, aus der Familie der *Caryophylloide*, stammt aus dem Hubsgul aimag im Norden der Mongolei und wird in der traditionellen mongolischen Medizin in Form von Teezubereitungen oder pulverisiert eingesetzt. Dabei zeigt sich eine kontraktile Wirkung auf den Uterus. In Kombination mit anderen Pflanzenarten wird *Dianthus versicolor* bei Lebererkrankungen eingesetzt.

Im Rahmen dieser Diplomarbeit wurde die kontraktile Wirkung dieses Extraktes, hergestellt mit der OWE-Methode, an isolierten glattmuskulären Meerschweinchenorganen und am Herz mithilfe isometrischer Kontraktionsmessungen untersucht. Weiters wurde geprüft, welche Auswirkung der Extrakt auf die isolierten Muskelzellen des Uterus und der Arteria pulmonalis zeigt.

Die durch die Anwendungen in der TMM zu erwartenden Wirkungen des untersuchten Extraktes aus *Dianthus versicolor* konnten in dieser Arbeit bestätigt werden. Teilweise nur im geringen Umfang wie bei der Aorta und beim Papillarmuskel, jedoch auch mit größerer kontraktile Wirkung wie beim terminalen Ileum. Die stärkste Reaktion zeigten der Uterus und die Arteria pulmonalis. Zu einer geringen Abnahme der Schlagfrequenz kam es beim rechten Vorhof. In der Literatur weisen C-Glycoside, welche auch aus der Droge *Dianthus versicolor* isoliert wurden, auf eine antispasmodische Wirkung hin, das OWE-Extrakt zeigt hingegen einen kontraktile Effekt [JAY, 2006]. Folglich müssen noch nicht erforschte Substanzen aus *Dianthus versicolor* für die kontraktile Wirkung verantwortlich sein.

Weitere Untersuchungen zur Droge *Dianthus versicolor* wären erstrebenswert, um eine genaue Identifikation der Inhaltsstoffe zu erreichen und folglich den oder die für die Wirkung verantwortlichen Inhaltsstoff(e) pharmakologisch genauer charakterisieren zu können.

7 Summary

The drug *Dianthus versicolor* is a Mongolian steppe plant from the family of *Caryophylloids* and is native in the Hubsgul aimag in the north of Mongolia. This plant is used in the traditional Mongolian Medicine in the form of tea or pulverized. It shows a contractile effect on the uterus. *Dianthus versicolor* is utilized in liver diseases in combination with other plants.

In the context of this thesis, the contractile effect of this extract, produced by the method of OWE, was investigated in isolated smooth and heart muscle preparations of the guinea pig. Force of contraction was measured isometrically. Furthermore, the effect on the intracellular calcium concentration of isolated muscle cells of the uterus and the pulmonary artery was studied by fluorescence imaging.

The anticipated effects of the investigated extract from *Dianthus versicolor* could be confirmed in this work. Partially only in small scale, as for the aorta and the papillary muscle, but also with more contractile effect as for the terminal ileum. The strongest reaction was shown by the uterus and the pulmonary artery. At the right atrium of the heart, there was a weak negative chronotropic effect. In literature, the C-glycosides isolated from the drug *Dianthus versicolor* point at an antispasmodic effect [JAY, 2006]. The OWE extract, however, exerted an increase in contractility, which implies the occurrence of components of the extract which are not isolated and identified so far.

Further analyses for the drug of *Dianthus versicolor* would be desirable in order to achieve an exact identification of components and therefore to be able to give a more precise pharmacological characterization of the component(s) which is (are) responsible for its effects.

Literaturverzeichnis

BERNSTEIN, J.A.; STIBICH, M.A.; LeBARON S. (2002). Use of traditional medicine in Mongolia: a survey; *Complementary Therapies in Medicine* 10(1), 42-45

BÖHMIG, F.; CHROBOK, R. (1963): *Dianthus*, Neumann Verlag, Radebeul 1, 11

BOGUSLAVSKAYA, L.I.; DEM'YANENKO, S.I.; SALAM, D.K.; SOBOLEVA, V.A. (1983). C-Glycoside of *Dianthus versicolor*; *Chemistry of natural compounds* 19(6), 746-747

BRACKEN, K.E.; ELGER, W.; JANTKE, I.; NANNINGA, A.; GELLERSEN, B. (1997). Cloning of Guinea Pig Cyclooxygenase-2 and 15-Hydroxyprostaglandin Dehydrogenase Complementary Deoxyribonucleic Acids: Steroid-Modulated Gene Expression Correlates to Prostaglandin F_{2α} Secretion in Cultured Endometrial Cells; *Endocrinology* 138(1), 237-247

ECKARDT, J.: Isolierung, Charakterisierung und Kultivierung von mikrovaskulären Endothelzellen aus der Plazenta [Etablierung eines Modells zur plazentaren Angiogenese], Gießen, Justus-Liebig-Universität, Dissertation, 2006; 25-26

HILBIG, W. (1995): *The vegetation of Mongolia*, SPB Academic Publishing, Amsterdam, 13-29

HOFFMANN, G. (1956): *Anatomie der Laboratoriumstiere*, Veb Gustav Fischer Verlag, Jena

JAY, M; VIRICEL, M.-R.; GONNET, J.-F.. C-Glycosylflavonoids in: Flavonoids Chemistry, Biochemistry and Applications (Anderson, Ø.M.; Markham. K. R.; Eds.). Taylor & Francis Group., Baco Raton, 2006; 898-902

KLETTER, CH.; GLASL S.; THALHAMMER, T.; NARANTUYA, S. (2008). Traditional Mongolian Medicine – A potential for drug discovery; Sci Pharm. 76, 49-63

KLETTER, CH.; KRIECHBAUM, M. (2001): Tibetan Medicinal Plants, Medpharm Scientific Publishers, Stuttgart, 12

KOCH-WESER, J. (1963). Effects of rate changes an strength and time course of contraction of papillary muscle; Am J Physiol 204, 451-457

MAYR, K.: Charakterisierung von Sequiterpenlactonen und Flavonoiden aus *Saussurea amara* Dc. (Asteraceae), Wien, Universität Wien, Diplomarbeit, 2006; 8-9

OBMANN, A.; RADOVIC, T.; KLETTER, C.; GLASL, S. (2007). HPLC-MS-Analysis of flavonoid-C-glycosides in the Mongolian medicinal plant *Dianthus versicolor*; Planta Med 73 (9), 931

PIETTA, P.-G. (2000). Flavonoids as Antioxidants; J. Nat. Prod. 63, 1035-1042

REITER, M. (1967). Die Werbestimmung inotrop wirkender Arzneimittel am isolierten Papillarmuskel; Arzneim Forsch 17, 1249-1253

THER, L. (1965): Grundlagen der experimentellen Arzneimittelforschung, Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft, Stuttgart, 286-303

THEWS, G.; MUTSCHLER, E.; VAUPEL, P. (1999): Anatomie, Physiologie, Pathophysiologie des Menschen, Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft, Stuttgart, 216, 537, 589-590

United States Department of Agriculture (USDA): Germplasm Resources Information Network (GRIN) Taxonomy for Plants. Internet: <http://www.ars-grin.gov/cgi-bin/npgs/html/taxon.pl?13873> (Stand: 27.10. 2008)

Lebenslauf

Persönliche Daten

<i>Name</i>	Birgit Weisz-Pecher, geb. Pecher
<i>Geburtsdaten</i>	18. November 1973, Hainburg an der Donau
<i>Staatsbürgerschaft</i>	Österreich
<i>Familienstand</i>	verheiratet, 2 Kinder (17 Jahre, 11 Jahre)
<i>Religion</i>	römisch-katholisch
<i>Wohnort</i>	Am Weinberg 4 2425 Nickelsdorf
<i>Telefon</i>	02146/2841 0699/19731118
<i>E-Mail</i>	birgit.weisz@utanet.at

Ausbildung

<i>Sept. 1980 - Juni 1984</i>	Volksschule, Nickelsdorf
<i>Sept. 1984 - Juni 1988</i>	Bundesgymnasium Neusiedl am See
<i>Sept. 1988 - Juni 1993</i>	Höhere Bundeslehranstalt für Wirtschaftliche Berufe, Neusiedl am See
<i>Juni 1992</i>	Prüfungen in • praktischer Betriebsführung • Ernährungslehre
<i>Juni 1993</i>	<i>Abschluss:</i> Matura
<i>seit März 2003</i>	Studium für Ernährungswissenschaften, Universität Wien, Wahlschwerpunkt „Lebensmittelproduktion und -technologie“

Kurse mit Abschlussprüfung

<i>Nov. 1993 - Juni 1994</i>	WIFI Personalverrechnerkurs, Wien
<i>Okt. 2001 - Dez. 2001</i>	BFI Arbeitsrechtskurs, Wien

Berufserfahrung

- Juni – August 1991* GASTHOF ZUR GRENZE
 Fam. Marchart
 7033 Pötsching
*12-wöchiges Pflichtpraktikum im Bereich der
 Gastronomie*
- Aug. 1993 - Jänner 1995* DATASERVICE ORGANISATION
 1030 Wien, Rennweg
Lohn- und Gehaltsverrechnerin
- Feber 1995 - Feber 2003* ÖAG AG
 1110 Wien, Schemmerlstraße 66-68
Lohn- und Gehaltsverrechnerin
- März 1997 bis Sept. 1998 *Karenz*

Tätigkeiten/Praktika parallel zum Studium

- Juli 2003* ÖAG AG
 1110 Wien, Schemmerlstraße 66-68
Ferialangestellte
- Feber 2006* Bundesministerium für Gesundheit und Frauen
 Abteilung Lebensmittel
 1030 Wien, Radetzkystraße 2
Pflichtpraktikum
- Aug. - September 2006* Institut für Ernährungswissenschaften
 1090 Wien, Althanstraße 14
Pflichtpraktikum
 Mitarbeit bei der Studie „Ernährungsstatus
 burgenländischer Senioren“

Birgit Weisz-Pecher

Nickelsdorf, im Dezember 2008