

**EINFLUSS VON PFLANZEN-EXTRAKTEN (*VITEX
CIENKOWSKII* UND *DANIELLA OLIVERI*) UND
PHYSIOLOGISCHEN IONEN AUF DIE GLATTE
GEFÄSSMUSKULATUR UND ELEKTROPHYSIO-
LOGISCHE EIGENSCHAFTEN DES HERZMUSKELS**

BRUNO SONTIA

2005

Aus dem Walter-Straub-Institut für Pharmakologie und Toxikologie
Ludwig-Maximilians-Universität München
Vorstand: Prof. Dr. Peter Eyer

**Einfluss von Pflanzen-Extrakten (*Vitex cienkowskii* und *Daniella
oliveri*) und physiologischen Ionen auf die glatte Gefäßmuskulatur
und elektrophysiologische Eigenschaften des Herzmuskels**

Dissertation
zum Erwerb des Doktorgrades der Humanbiologie
an der Medizinischen Fakultät der
Ludwig-Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von
Bruno Sontia

aus
Fossong-Wentcheng (Kamerun)

2005

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität München

Berichterstatter: Prof. Dr. Burckhard Fichtl

Mitberichterstatter: Priv. Doz. Dr. Ch. Kupatt
Prof. Dr. B. F. Becker
Prof. Dr. H. Schad

Mitbetreuung durch den
Promovierten Mitarbeiter: Prof. Dr. Wolfgang Vierling

Dekan: Prof. Dr. D. Reinhardt

Tag der mündlichen Prüfung: 22 April 2005

Für meinen Vater
René YMELE

Verzeichnis wichtiger Abkürzungen

APD	Aktionspotentialdauer
CH ₂ Cl ₂ -MeOH	Dichloromethan-Methanol
EC ₅₀	Konzentration, bei der die halbmaximale Wirkung eintritt
EME	Erreichter-Maximaler-Effekt
EtOAc	Ethylacetat
F _c	Kontraktionskraft
HVA	Durch starke Potentialänderung aktivierter Kanal („High voltage activated“)
I _K	Verzögerter Auswärtsgerichteter-Kalium-Strom
I _{K1}	Einwärtsgerichteter-Kalium-Strom
I _{Kr}	“rapid delayed rectifier” Kalium-Strom
I _{Ks}	“slow delayed rectifier” Kalium-Strom
I _{Kur}	„ultra rapid delayed rectifier“ Kalium-Strom
I _{Na}	Natrium-Strom
I _{to}	Transienter auswärtsgerichteter Kalium-Strom
KHB	Krebs-Henseleit-Lösung
[K ⁺] _o	Extrazelluläre Kalium-Konzentration
LVA	Durch geringe Potentialänderung aktivierter Kanal („low-voltage activated“)
MeOH	Methanol
[Mg ²⁺] _o	Extrazelluläre Magnesium-Konzentration
RyR	Ryanodin-Rezeptor
ROC	Rezeptorgesteuerter Ionenkanal („receptor operated channel“)
SEM	Standardfehler des Mittelwertes („standard error of the mean value“)
SR	Sarkoplasmatisches Reticulum

1. Einleitung	4
2. Anatomischer Aufbau und Funktion des Herzens und der glatten Muskulatur der Gefäße	6
2.1 Allgemeine strukturelle und funktionelle Aspekte.....	6
2.2 Herzmuskelzellen	7
2.3 Die Zellmembran.....	8
2.4 Erregungsbildungs- und Leitungssystem	9
2.5 Das Aktionspotential der Herzmuskelzelle	11
2.6 Ionenkanäle in der Herzmuskelzellmembran	12
2.6.1 Calcium-Kanäle.....	14
2.6.1.1 L-Typ-Calcium-Kanäle	15
2.6.1.2 T-Typ-Calcium-Kanäle	16
2.6.2 Natrium-Kanäle	17
2.6.3 Kalium-Kanäle	17
2.6.3.1 Einwärtsgerichteter-Kalium-Strom, I_{K1}	18
2.6.3.2 Transienter-auswärtsgerichteter-Kalium-Strom, I_{to}	18
2.6.3.3 Verzögerter-Auswärts-Gleichrichter-Kalium-Strom, I_K	18
2.7 Elektromechanische Koppelung am Herzen	19
2.8 Regulation der Kontraktion glatter Muskelzellen der Gefäße	20
3. Traditionelle Medizin in Kamerun	22
3.1 Geographie und Biodiversität.....	22
3.2 Traditionelle Heiler und Medizinalpflanzen	22
3.3 Herstellung und Anwendung von Heilmitteln	23
3.4 <i>Daniella oliveri</i>	26
3.4.1 Systematik	26
3.4.2 Botanische Charakterisierung und Verbreitung	26
3.4.3 Verwendung in der traditionellen Medizin	26
3.4.4 Bisher bekannte Inhaltsstoffe der Pflanzen	27
3.5 <i>Vitex cienkowskii</i>	28
3.5.1 Systematik	28
3.5.2 Botanische Charakterisierung und Verbreitung	28
3.5.3 Verwendung in der traditionellen Medizin	28
3.5.4 Bisher bekannte Inhaltsstoffe der Pflanzen	29
4. Material und Methoden	30
4.1 Patch-clamp-Experimente	30
4.1.1 Zellisolation.....	30
4.1.2 Zellaufbewahrung.....	32
4.1.3 Geräte und Versuchsdurchführung.....	33
4.1.4 Herstellung der Mikroelektrodenlösung.....	35

4.1.5	Zugabe der Substanzen.....	36
4.1.6	Spannungsprotokolle und Bestimmung der Schwelle für die Auslösung des Natrium-Stroms (I_{Na}).....	36
4.1.7	Statistische Auswertung	38
4.2	Kontraktionskraftmessung an isolierten Papillarmuskeln.....	38
4.2.1	Präparation der Muskeln	38
4.2.2	Versuchsapparatur	39
4.2.3	Versuchsdurchführung	41
4.2.4	Kalibrierung	42
4.2.5	Auswertung	42
4.3	Aktionspotential-Messung an isolierten Papillarmuskeln.....	43
4.3.1	Präparation der Muskeln	43
4.3.2	Geräte und Versuchsdurchführung.....	43
4.3.3	Auswertung	45
4.4	Kontraktionskraftmessung an isolierten Aortenringen	46
4.4.1	Messprinzip	46
4.4.2	Präparation der Aorta	46
4.4.3	Versuchsapparatur	46
4.4.4	Noradrenalin-induzierte Kontraktion	47
4.4.5	Kalium-induzierte Kontraktion	48
4.4.6	Kalibrierung	49
4.4.7	Auswertung	50
4.5	Wirkung auf die glatte Muskulatur der Trachea	51
4.5.1	Präparation der Trachea	51
4.5.2	Versuchsapparatur.....	52
4.5.3	Versuchsdurchführung	52
4.5.4	Kalibrierung und Auswertung.....	53
4.6	Chemische Untersuchung.....	53
4.7	Referenzsubstanzen	53
4.8	Pflanzenextrakte	54
4.9	Statistische Auswertung	57
4.9.1	Standardfehler	57
4.9.2	Berechnung des EC_{50} -Werts.....	57
5.	Ergebnisse.....	58
5.1	Einfluss der Erhöhung der extrazellulären Magnesium- und Kalium- Konzentration auf die Schwelle für die Auslösung des Natrium-Stroms	58
5.1.1	Magnesium	58
5.1.2	Kalium.....	62
5.1.3	Natrium.....	65
5.1.4	Einfluss einer anti- und einer proarrhythmischen Substanz auf die Schwelle für die Auslösung des Natrium-Stroms	66
5.1.4.1	Sotalol.....	66
5.1.4.2	Veratridin	67
5.1.5	Einfluss von verschiedenen Flavonoiden auf die Schwelle für die Auslösung des Natrium-Stroms	68

5.2	<i>Daniella oliveri</i>	69
5.2.1	Chemische Untersuchung.....	69
5.2.2	Einfluss von <i>D. oliveri</i> -Extrakten auf die Aktionspotentialparameter von Papillarmuskeln des Herzens	71
5.2.2.1	Wirkung des MeOH-Extraktes bei 1Hz	71
5.2.2.2	Wirkung des MeOH-Extraktes bei 0,2 Hz	73
5.2.2.3	Hexan-Extrakt	76
5.2.2.4	CH ₂ Cl ₂ -MeOH-Extrakt	79
5.2.3	Referenzsubstanz: Sotalol	81
5.2.3.1	Wirkung von Sotalol bei 1 Hz.....	81
5.2.3.2	Wirkung von Sotalol bei 0,2 Hz.....	83
5.2.4	Wirkung von Kalium auf die APD nach Einwirkung von Sotalol oder dem Methanol-Extrakt von <i>D. oliveri</i>	86
5.2.5	Einfluss von <i>D. oliveri</i> -Extrakten auf die Kontraktion von Meerschweinchen-Aortenringen.....	88
5.2.5.1	Noradrenalin-induzierte Kontraktionen	88
5.2.5.2	Kalium-induzierte Kontraktionen	89
5.2.5.3	Einfluss von Sotalol, Amiodaron und Clofilium auf Noradrenalin-vorkontrahierte Aortenringe	91
5.2.5.4	Einfluss von Flavonoiden auf Noradrenalin-vorkontrahierte Aortenringe ..	92
5.2.6	Einfluss von <i>D. oliveri</i> -Extrakten auf die Kontraktion isolierter Papillarmuskeln.....	93
5.2.7	Einfluss von <i>D. oliveri</i> -Extrakten auf die Kontraktion der Meerschweinchen-Trachea	95
5.3	<i>Vitex cienkowskii</i>	97
5.3.1	Chemische Untersuchung.....	97
5.3.1	Einfluss von <i>V. cienkowskii</i> -Extrakten auf das Aktionspotential von Meerschweinchen-Herzen	98
5.3.2	Einfluss von <i>V. cienkowskii</i> -Extrakten auf die Kontraktion von Meerschweinchen-Aortenringen	100
5.3.2.1	Noradrenalin-induzierte Kontraktionen	100
5.3.2.2	Kalium-induzierte Kontraktionen	102
5.3.3	Einfluss von <i>V. cienkowskii</i> -Extrakten auf die Kontraktion isolierter Papillarmuskeln.....	103
5.3.4	Einfluss von <i>V. cienkowskii</i> -Extrakten auf die Kontraktion der Meerschweinchen- Trachea.....	105
6.	Diskussion.....	106
6.1	Einfluss von Magnesium, Kalium und Sotalol auf die Schwelle für die Auslösung des Natriumsstroms	107
6.2	<i>Vitex cienkowskii</i>	111
6.3	<i>Daniella oliveri</i>	114
6.4	Schlussfolgerungen	118
	Zusammenfassung	120
	Literaturverzeichnis	128

1. Einleitung

Kardiovaskuläre Erkrankungen gehören zu den häufigsten Todesursachen in den Industrieländern. Auch in den Entwicklungsländern sind neben den Infektionskrankheiten die Herz-Kreislauf-Erkrankungen für einen Großteil der Todesfälle verantwortlich. Diese kardiovaskulären Erkrankungen verursachen weltweit den Tod von mehr als 15 Millionen Menschen pro Jahr, d.h. fast 30 % aller Todesfälle (Maclean & Chockalingam, 1998). Die WHO erwartet in den Entwicklungsländern eine Steigerung der kardiovaskulären Krankheitsfälle. In den Industrieländern hat sich in den letzten Jahrzehnten die Zahl der Todesfälle etwas vermindert, was z.T. auf eine effektive Therapie dieser Erkrankungen zurückzuführen ist. Trotzdem sind die bei Herz-Kreislauf-Erkrankungen eingesetzten Pharmaka nicht optimal, so dass man weiter auf der Suche nach besser wirksamen und besser verträglichen Arzneimitteln ist. Dies gilt besonders für die Antiarrhythmika, die oft dramatische Nebenwirkungen aufweisen und deren Nutzen deshalb sehr umstritten ist. In den ärmeren Ländern der Welt sind moderne Herz-Kreislaufmittel oft nicht erschwinglich. Stattdessen nutzen mehr als 70 % der Bevölkerung hauptsächlich pflanzliche Produkte für die Therapie (Elujoba, 1998). Tausende Pflanzenarten werden weltweit für diese Erkrankungen, häufig ohne chemische, pharmakologische und klinische Untersuchungen, nur auf Grund individueller und überlieferter Erfahrungen in der traditionellen Heilkunde verwendet (Adjanohoun et al. 1996; Arbonier, 2002; Wagner & Wiesenauer, 1995; Weiß, 1991).

Ziel der vorliegenden Untersuchung war es, bei zwei ausgewählten, in Kamerun von traditionellen Heilern verwendeten, Arzneipflanzen, ausgehend von bestimmten Indikationen pharmakologische Wirkungen zu identifizieren. Mit dieser Methode sollte es möglich sein, die Wirksamkeit der volksmedizinisch verwendeten Arzneipflanzen zu überprüfen und nach Kenntnis der wirksamen Inhaltsstoffe eine gewisse Standardisierung vorzunehmen. Langfristig könnten

die Isolation und Modifikation von Inhaltsstoffen zur Entwicklung neuer Medikamente führen.

Traditionelle Heiler in Kamerun bzw. West-Afrika nutzen *Daniella oliveri* und *Vitex cienkowskii* für die Behandlung zahlreicher Erkrankungen wie z.B. Herzrhythmusstörungen, Kopfschmerzen, Müdigkeit und epileptische Anfälle. Wenn diese beiden Pflanzen tatsächlich diese therapeutischen Wirkungen zeigen, könnte das bedeuten, dass die Extrakte Wirkungen auf Ionenkanäle bzw. GABA-Rezeptoren besitzen. Da GABA-Rezeptoren nur im Gehirn eine große Bedeutung haben, aber keine wichtige Rolle an der Herzmuskelzelle spielen, ist anzunehmen, dass diese Extrakte möglicherweise auf Natrium-, Kalium- oder Calciumkanäle wirken. Eine einfache Möglichkeit für eine sowohl antiarrhythmische als auch antiepileptische Wirkung wäre die Minderung der Erregbarkeit der Herzmuskelzelle bzw. der Nervenzelle, das heißt eine Anhebung der Schwelle für die Auslösung des Natrium-Stroms.

Um diese Hypothese zu testen, wurden zunächst grundlegende Untersuchungen zur Beeinflussung der Schwelle durchgeführt. Ausgehend von einer Erhöhung der extrazellulären Magnesium-Konzentration, die bekanntlich die Erregbarkeit von Herzmuskelzellen und Nervenzellen vermindert, wurde der Einfluss anderer Ionen und von antiarrhythmisch und proarrhythmisch wirkenden Substanzen auf die Auslöseschwelle des Natrium-Stroms an isolierten Einzelzellen mit Hilfe der sogenannten Patch-Clamp-Technik untersucht. Es folgte eine Prüfung der Wirkung verschiedener Extrakte von *V. cienkowskii* und *D. oliveri* und von möglichen Inhaltsstoffen, deren Vorhandensein auf Grund erster chemischer Analysen vermutet wurde, auf elektrophysiologische Parameter des Herzens. Zusätzlich wurde die Wirkung der Extrakte auf die mechanische Funktion des Herzmuskels und der glatten Gefäßmuskulatur untersucht, um Informationen über eventuelle kardiovaskuläre Effekte zu erhalten.

2. Anatomischer Aufbau und Funktion des Herzens und der glatten Muskulatur der Gefäße

2.1 Allgemeine strukturelle und funktionelle Aspekte

Das Herz ist ein spezialisierter quergestreifter Muskel. Das menschliche Herz wiegt ca. 300 g. Es liegt links paramedian im Thorax und ist vom Herzbeutel umkleidet. Dabei ist es ohne sonstige Fixierung an den zu- und abführenden Gefäßen aufgehängt. Aufgabe des Herzens ist es, das aus den Körper- und Lungenvenen zufließende Blut in das arterielle System des kleinen bzw. großen Kreislaufs auszutreiben.

Abb. 2.1 zeigt einen Frontalschnitt durch das Herz und die Richtung der Blutströme. Das Blut gelangt aus den Venen (Vena cava inferior und Vena cava superior) in das rechte Atrium. Dort tritt noch eine geringe Menge venöses Blut aus dem koronaren Stromgebiet ein. Über die Trikuspidalklappe gelangt es in die rechte Kammer. Diese liegt als schmale und wenig muskelstarke Kammer dem linken Ventrikel von rechts unten an. Die rechte Kammer pumpt das Blut über die Pulmonalklappe in die Arteria pulmonalis und damit in die Lunge. Das Blut kommt aus der Lunge über die Vv. pulmonales zurück in den linken Vorhof und über die Mitralklappe in den linken Ventrikel. Der linke Ventrikel ist gegenüber dem rechten wesentlich kräftiger gebaut. Das Blut wird in die Aorta über die Aortenklappe ausgetrieben und damit in den ganzen Körper.

Um ihre Aufgabe erfüllen zu können, haben die Herzmuskelzellen im Laufe der Evolution ein komplexes System aus kontraktile Proteinen und speziellen Membransystemen entwickelt.

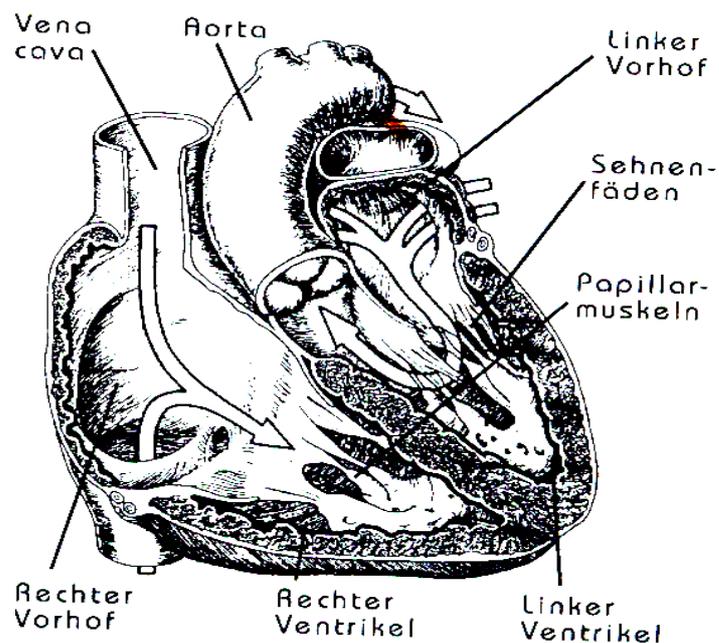


Abb.2.1 Frontalschnitt durch das Herz mit geöffneten Vorhöfen und Kammern. Die Pfeile geben die Richtung der Blutströme an (nach Schmidt & Thews, 1990).

2.2 Herzmuskelzellen

Bei den Herzmuskelzellen oder Kardiomyozyten kann man Vorhof- und Kammermuskelzellen unterscheiden. Im Vergleich zu den Zellen der Vorhofmuskulatur, die mit ca. 10 μm Breite und 20 μm Länge relativ klein sind, wirken die ziegelsteinförmigen Kardiomyozyten der Kammermuskulatur mit 10 – 20 μm Breite und 70 – 120 μm Länge ungleich imposanter. Bereits unter dem Lichtmikroskop lässt sich die typische Querstreifung der Zellen erkennen.

Umhüllt werden die Herzzellen von einer komplexen Membran, dem Sarkolemm.

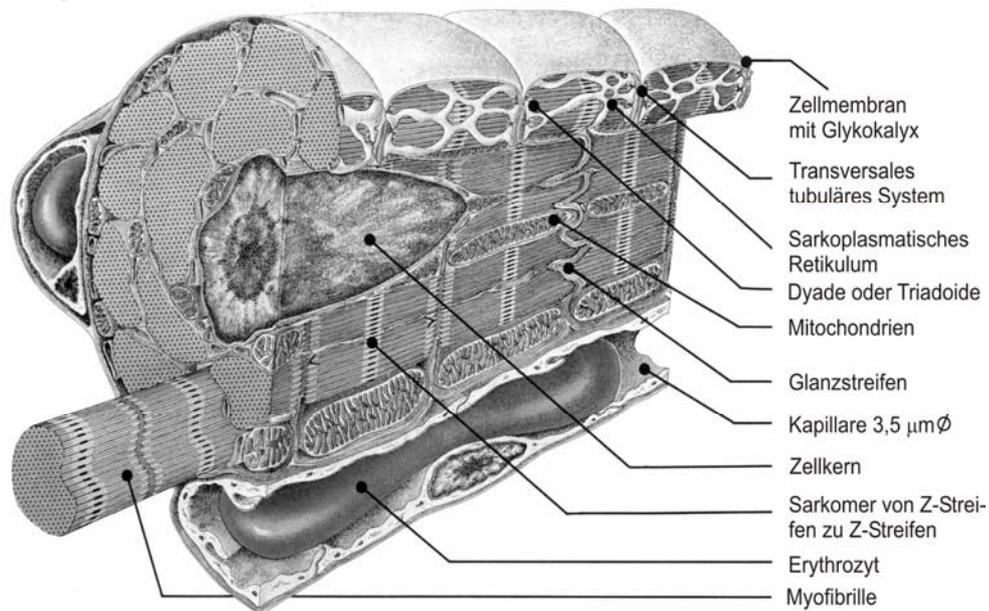


Abb.2.2: Schematische Darstellung einer Herzmuskelzelle mit anliegenden Kapillaren (nach Lossnitzer et al., 1983).

Im Zellinneren befinden sich die Zellorganellen, nämlich die Mitochondrien, das sarkoplasmatische Retikulum und der kontraktile Apparat, die Myofibrillen. Im Gegensatz zu den Muskelzellen der Skelettmuskulatur besitzt jede Herzmuskelzelle nur einen Zellkern (Abb.2.2).

2.3 Die Zellmembran

Das Sarkolemm besteht aus der typischen mehrschichtigen Zellmembran: Den äußeren Abschluss bildet die Glykokalyx. Ihr folgt das Plasmalemm mit der charakteristischen Phospholipid-Doppelschicht. Den Abschluss nach innen bildet schließlich eine dünne Schicht von Mikrofilamenten, die für den strukturellen Zusammenhalt sorgt.

Die Zellmembran der Kammermuskulatur stülpt sich in regelmäßigen Abständen ein (sogenannte transversale oder T-Tubuli) und bildet so das tiefe,

röhrenförmige, die Zelle durchdringende transversale tubuläre System. Bei den kleinen Zellen des Vorhofs kommen die transversalen Tubuli nicht vor. Obwohl die T-Tubuli nicht mit den Organellen des Intrazellulärraums in direkten Kontakt treten, sind sie für die Weiterleitung von elektrischen Potentialen in der Tiefe der Zellen wichtig. In die Phospholipid-Doppelschicht des Sarkolemms ist eine Reihe von transmembranären Proteinen eingebettet, die ihre Funktion als Ionenkanäle, Carrier oder Pumpen erfüllen und so den Austausch von Informationen, sowie von Nahrungs- und Abfallstoffen der Zelle mit dem Extrazellulärraum ermöglichen. Von großer Bedeutung für die Kontraktionsauslösung sind die verschiedenen Ionenkanäle in der Zellmembran, die für eine schnelle Änderung des transmembranären Potentials und der intrazellulären Konzentrationen von Ca^{2+} , Na^+ und K^+ verantwortlich sind.

2.4 Erregungsbildungs- und Leitungssystem

Im Herzmuskel hat sich ein spezifisches Erregungsbildungs- und Erregungsleitungsgewebe entwickelt, welches sich von der Arbeitsmuskulatur durch spärliche Myofilamente unterscheidet und regellos über den Zellkörper verteilte Mitochondrien besitzt, und einen hohen Gehalt an Glykogen aufweist. Das Erregungsgewebe besteht aus dem Sinusknoten, dem AV-Knoten, dem His'schen Bündel, dem rechten und linken Tawara-Schenkel, sowie einem Netzwerk von Purkinje-Fasern und verzweigt sich in der gesamten Arbeitsmuskulatur der Ventrikel (Abb. 2.3).

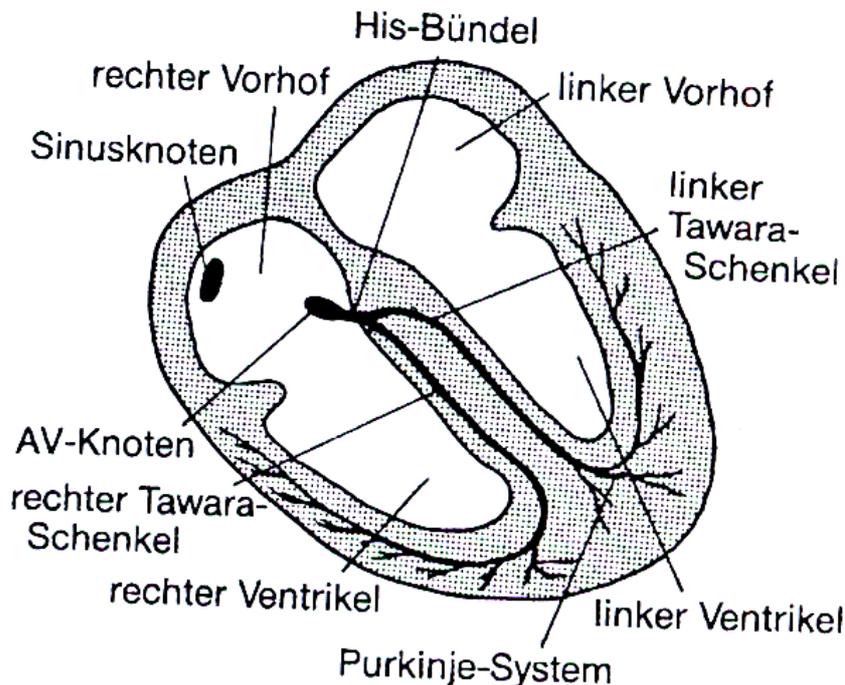


Abb. 2.3 Schematische Darstellung des Erregungsbildungs- und Erregungsleitungssystems des Herzens.

Im normalen Zustand geht der Anstoß zu einem Herzschlag vom Sinusknoten aus. Er treibt das Herz bei Körperruhe mit einer Frequenz von ca. 70 Impulsen/min an. Vom Sinusknoten breitet sich die Erregung zunächst mit einer Geschwindigkeit von 1 m/s über die Arbeitsmuskulatur beider Vorhöfe aus. Für die Überleitung auf die Kammern steht nur das Leitungsgewebe des AV-Knotens zur Verfügung, da der übrige Bereich der Vorhof-Kammer-Grenze aus unerregbarem Bindegewebe besteht. Bei der Passage des Atrioventrikularknotens erfolgt eine Verzögerung der Erregungsleitung. Das anschließende His-Bündel, die Tawara-Schenkel und ihre Endaufzweigungen, die Purkinje-Fäden, leiten die Erregung mit einer Geschwindigkeit von 2 m/s schnell weiter, so dass verschiedene Regionen der Herzkammern rasch nacheinander von der Erregung erfasst werden. Von den subendokardialen Endigungen der Purkinje-Fäden

breitet sich die Erregung dann mit einer Geschwindigkeit von 1m/s über die gesamte Kammermuskulatur aus.

Die Muskulatur der Vorhöfe und der Ventrikel bilden die Arbeitsmuskulatur und sind jeweils ein funktionelles Syncytium. Eine Erregung, die irgendwo in den Vorhöfen oder Ventrikeln entsteht, breitet sich daher über alle unerregten Fasern aus, bis auch die letzte Zelle von Vorhof bzw. Ventrikel von der Erregung ergriffen ist. Diese Tatsache liefert u.a. die Erklärung für das so genannte Alles-oder-Nichts-Gesetz, das nur für den Herzmuskel aber nicht für die Nerven- oder Skelettmuskelfasern gilt.

2.5 Das Aktionspotential der Herzmuskelzelle

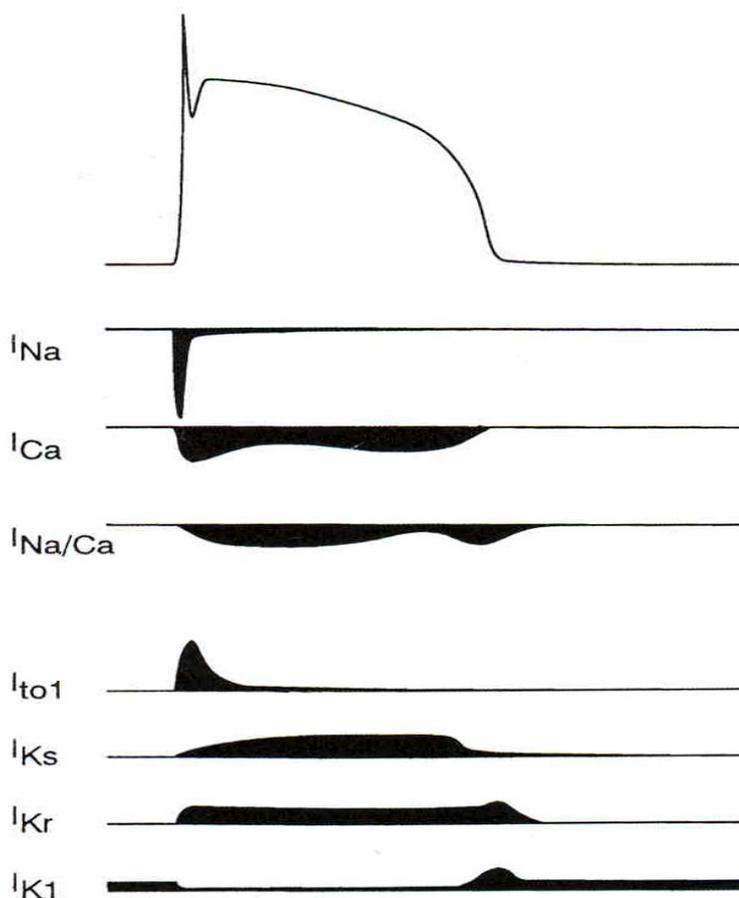


Abb. 2.4 Verschiedene Ionenströme während Ruhe und im Verlauf eines Aktionspotentials (nach Näbauer & Kääh, 1998).

Die Herzmuskelzellen sind wie Nerven- und Skelettmuskelfasern erregbar und weisen ein Ruhemembranpotential zwischen dem Intra- (negativ) und dem Extrazellulärraum (positiv) auf. Das Membranpotential des Arbeitsmyokard beträgt ca. -90 mV und stellt vorwiegend ein Kalium-Diffusionspotential dar. Abb. 2.4 zeigt das Aktionspotential (AP) einer Zelle des Arbeitsmyokards. Das AP der Arbeitsmyokardzellen ist im Vergleich zu den anderen erregbaren Zellen von ungewöhnlich langer Dauer (200-400 ms). Die schnelle Depolarisationsphase (Phase 0) wird durch einen Einstrom von Na^+ durch die Natrium-Kanäle hervorgerufen. Dieser Einstrom ist so stark, dass es kurzfristig zu einer Umkehrung des Membranpotentials kommt (Overshoot).

Darauf folgend kommt es durch einen Kalium-Ausstrom zu einer frühen Repolarisationsphase (Phase 1), an die sich, verursacht durch einen Einstrom von Ca^{2+} durch Calcium-Kanäle, die typische Plateauphase des Aktionspotentials (Phase 2) anschließt. Die Repolarisationsphase (Phase 3) des AP wird durch einen starken Kalium-Ausstrom verursacht. Im Vergleich zu Erregungsbildungs- bzw. leitungsgewebe, das eine diastolische (Phase 4) Depolarisation aufweist, zeigen ventrikuläre Arbeitszellen normalerweise keine spontane Aktivität (vgl. Schram et al., 2002).

2.6 Ionenkanäle in der Herzmuskelzellmembran

Ionenkanäle sind wassergefüllte Poren in der Zellmembran aller Zellen des Körpers (Abb. 2.5). Gebildet werden Ionenkanäle aus glykosilierten Proteinketten, die in homologe Untereinheiten gegliedert werden können. Ihre Offenwahrscheinlichkeit hängt je nach Ionenkanal von der Bindung eines chemischen Effektors (z.B. Neurotransmitters) oder von der an der Zellmembran herrschenden Spannung ab.

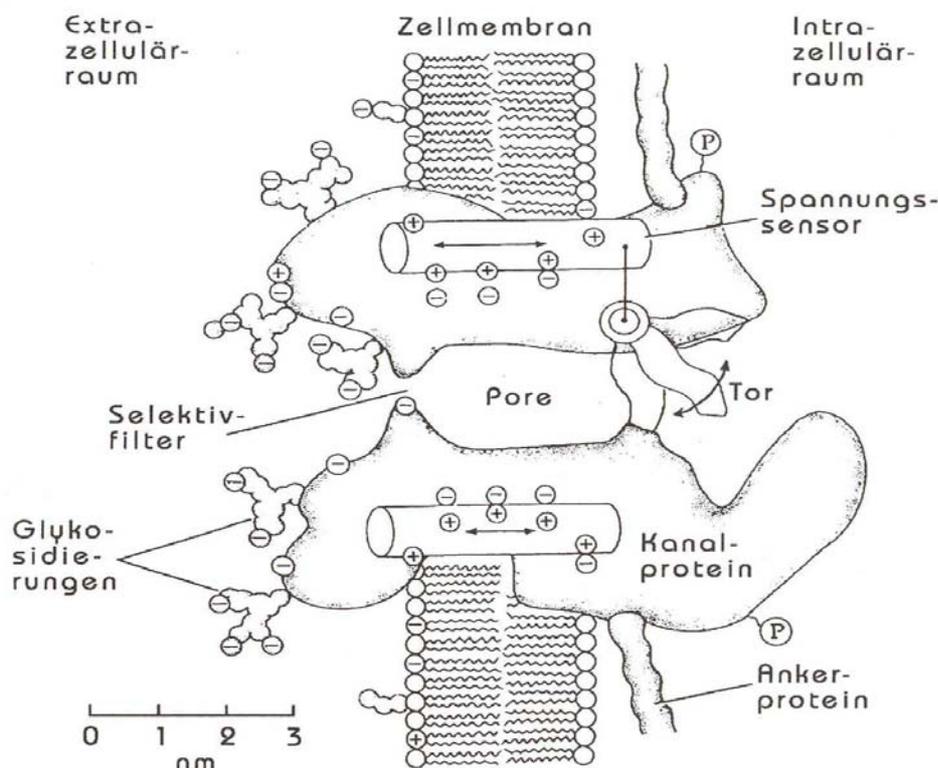


Abb.2.5 Schematische Darstellung eines spannungsabhängigen Ionenkanals in der Zellmembran (modifiziert nach Hille, 1992).

Die Einteilung der Ionenkanäle erfolgt je nach Steuerungsmechanismus in potentialgesteuerte Kanäle (voltage-operated channels, VOC's) und in rezeptor-gesteuerte Ionenkanäle (receptor-operated channels, ROC's).

Potentialgesteuerte Kanäle reagieren auf die Änderung des elektrischen Potentials an der Zellmembran mit der Öffnung bzw. dem Verschließen der Kanalporen. Beispiele für VOC's sind folgende Kationen-Kanäle der Herzmuskelzellen: Natrium-Kanal, L-Typ-Calcium-Kanal, T-Typ-Calcium-Kanal und Kalium-Kanal.

2.6.1 Calcium-Kanäle

Ausgehend von der Potentialabhängigkeit lassen sich Calcium-Kanäle in LVA (low voltage activated channels) und HVA (high voltage-activated channels) einteilen. Weitere Möglichkeiten der Einteilung sind ihre pharmakologische Beeinflussbarkeit (z.B. Dihydropyridin-sensitiv, Phenylalkylamin-sensitiv) oder der Zeitverlauf ihrer Aktivierung und Inaktivierung (siehe Carbone & Swandula, 1991). So unterscheidet man z.B. den T-Typ („tiny“ oder „transient“) vom L-Typ („long lasting“). Abb. 2.6. zeigt den phylogenetischen Stammbaum der spannungsaktivierten Calcium-Kanäle.

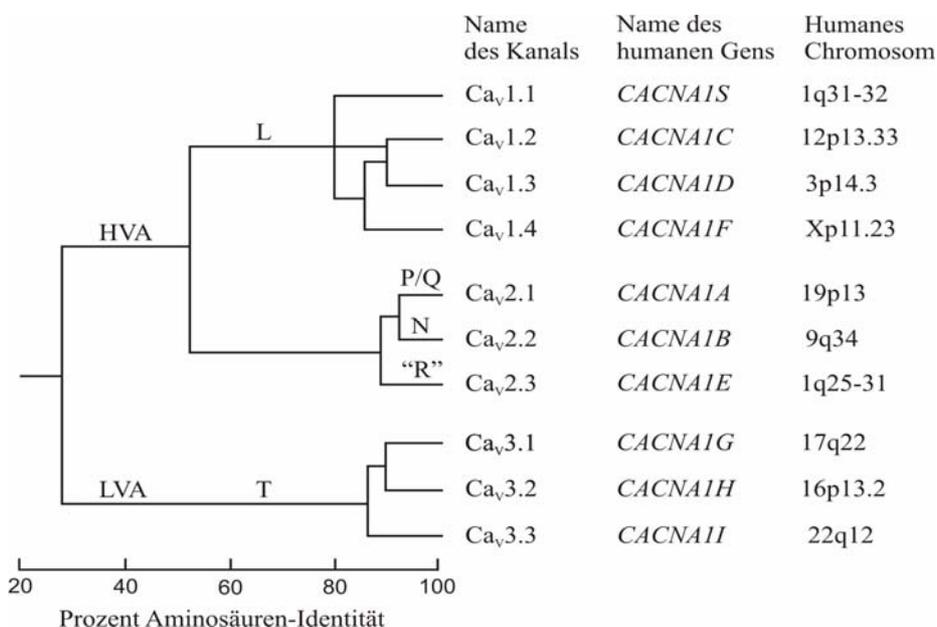


Abb. 2.6 Phylogenetischer Stammbaum der spannungsaktivierten Calcium-Kanäle (Hille, 2001).

2.6.1.1 L-Typ-Calcium-Kanäle

Die L-Typ-Calcium-Kanäle spielen bei der elektromechanischen Koppelung eine entscheidende Rolle. Diese Kanäle kommen vor allem in den Myozyten, aber auch in den glatten Muskelzellen der Gefäße und in peripheren Geweben vor. Da sie bei Potentialwerten von unter -40 mV aktiviert werden, gehören sie zu den HVA-Calcium-Kanälen

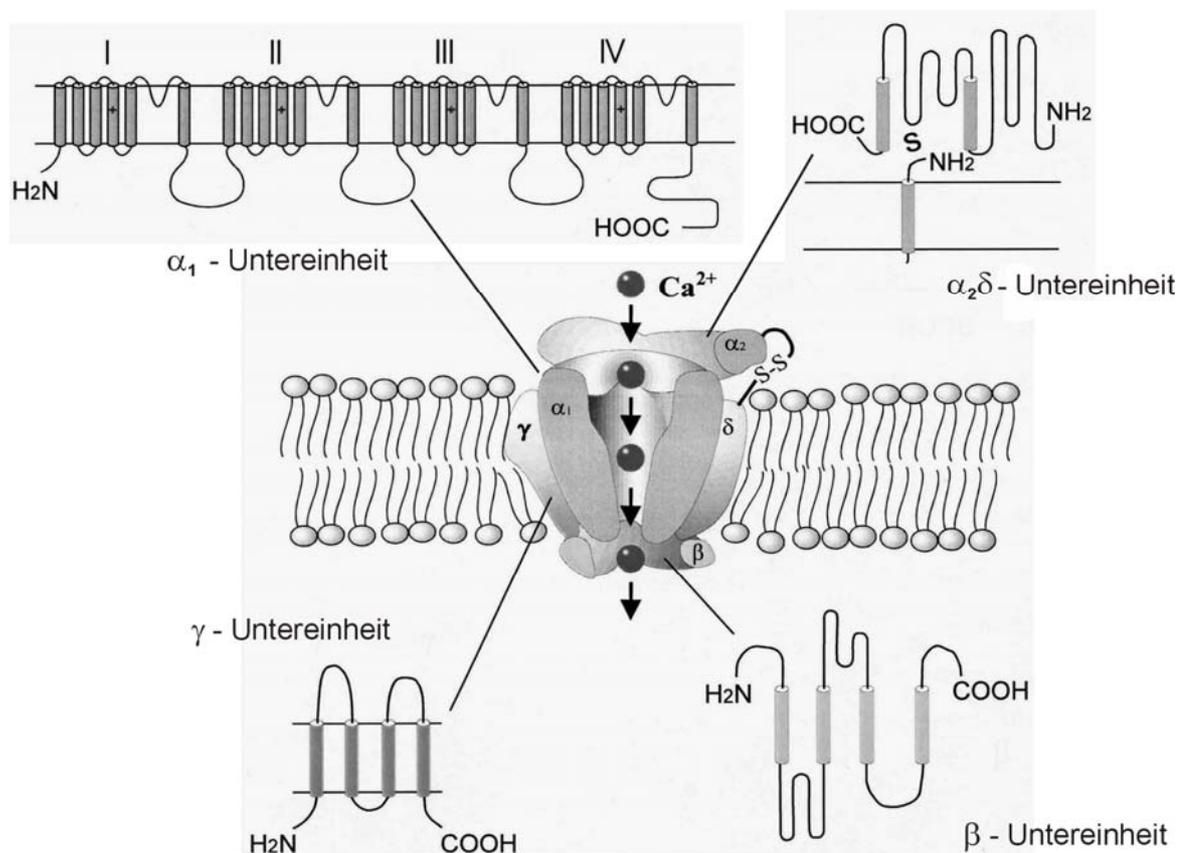


Abb.2.7 Schematische Darstellung eines L-Typ-Calcium-Kanals und dessen fünf Untereinheiten. Die extrazellulär lokalisierte α_2 -Untereinheit ist über Disulfidbrücken an die δ -Untereinheit gebunden (nach Lacinová & Hofmann, 2001).

Neben einer Änderung durch das elektrische Potential der Zellmembran gibt es weitere Möglichkeiten der Modulation dieses Kanalproteins. So wird der L-Typ-

Calcium-Kanal durch intrazelluläres Ca^{2+} inaktiviert (Eckert & Chad, 1984; Lee et al, 1985). Ebenfalls zu einer Hemmung des L-Typ-Calcium-Kanals führen die organischen Calcium-Kanal-Blocker vom Typ der 1,4 - Dihydropyridine (z.B. Nisoldipin), Phenylalkylamine (z.B. Verapamil) und der Benzothiazepine (z.B. Diltiazem) sowie einige anorganische zweiwertige Ionen, z.B. Mg^{2+} , Cd^{2+} oder Co^{2+} .

Abb. 2.7 zeigt eine schematische Darstellung eines L-Typ-Calcium-Kanals. Er besteht aus fünf Untereinheiten: α_1 , α_2 , δ , β und γ . Die α_1 -Untereinheit ist die Poren-bildende und damit die wichtigste Untereinheit. Diese Untereinheit (α_1) besteht selbst aus vier homologen Domänen mit sechs transmembranären Segmenten, von denen jeweils das vierte Segment (pro Domäne) positiv geladen ist (Klugbauer, 1999; Lacinová & Hofmann, 2001).

Eine Veränderung des Membranpotentials führt zu einer Verschiebung der positiven Ladungen und dadurch zu einer Öffnung des Kanals. Beim Calcium-Kanal des Herzmuskels fehlt die γ -Untereinheit.

2.6.1.2 T-Typ-Calcium-Kanäle

T-Typ-Calcium-Kanäle, die in erregbaren Zellen häufig vorkommen, werden bei Potentialen < -50 mV aktiviert. Die Inaktivierung erfolgt wesentlich schneller als bei den L-Typ-Calcium-Kanälen. Sie können durch Mibefradil oder Kurtoxin geblockt werden. Dennoch gibt es keine spezifischen Blocker dieser Kanäle. Mibefradil z.B. zeigt im Verhältnis von 30: 100 (L-Typ : T-Typ) noch eine deutliche blockierende Wirkung auf die L-Typ-Calcium-Kanäle.

2.6.2 Natrium-Kanäle

Natrium-Kanäle kommen in vielen erregbaren Zellen des Körpers vor. Ihre zentrale Bedeutung finden sie bei der Auslösung der elektrischen Erregung der Zelle (Aktionspotential) und deren Weiterleitung. Der spannungsaktivierte Natrium-Kanal der Herzmuskelzelle öffnet bei Potentialen von -60 bis -50 mV und gehört zu den LVA-Kanälen.

Die α -Untereinheit bildet die Pore und diese Untereinheit ist auch hauptsächlich verantwortlich für die Auslösung und Steuerung des Stroms. Wie die α -Untereinheit des spannungsabhängigen L-Typ-Calcium-Kanals besteht die α -Untereinheit des Natrium-Kanals aus vier homologen Domänen, die ihrerseits wieder sechs transmembranäre Segmente (S1-S6) enthalten (Catterall, 1992). Der Spannungssensor befindet sich in Segment S4 und enthält, ebenso wie der des L-Typ-Calcium-Kanals, an jeder dritten Position eine positive Ladung. Die Pore des Kanals wird wie beim Ca-Kanal aus der die Segmente S5 und S6 verbindenden Schleife gebildet (siehe Abb. 2.7).

Eine Hemmung von Natrium-Kanälen führt zu einer Verzögerung der Leitungsgeschwindigkeit und damit der Erregungsausbreitung im erregbaren Gewebe des Körpers oder zur völligen Unterdrückung der Erregung.

2.6.3 Kalium-Kanäle

Man kann Kalium-Kanäle in spannungsabhängige und rezeptorgesteuerte Kanäle einteilen. In der Herzmuskelzelle kommen u.a. die zu den spannungsabhängigen Kalium-Kanälen gehörenden Einwärtsgleichrichter-, verzögerten Gleichrichter- und transienten-Kalium-Kanäle vor. Diese Kanäle sind für die Repolarisation und damit für die Wiederherstellung des Ruhezustands aber auch für die Aufrechterhaltung des Ruhemembranpotentials verantwortlich. Abb. 2.4

(Seite 11) zeigt die verschiedenen Typen von Kalium-Strömen während Ruhe und während eines Aktionspotentials.

2.6.3.1 Einwärtsgleichrichter-Kalium-Strom, I_{K1}

Die Funktion des Einwärtsgleichrichter-Kalium-Stroms („inward rectifier“-Kalium-Stroms, I_{K1}) ist vor allem die Aufrechterhaltung des Ruhemembranpotentials. Dieser Strom wird während der Depolarisation nahezu vollständig abgeschaltet und wird ab einem Potential von ca. -50 mV wieder aktiviert (siehe Abb. 2.4).

2.6.3.2 Transienter-auswärtsgerichteter-Kalium-Strom, I_{to}

Dieser Strom (I_{to}) ist verantwortlich für die Kerbe des AP's (Phase 1). Die Kanäle werden unmittelbar nach der Öffnung wieder schnell inaktiviert (siehe Abb. 2.4). I_{to} kommt in den Myozyten des Meerschweinchens nicht vor.

2.6.3.3 Verzögerter-Auswärts-Gleichrichter-Kalium-Strom, I_K

Der verzögerte Auswärts-Gleichrichter-Kalium-Strom („delayed rectifier“-Kalium-Strom, I_K) bestimmt die späte Plateau-Phase des AP's am Herzen und leitet die Repolarisation ein. Man unterscheidet drei verschiedene Arten von I_K : I_{Kur} , I_{Kr} und I_{Ks} . Der I_{Kur} oder „ultra rapid delayed rectifier“-Kalium-Strom wird sehr schnell aktiviert und wird sehr spät in der Phase 3 des AP inaktiviert. I_{Kr} („rapid“) wird nicht so schnell aktiviert. Seine Aktivität nimmt zum Ende der Repolarisation zu, um dann schnell abzufallen. I_{Ks} wird im Gegensatz zu I_{Kur} und I_{Kr} langsam („slow“) aktiviert (siehe Abb. 2.4).

2.7 Elektromechanische Koppelung am Herzen

Als elektromechanische Koppelung bezeichnet man die Beziehung zwischen Erregung und Kontraktion in der Muskelzelle. Die Myokardzellen der Säugetiere haben prinzipiell gleiche Strukturelemente, die für die elektromechanische Koppelung im Herzen wichtig sind.

Das Zellinnere ist zu 85% mit Myofibrillen und Mitochondrien ausgefüllt. Die Mitochondrien stellen unter Sauerstoffverbrauch ATP für die Kontraktion der Myofibrillen bereit. Die Zellmembran der Herzmuskelzellen verästelt sich in Form kleiner Kanäle (T-Tubuli) in den Zellkörper. Diese stehen in engem räumlichen Kontakt mit dem Sarkoplasmatischen Reticulum (SR), welches als Speicher für die intrazellulären Calcium-Ionen dient.

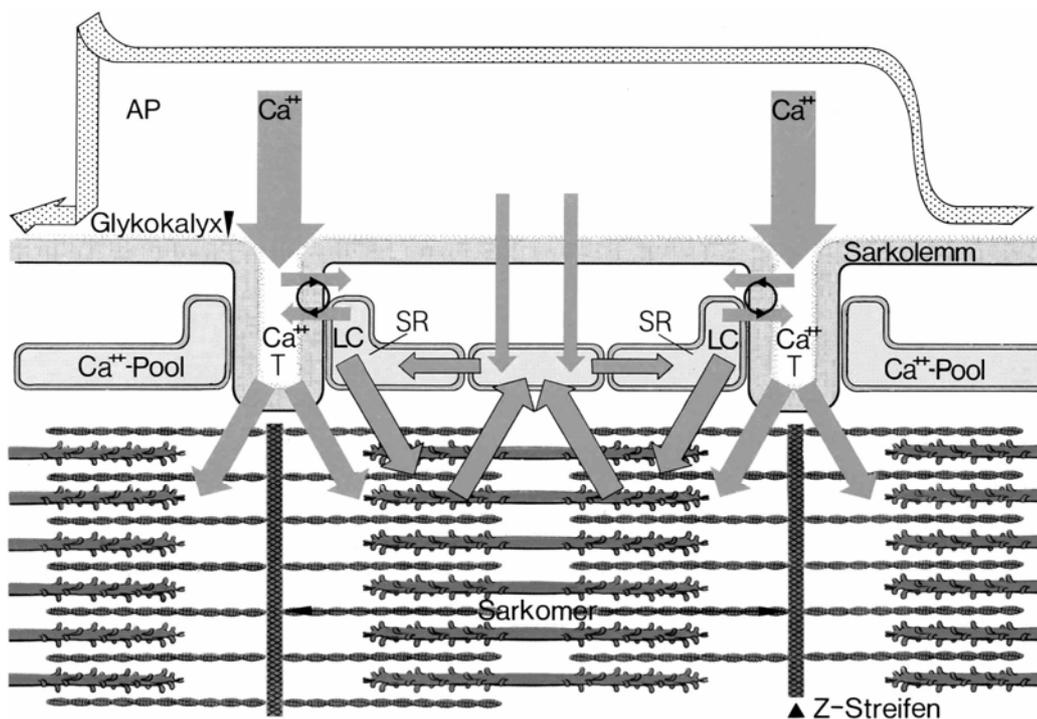


Abb. 2.8 Schematische Darstellung der Calcium-Bewegungen im Rahmen der elektromechanischen Koppelung in Herzzellen. AP: Aktionspotential, T: Transversales tubuläres System, LC: Laterale Zisterne, SR: Sarkoplasmatisches Reticulum (nach Lossnitzer et al., 1983).

Dem Calcium-Einwärtsstrom während des AP's kommt hier eine Schlüsselstellung zu. Dieses einströmende Ca^{2+} dient als eine Art „Trigger“, in dem es über Rezeptoren am Calcium-Kanal des SR's die Freisetzung von Ca^{2+} aus dem SR steuert (sogenannter „Calcium-Induced Calcium Release“ oder CICR) und damit die Kontraktion auslöst (Fabiato & Fabiato, 1977; Fabiato, 1985; Lamb, 2000; Bers, 2000; 2002 a,b). Außerdem wird das transmembranär eingeströmte Ca^{2+} im Herzen dazu verwendet, um die intrazellulären Speicher für die nächste Kontraktion wieder aufzufüllen.

2.8 Regulation der Kontraktion glatter Muskelzellen der Gefäße

Der periphere Gefäßtonus wird durch zahlreiche neuronale und humorale Effektorsysteme reguliert. Wie in den Skelett- und Herzmuskelzellen wird aber auch in der glatten Muskulatur die Kontraktion und Relaxation durch Anstieg bzw. Abnahme der freien intrazellulären Ca^{2+} -Konzentration verursacht.

Prinzipiell ist ein Ansteigen der intrazellulären Ca^{2+} -Konzentration über den Einstrom von Ca^{2+} durch Calcium-Kanäle der Zellmembran oder durch Freisetzung aus intrazellulären Speichern möglich (Barany & Barany, 1996; Rang et al, 2003). Die Bindung von Ca^{2+} an Calmodulin, ein Modulatorprotein, führt zu dessen Konformationsänderung und ermöglicht dadurch die Bindung dieses Komplexes an eine inaktive Myosin-Leichtketten-Kinase („myosin light chain kinase“; MLCK, siehe Abb. 2.9). Folge ist die Umwandlung der MLCK in ihre aktive Form, wodurch die regulatorische Myosin-Leichtkette („regulatory myosin light chain“; RLC) phosphoryliert wird. Diese Phosphorylierung der RLC steigert die Aktivität der Myosin-Mg-ATPase, was zur Kontraktion führt. Bei einem Abfallen der zytosolischen Ca^{2+} -Konzentration dissoziiert Calmodulin von der MLCK wieder ab. Dadurch konvertiert die Kinase wieder in ihre inaktive Form. Es folgt die Dephosphorylierung der RLC und die Verminderung der Mg-ATPase. Der Muskel relaxiert wieder.

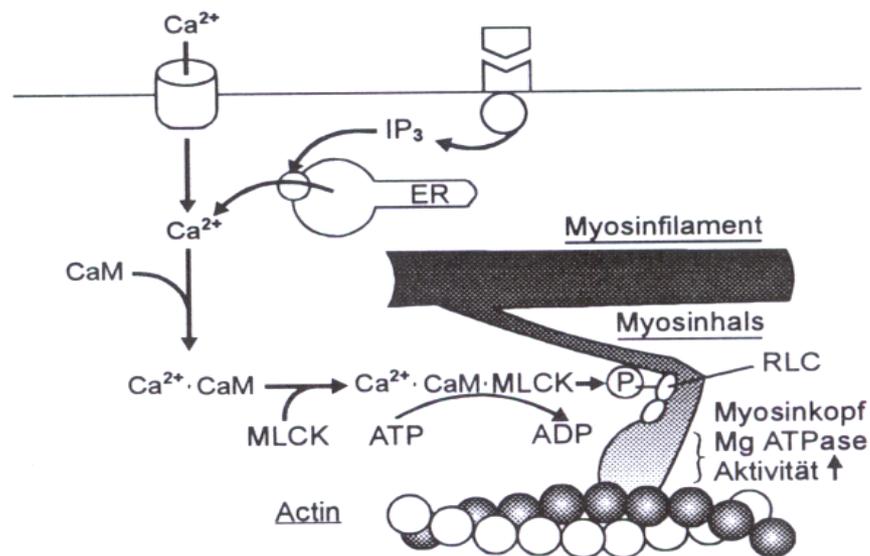


Abb. 2.9 Schematische Darstellung der Kontraktion glatter Muskelzellen. Eine Erhöhung der intrazellulären Ca^{2+} -Konzentration kann durch Ca^{2+} -Einstrom durch Calcium-Kanäle und durch Freisetzung aus dem Endoplasmatischen Retikulum (ER) zustande kommen. Nach Bindung von Ca^{2+} an Calmodulin wird durch den Ca^{2+} -Calmodulin-Komplex die Myosinleichtketten-Kinase (MLCK) aktiviert, was wiederum zur Phosphorylierung der Regulatorischen Leichtkette (RLC) führt. Folge ist eine Aktivierung der Myosinkopf-Mg-ATPase und die Kontraktion des Muskels (aus Barany & Barany, 1996).

3. Traditionelle Medizin in Kamerun

3.1 Geographie und Biodiversität

Die Fläche von Kamerun beträgt 475.442 km², wovon 155.330 km² Regenwaldgebiet sind. Es liegt in Zentralafrika zwischen dem 2. und 13. nördlichen Breitengrad und dem 8. und 16. östlichen Längengrad. In Kamerun leben ungefähr 16 Millionen Menschen.

Der Westen ist von vulkanischem Gebirge bestimmt, das in Küstennähe die höchste Erhebung Westafrikas, den vulkanisch noch aktiven Kamerunberg (4100 m) bildet. Immergrüner tropischer Regenwald erstreckt sich in der Küstenebene Kameruns sowie im Süden des Landes. In den zentralen Landesteilen geht der Regenwald in Savanne über. Die Waldgebiete sind Lebensraum einer artenreichen Flora und Fauna.

Die ökologische Biodiversität Kameruns ist eine der größten in Afrika. Der Hauptgrund für die hohe Biodiversität der Wälder ist die Tatsache, dass es sich hierbei um ein sehr altes und stabiles System handelt (Cheek & Cable, 1997; Wieckhorst, 2002). Die Fauna ist abwechslungsreich und weist eine hohe Dichte an Großwild auf. Kamerun besitzt ca. 300 Säugetierarten und 850 Vogelarten (Wieckhorst, 2002). Die Flora enthält mehr als 9000 Pflanzenarten, von denen wiederum mindestens 160 endemisch sind (Wieckhorst, 2002). Mehrere Arten stehen nach dem Washingtoner Artenschutzabkommen unter nationalem und internationalem Schutz.

3.2 Traditionelle Heiler und Medizinalpflanzen

In Übereinstimmung mit der WHO ist ein traditioneller Heiler *„eine Person, die von der Gemeinschaft, in der sie lebt, als fähig anerkannt wird, Gesundheitsfürsorge durch die Anwendung pflanzlicher, tierischer oder*

mineralischer Substanzen und bestimmter anderer Methoden zu betreiben, die auf dem sozialen, kulturellen und religiösen Hintergrund sowie auf Kenntnissen, Verhaltensweisen und Glaubensvorstellungen beruhen, die in der Gemeinde bezüglich physischem und sozialem Wohlergehen und der Verursachung von Krankheit und Behinderung, vorherrschen“ (Wieckhorst, 2002). Kamerunische Heiler besitzen eine anerkannte Position innerhalb der Gemeinschaft. Sie besitzen medizinische und botanische Kenntnisse. Sie haben „Zugang“ zur natürlichen und übernatürlichen Welt und können somit Krankheiten heilen, die natürlichen oder übernatürlichen Ursprung sind. In der kamerunischen Volksmedizin werden Tiere nur sehr selten verwendet.

Adjanohoun et al. (1996) konnten bei einer ethnobotanischen Inventarisierung der Heilpflanzen von Kamerun mit Hilfe von lokalen traditionellen Heilern mehr als 2000 Arten von traditionellen medizinischen Pflanzen identifizieren. Demnach besitzt Kamerun etwa doppelt so viele traditionelle medizinische Pflanzen wie China, dessen Zahl an Heilpflanzen auf etwa 1000 geschätzt wird (Cordell, 2000).

Von den ausgewählten kamerunischen Heilpflanzen, die im Labor chemisch, pharmakologisch und toxikologisch untersucht wurden, zeigten ca. 90 % Eigenschaften, die von den traditionellen Heilern vorausgesagt wurden (Mbi & Bilikha, 1998). Mehr als 80 % der Bevölkerung nutzen diese traditionelle Heilkunde und ca. 95 % der Tierzüchter behandeln ihre Tiere mit pflanzlichen Substanzen.

3.3 Herstellung und Anwendung von Heilmitteln

Traditionelle Heilmittel wurden über Jahrhunderte hinweg entwickelt. In der kamerunischen traditionellen Medizin werden Baumstammrinden (wie bei *D. oliveri* und *V. cienkowskii*), Blätter und Wurzeln als Heilmittel verwendet. Ebenfalls können Früchte, Harze, Pflanzenstiele oder ganze Lianenstücke

medizinische Wirksamkeit aufweisen. Abb. 3.1 zeigt ein Beispiel der Zubereitungsschritte für die Herstellung von Medizin aus Baumstammrinden.

Obwohl die Behandlung mit traditionellen medizinischen Pflanzen teilweise erfolgreich ist, gibt es, ähnlich wie in der europäischen traditionellen Phytotherapie, eine Menge ungelöster Probleme. So bestehen z.B. ausufernde Indikationslisten, d.h. sehr verschiedene Erkrankungen werden mit der gleichen Pflanze behandelt und umgekehrt wird eine Erkrankung mit ganz verschiedenen Pflanzen behandelt. Außerdem fehlen moderne medizinische Test-Methoden sowohl zur Diagnose der Krankheiten als auch zur Kontrolle der Änderung des Zustandes der Patienten, die durch traditionelle Medizin behandelt werden.

Die benutzten Pflanzeninhaltsstoffe sind meistens unbekannt. Die Zubereitungsschritte sowie die verwendete Dosis (siehe Abb. 3.1) hängen vom jeweiligen traditionellen Heilern ab.

Ziel der vorliegenden Untersuchung war es, ausgehend von bestimmten Indikationen pharmakologische Wirkungen und Hinweise auf die dafür verantwortlichen Inhaltsstoffe zu erhalten. Dies könnte zur Standardisierung der volksmedizinisch verwendeten Drogen und langfristig zur Entwicklung neuer Medikamente führen.

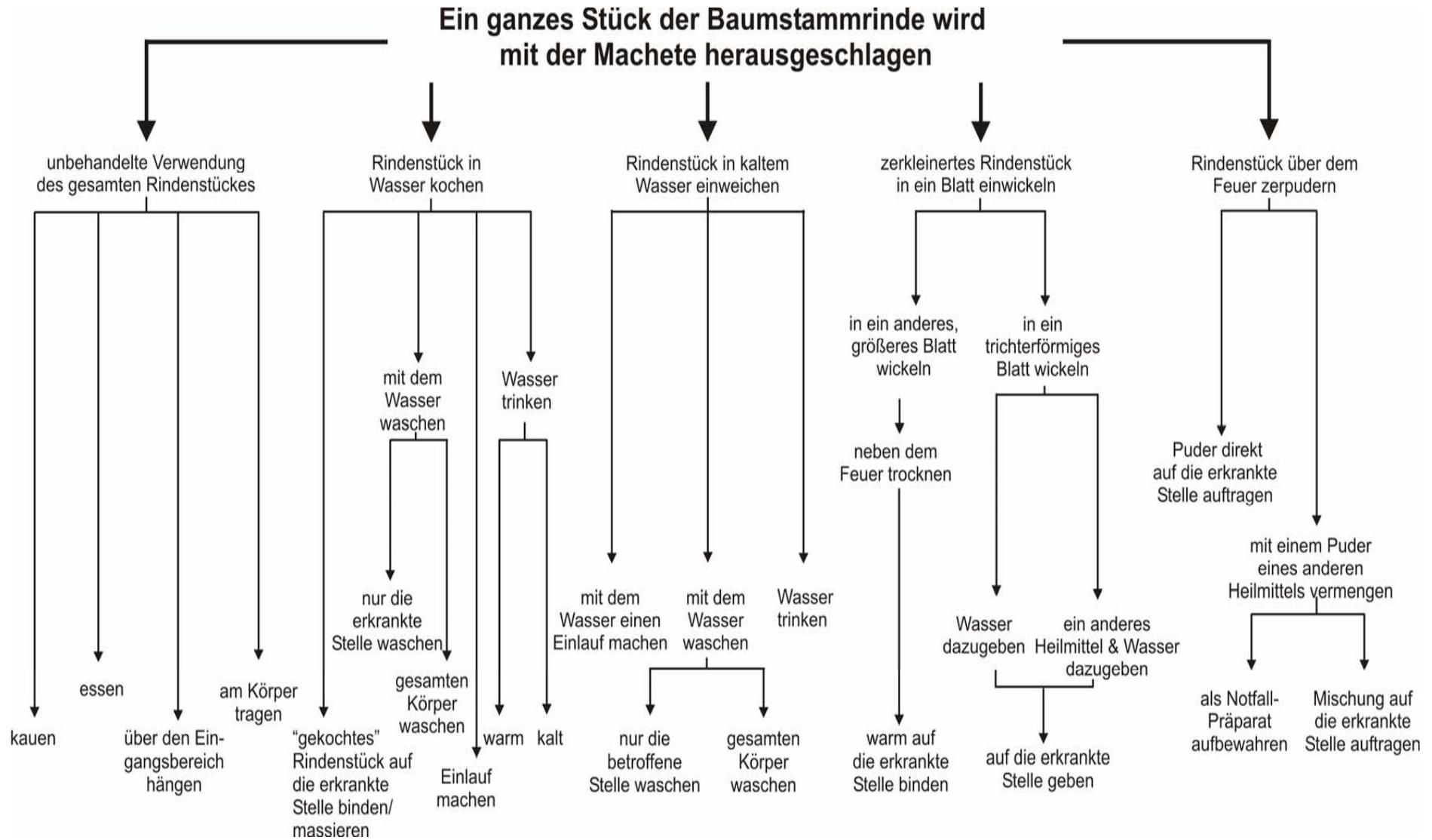


Abb. 3.1 Herstellung und Verwendungsweisen von Heilmitteln aus Baumstammrinden (nach Wieckhorst, 2002).

3.4 *Daniella oliveri*

3.4.1 Systematik

Daniella oliveri (Rolfe) Hutch. & Dalz. wird auch als *Paradaniella oliveri* Rolfe, *D. thurifera* Benn., bezeichnet. Sie gehört zur Familie der Cesalpiniaceae, Unterfamilie: Leguminaceae, Ordnung: Rosales, Überklasse: Archichlamideae, Klasse: Dicotyledonae, Abteilung: Angiospermae (Arbonnier, 2002).

3.4.2 Botanische Charakterisierung und Verbreitung

D. oliveri ist ein großer Baum von 15-20 m Höhe. Die Krone ist flach und voll. Der gerade Stamm ist grau-weiß. Wenn das Laub zu sprießen anfängt, sind die Blätter teilweise rosa und teilweise rot. Während dieser Zeit (Anfang der Regenzeit) trägt der Baum Blüten. Von der grauen Rinde des Stammes lösen sich kleine runde Anteile ab wodurch das rote Harz sichtbar wird.

D. oliveri wächst in der sudanesischen und guineanesischen Savanne, d.h. von Senegal durch Nigeria, Kamerun, Angola und Kongo bis zum Sudan.

3.4.3 Verwendung in der traditionellen Medizin

D. oliveri wird in Kamerun und anderen afrikanischen Ländern für die Behandlung von vielen Krankheiten verwendet. Verschiedene Pflanzenteile werden als Heilmittel benutzt.

Die Wurzeln von *D. oliveri* werden in der traditionellen Medizin u.a. für die Behandlung von Dysmenorrhö, Unfruchtbarkeit, Wahnsinn und als Diuretikum verwendet. Die Rinde wird u.a. gegen Schlafstörungen, Kopfschmerzen, Migräne, Epilepsie, Herzrhythmusstörungen, Hepatitis und Tuberkulose verwendet. Die Rinde dieser Pflanze wird meistens in Wasser gekocht und als Dekokt getrunken (vgl. Abb. 3.1)

3.4.4 Bisher bekannte Inhaltsstoffe der Pflanzen

In bisherigen chemischen Analysen wurden bereits mehrere Inhaltsstoffe von *D. oliveri* identifiziert. So fanden sich Phloroglucinole (Olitunji & Onamusi, 1993), Linol-Säure (linoleic acid, Balogun & Fetuga, 1985), Daniella-Säure (daniellic acid; Haeuser & Lombard, 1961; Mills & Natl, 1973), Oliverin-Säure (oliveric acid; Haeuser et al., 1970), und Ozoin-Säure (ozoic acid, Olitunji, 2001). Onwukaeme et al., 1999 a,b identifizierten im Methanol-Extrakt von *D. oliveri* Tannine, Saponine, cyanogene herzwirksame Glykoside sowie nicht weiter charakterisierte Steroide in der n-Butanol-Fraktion.

3.5 *Vitex cienkowskii*

3.5.1 Systematik

Vitex cienkowskii Kotschy & Peyr ist auch als *V. doniana* Sweet, *V. cuneata* Schumach & Thonn, *V. umbrosa* G. Don ex Sabine bekannt. *Vitex cienkowskii* ist ein Mitglied der Familie Verbenaceae, Ordnung: Tubiflorae, Unterordnung: Verbenineae, Klasse: Dicotyledoneae, Abteilung: Angiospermae (Arbonnier, 2002).

3.5.2 Botanische Charakterisierung und Verbreitung

Der Baum ist 6-8 m hoch und hat einen geraden Stamm. Dieser kann weniger oder mehr verbogen sein. Die Krone ist rund und sehr dicht. Er blüht zu Beginn der Regenzeit. Die Korolla der Blumen ist weiß-rosa bis violett und besitzt fünf Petalen von denen eine mehr entwickelt ist. Die Früchte sind ellipsenförmig (Durchmesser ca. 2 cm) und besitzen in reifem Zustand eine violette Färbung. Die Früchte sind in der Region weit verbreitet und werden gern gegessen. Auf der Rinde sind feine graue faserige Risse zu sehen. Die Schnittfläche durch den Baumstamm ist zunächst gelb und wird durch die Luft schnell braun. *V. cienkowskii* wächst in den tropischen Regionen von Senegal bis Kamerun.

3.5.3 Verwendung in der traditionellen Medizin

Bei *V. cienkowskii* werden Wurzeln, Rinde aber auch Früchte sowie Blätter in der traditionellen Medizin genutzt. Die Wurzeln werden für die Behandlung von Dysmenorrhoe und Unfruchtbarkeit eingesetzt, die Blätter gegen Kopfschmerzen, Müdigkeit, Erkältung und Dysenterie, die Früchte werden gegen Avitaminose sowie die Rinde gegen Epilepsie, Herzrhythmusstörungen, Wahnsinn, weibliche Unfruchtbarkeit und gegen Zahnschmerzen verwendet.

Verschiedene Teile dieser Pflanze werden zusammen gekocht und im Falle von Hauterkrankungen, Panaritium, Pocken, Masern und Lepra verwendet.

3.5.4 Bisher bekannte Inhaltsstoffe der Pflanzen

Nkeng-Efouet-Alango (1987) beschrieb Ecdysone (Ajasteron C, Ecdysteron, Turkesteron) und Iridoide (Anculein, Agnusid) in der Rinde von vier kamerunischen *Vitex* Arten (*V. doniana*, *V. grandifolia*, *V. micratha*, *V. madiensis*). Diese Strukturen wurden ebenfalls in südamerikanischen und vietnamesischen *Vitex* Genera gefunden (Trinh et al, 1998; Hernandez et al., 1999; Dos Santos et al., 2001). Daneben wurden Flavonoide (Casticin, Kämpferol, Quercetagetin, Vitexin), Progestine (Progesteron, Testosteron, Androstendion), Alkaloide (Viticin) sowie ätherische Öle mit Linalool, α - und β -Pinen und essentielle Fettsäuren (Palmitin-Säure, Öl-Säure (oleic acid), Linol-Säure und Stearin-Säure) in dem bekanntesten und am besten erforschten *Vitex* (*V. agnus castus*) nachgewiesen (Gardiner, 2001).

4. Material und Methoden

4.1 Patch-clamp-Experimente

4.1.1 Zellisolation

Meerschweinchen beiderlei Geschlechts mit einem Gewicht von 250 bis 300 g (Fa. Stock, Gelnhausen, Deutschland) wurden subkutan 1500 Internationale Einheiten Heparin-Natrium (Liquemin® 25000) verabreicht. 20 min später wurden die Tiere durch zervikale Dislokation getötet und die Herzen nach rascher Eröffnung des Thorax entnommen und in Calcium-haltige modifizierte Krebs-Henseleit Lösung (KHB; Lösung 1; siehe Tab. 4.1), gebracht, die mit einem Gemisch aus 95 % O₂ und 5 % CO₂ (Carbogen) durchströmt wurde. Nach Präparation der Aorta und Entfernen des Herzbeutels und anhaftendem Binde- und Fettgewebe erfolgte eine retrograde Perfusion über eine in die Aorta eingebundene Kanüle nach der Methode von Langendorff.

Tabelle 4.1 Lösungen für die Zellisolation und die Patch-Clamp-Experimente.

	mmol/l							g/l
Lösung	NaCl	KCl	CaCl ₂	NaHCO ₃	KH ₂ PO ₄	MgCl ₂	Glukose	Albumin
1	114,9	4,75	3,2	24,9	1,18	1,18	10	-
2	114,9	2,82	1,2	24,9	1,18	0,5	10	-
3	114,9	2,82	2,4	24,9	1,18	0,5	10	-
4	114,9	4,75	-	24,9	1,18	1,18	10	-
5	114,9	4,75	0,25	24,9	1,18	0,5	10	1
6	114,9	4,75	0,25	24,9	1,18	0,5	10	10

Die für die Perfusion und anschließende Isolation verwendeten Lösungen (siehe Tab. 1.1) wurden auf einer Temperatur von 35°C gehalten und kontinuierlich mit Carbogen durchströmt.

Die Herzen wurden zunächst für 4 min mit einer Calcium-haltigen KHB-Lösung (Lösung 1, Tab. 4.1) perfundiert. Dadurch wurde das Blut aus den Koronararterien ausgewaschen. Die Perfusion führte zur Wiederaufnahme der normalen rhythmischen kontraktile Aktivität der Herzens. Es folgte eine Durchströmung mit einer Calcium-freien Lösung (Lösung 4, Tab. 4.1), ebenfalls für 4 min, wodurch die Aktivität der Herzen zum Erliegen kam. Danach wurde für 5 bis 6 min mit einer Lösung mit 0,25 mmol/l Calcium (Lösung 5, Tab. 4.1) durchströmt, die verschiedene Enzyme und Albumin enthielt (siehe Tab. 4.2). Anschließend wurden die Vorhöfe und die großen Gefäße entfernt und die Ventrikel mit einer Schere zerkleinert und weiter in Enzymlösung für 4 min inkubiert. Danach wurde die Lösung mit dem zerkleinerten Gewebe durch ein Nylon-Netz mit einer Porengröße von 500 µm filtriert und der Rückstand erneut mit Enzymlösung für weitere 4 min inkubiert und nochmals filtriert. Es resultierten 2 Fraktionen von isolierten Herzzellen, die dann für die elektrophysiologischen Versuche verwendet wurden.

Tabelle 4.2 Enzyme für die Zellisolation.

Enzym	g/l
Kollagenase (252 U/mg)	0,35
Protease (1,3 U/mg)	0,15
Trypsin (2,4 U/mg)	0,23

Die entsprechenden Mengen von Enzymen wurden zu Lösung 5 (Tab. 2.1) zugegeben, um die angegebenen Endkonzentrationen zu erreichen.

4.1.2 Zellaufbewahrung

Die Zellen konnten bei Zimmertemperatur bei ständiger Begasung mit Carbogen in Lösung 6, die 10 g/l Albumin enthielt, 5 bis 7 Stunden aufbewahrt werden. Für die Versuche wurde ein Tropfen der Zell-haltigen Lösung in das Versuchsbad gegeben. Das Versuchsbad befand sich auf dem Tisch eines inversen Mikroskops (IM 35, Fa. Zeiss, Oberkochen, Deutschland). Es hatte ein Volumen von 1,5 ml und wurde ständig mit Carbogen-gesättigter Krebs-Henseleit-Lösung mit 1,2 mmol/l Calcium, 4 mmol/l Kalium und 0,5 mmol/l Magnesium (Lösung 2, Tab. 4.1), die auf eine Temperatur von 35°C gebracht wurde, bei einer Flussrate von 4 ml/min durchströmt. Nach dem Zupipettieren wurde einige Minuten gewartet, so dass sich die Zellen am Glasboden des Versuchsbades anheften konnten. Mit Hilfe des Mikroskops wurden Zellen, die eine Ziegelstein-ähnliche Form mit klarer Begrenzung ohne Ausbuchtungen und eine gut sichtbare Querstreifung aufwiesen (Abb. 4.1), für die elektrophysiologischen Experimente ausgewählt.

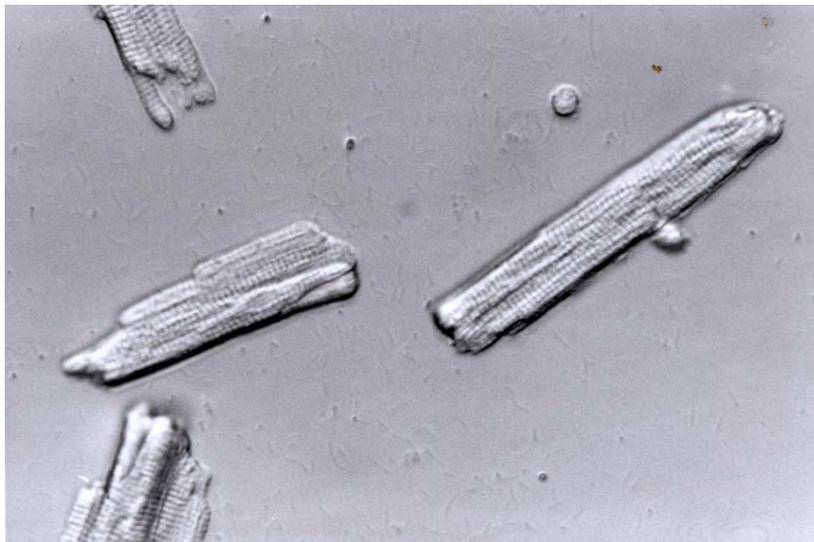


Abb. 4.1 Isolierte ventrikuläre Myozyten des Meerschweinchenherzens (Vergrößerung 400-fach).

4.1.3 Geräte und Versuchsdurchführung

Für die Patch-clamp-Experimente (Hamill et al., 1981) wurden selbst gezogene Glasmikropipetten verwendet, die mit „Intrazellulärlösung“ (siehe Tab. 4.3, Seite 37) gefüllt wurden und damit einen elektrischen Widerstand von 2 bis 4 M Ω aufwiesen. Sie waren über eine chlorierte Silberelektrode mit einem Patch-clamp-Verstärker (L/M EPC7, Fa. List Electronics, Darmstadt, Deutschland) verbunden. Eine zweite chlorierte Silberelektrode, die in die Badlösung des Versuchsbades tauchte, diente als Referenzelektrode. Signale zur Steuerung des Patch-Clamp-Verstärkers wurden mit Hilfe eines Computers erzeugt und mittels eines DA-Wandlers in analoge Signale umgewandelt. Die Mess-Signale wurden mit einem AD-Wandler auf den Computer übertragen und gespeichert.

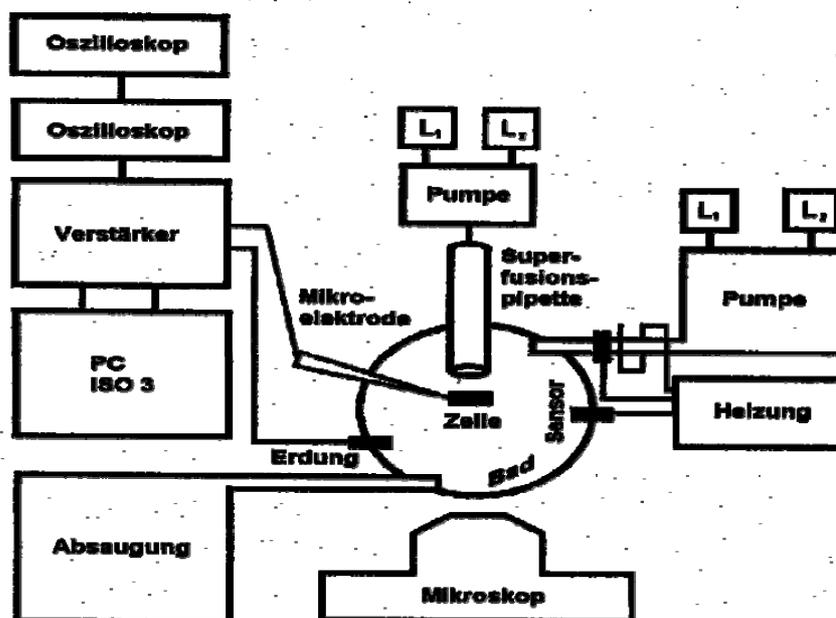


Abb. 4.2 Schematische Darstellung der Versuchsanordnung zur Messung von Ionenströmen mit Hilfe der Patch-Clamp-Technik (modifiziert nach Koch, 2000).

Es kam dabei das Mess- und Steuerprogramm Iso3-Multitasking-Patch-Clamp-Programm und eine AD/DA-Wandler-Karte der Fa. MFK, Niedernhausen, Deutschland zum Einsatz (Abb. 4.2).

Die Glasmikropipette wurde unter fortlaufender Messung des Pipettenwiderstandes an eine ausgewählte Zelle angenähert. Ein Kontakt mit der Zelle konnte durch Erhöhung des Widerstandes festgestellt werden. Durch Erzeugen eines Unterdrucks in der Pipette wurde dann ein sehr enger Kontakt hergestellt, der zu einem massiven Anstieg des Pipettenwiderstandes bis auf $1 \text{ G}\Omega$ ($10^9 \Omega$) und damit zur Ausbildung eines sog. Gigaseals führte. Durch Erhöhung des Unterdrucks konnte das Membranstück innerhalb der Pipettenspitze durchbrochen und damit ein direkter Zugang zum Intrazellulärraum der Zelle geschaffen werden (Abb. 4.3)

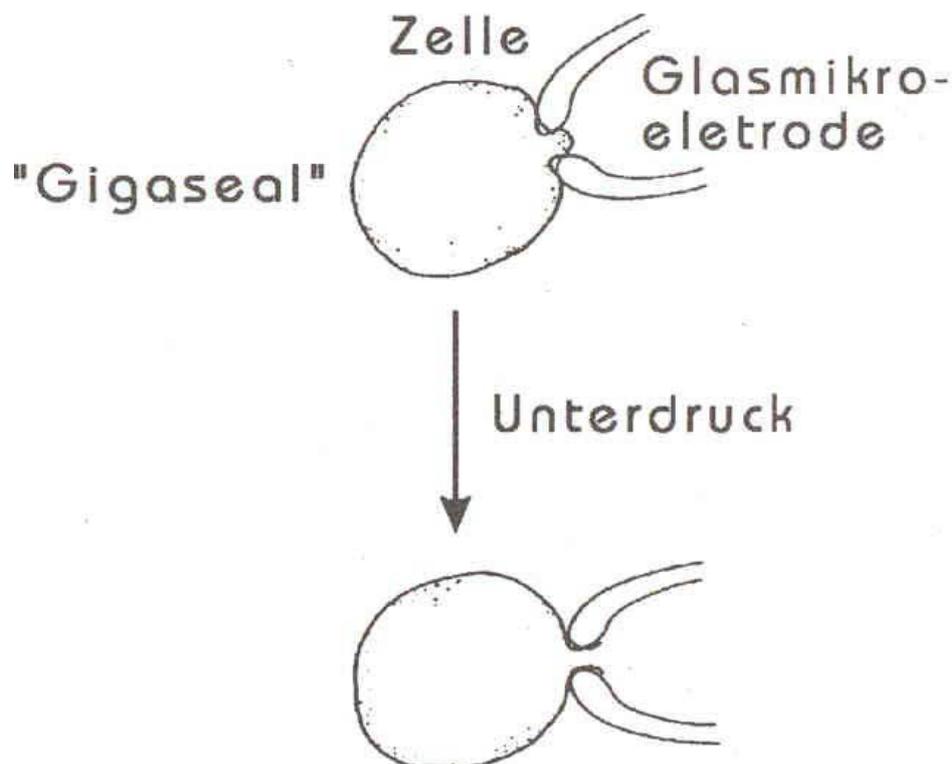


Abb. 4.3 Schematische Darstellung des Gigaseals und der Konfiguration zur Messung von Einzelkanal-Strömen sowie der Konfiguration zur Messung von Ganz-Zell-Strömen (modifiziert nach Sakmann & Neher, 1983).

4.1.4 Herstellung der Mikroelektrodenlösung

Da die Mikroelektrodenlösung nach Durchbrechen der Membran in direkten Kontakt zur Intrazellulärlösung steht, galt es hier besondere Vorkehrungen zu treffen. Die Mikroelektrodenlösung enthielt Na_2ATP für eine dauerhafte Energiezufuhr der Zelle. Das darüber hinaus in der Lösung enthaltene HEPES (4-(2-Hydroxyethyl)-piperazin-1-ethansulfonsäure) stabilisierte als Puffer den pH-Wert der Lösung. Zusätzlich enthielt die Standardmikroelektrodenlösung 0,05 mmol/l EGTA (Titriplex® IV, Bis-(aminoethyl-glycoether-N,N,N',N'-tetraessigsäure). Die Zugabe dieses Chelators sollte das freie Calcium in der Zelle auf einem natürlichen Niveau halten und die Herzmuskelzelle vor einer Calcium-Überladung bewahren.

Die pH-Wert-Einstellung erfolgte mit KOH auf 7,2 und wurde mit einem pH-Meter der Fa. Beckmann Instruments, Fullerton, California, USA überprüft. Die gebrauchsfertige Lösung wurde bis zu ihrer Verwendung bei 4°C aufbewahrt. Tab. 4.3 zeigt die Zusammensetzung der verwendeten Mikroelektrodenlösung.

Tab. 4.3 Zusammensetzung der Mikroelektrodenlösung (in mmol/l).

NaCl	KCl	MgCl ₂	HEPES	EGTA	Na ₂ ATP
mmol/l					
5	140	1	5	0,05	3

Der pH-Wert der Lösung wurde durch Zufügen von KOH auf 7,2 eingestellt.

4.1.5 Zugabe der Substanzen

Der Wechsel von 0,5 mmol/l auf eine höhere Magnesium-Konzentration erfolgte durch Überströmen der Zelle mit Hilfe einer Mikropipette, deren Carbogen-gesättigte Lösung zusätzlich zu den in der Lösung vorhandenen 0,5 mmol/l Magnesium noch 1 oder 2,5 oder 4,5 mmol/l Magnesium enthielt. Für die Magnesium-Erhöhung wurde Magnesium-D,L-Hydrogenaspartat-Tetrahydrat (Fa. Trommsdorff, Alsdorf, Deutschland) verwendet.

In Kontrollversuchen wurde gezeigt, dass das Überströmen mit einer Lösung, die mit der Badlösung identisch war, zu keiner Änderung der Schwelle führte. Eine Erniedrigung der Magnesium-Konzentration auf den ursprünglichen Wert war durch Abschalten der Überströmung möglich. In einigen Versuchen wurde die Magnesium-Konzentration mehrfach durch An- und Abschalten der Superfusion variiert. Die Wirkung einer Erhöhung der extrazellulären Natrium-Konzentration von 140 auf 143 mmol/l und die Effekte von Sotalol, Noradrenalin und Veratridin auf die Schwelle für die Auslösung des Natrium-Stroms wurden ebenfalls untersucht.

4.1.6 Spannungsprotokolle und Bestimmung der Schwelle für die Auslösung des Natrium-Stroms (I_{Na})

Das Ruhemembranpotential wurde auf -80 mV (Haltepotential) eingestellt und dann für 400 ms bei einer Frequenz von 0,2 Hz auf verschiedene Potentiale geklemmt (Voltage-Clamp-Modus; siehe Abb. 4.4). Die dazu nötigen Ströme, die den über die Zellmembran fließenden Strömen entsprechen, wurden registriert. Bei der ersten Depolarisation wurde das Membranpotential von -80 mV auf -70 mV erniedrigt. Bei den folgenden Depolarisationen wurde die Stufe um jeweils 1 mV erhöht, d.h. es wurde auf -69 , -68 usw. depolarisiert, bis ein starker Einwärtsstrom ausgelöst wurde.

Die Ströme bei Auslösung eines Natrium-Stroms waren so stark, dass die Kapazität des Patch-Clamp-Verstärkers überschritten wurde. Deshalb konnten diese Ströme nicht mehr quantitativ erfasst werden. Bei einem Strom von 10 nA trat Sättigung ein. Es resultierten deshalb maximale Ströme von 10 nA, auch wenn die zugrundeliegenden Ströme höher waren.

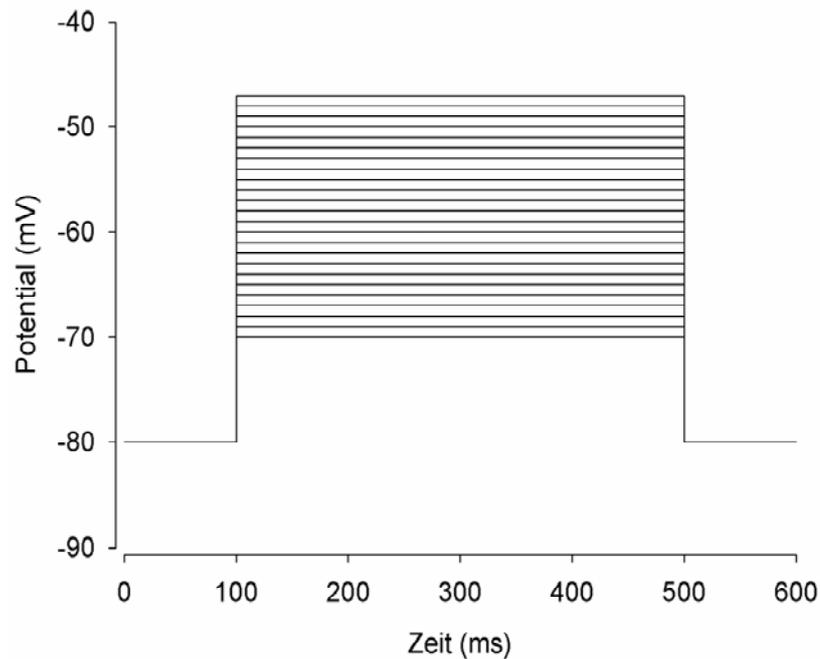


Abb. 4.4. Das Haltepotential der Zelle betrug -80 mV. Die Zelle wurde für 400 ms in einem ersten Schritt auf -70 mV und dann in 1 mV-Schritten weiter depolarisiert bis es zum Auftreten eines raschen Einwärtsstroms (Natrium-Stroms) kam.

Für die Versuchsergebnisse ist dies allerdings von geringer Bedeutung, da es in diesen Experimenten nicht auf die Absolutwerte ankam, sondern nur auf die Bestimmung der Schwelle für die Auslösung des Natrium-Stroms, d.h. ab welchen Potentialen starke Einwärtsströme zu beobachten waren.

4.1.7 Statistische Auswertung

Es wurden für jede Magnesium-Konzentration 5 bis 6 Versuche durchgeführt, wobei jeweils zwischen 0,5 und 1,5, 0,5 und 3 und 0,5 und 5 mmol/l variiert wurde. Entsprechend resultierten Werte von 16 Zellen bei 0,5 mmol/l.

Der absolute Wert für die Schwelle des Natrium-Stroms bei 0,5 mmol/l Magnesium unter Berücksichtigung aller durchgeführten Versuche lag bei $-59,94 \pm 1,07$ mV. Entsprechend wurde von diesem Schwellenwert ausgegangen und die Änderung der Schwelle durch Erhöhung der Magnesium-Konzentration berechnet (z.B. bei Erhöhung der Schwelle um 2 mV resultierte ein Schwellenpotential von $-57,94$ mV). Dies war notwendig, um eine Verfälschung der Ergebnisse durch die Zusammenfassung der verschiedenen Kontrollwerte zu vermeiden. Anzahl der Versuche bei 1,5 mmol/l: n=6; bei 3 mmol/l Magnesium: n=5; bei 5 mmol/l Magnesium: n= 5.

Aus den Werten wurden Mittelwerte und Standard-Fehler des Mittelwertes (s.e.m.) berechnet.

4.2 Kontraktionskraftmessung an isolierten Papillarmuskeln

4.2.1 Präparation der Muskeln

Meerschweinchen beiderlei Geschlechts mit einem Gewicht von 250 bis 300 g (Fa. Stock, Gelnhausen, Deutschland) wurden durch zervikale Dislokation getötet und nach sofortiger Eröffnung des Thorax wurde das Herz entnommen. Zur Präparation der Papillarmuskeln wurde das Herz in kalte, sauerstoffgesättigte Krebs-Henseleit-Lösung mit 3,2 mmol/l Ca^{2+} (Lösung 1, Tab. 4.1) eingebracht und nach Entfernung des Herzbeutels und der Vorhöfe die rechte Kammer entlang des Septums geöffnet (vgl. Abb. 4.1). Bei der Entnahme des Papillarmuskels wurde an der Basis ein Stück Kammermuskulatur und am

oberen, sehnigen Teil ein Rest des Klappenrandes belassen und auf die Vermeidung starker Dehnung geachtet. Es wurden Muskeln mit höchstens 1 mm Durchmesser verwendet, da ansonsten eine ausreichende Sauerstoffdiffusion der Muskeln für empfindliche inotrope Messungen nicht gewährleistet ist (Koch-Weser, 1963).

4.2.2 Versuchsaapparatur

Das für die Papillarmuskelversuche verwendete Organbad bestand aus einem Zweikammergefäß mit 50 ml Inhalt (Abb. 4.5). Die eine Kammer (1) diente als Aufnahme für den vertikal eingespannten Muskel, die andere Kammer (2), mit der ersten über zwei Kanäle (3) verbunden, wurde durch eine am unteren Ende angebrachte Glasfritte (5) ständig mit Sauerstoff durchperlt. Die alleinige Durchperlung der nicht den Muskel enthaltenden Kammer verhinderte eine mechanische Artefaktbildung durch die Kammerbegasung und außerdem wurde eine ständige Zirkulation der Badlösung durch beide Kammern sichergestellt. Dieses Versuchsgefäß war in einem Wasserbad (12) montiert, das mit Hilfe eines Kontaktthermometers auf konstant $35,0 \pm 0,5^\circ\text{C}$ temperiert wurde. Zur Messung der Kontraktionskraft wurden induktive Kraftaufnehmer (9) der Fa. Hottinger-Baldwin-Messtechnik, Darmstadt, BRD verwendet, die über eine Goldkette mit einer Mikroklammer aus V2A-Stahl (8) verbunden waren. Die Signale der induktiven Kraftaufnehmer wurden über ein Kathodenstrahl-Oszilloskop (Fa. Tektronix, Typ R 561 B, Baeverton, Oregon, USA) sichtbar gemacht, von dessen Schirm die Kontraktionskurven auch abphotographiert werden konnten. Hierzu wurde eine Kamera (oscilloscope camera C-27) der Fa. Tectronix, Portland, Oregon, USA mit einem Film der Fa. Polaroid, St. Albans, Herfordshire, UK verwendet.

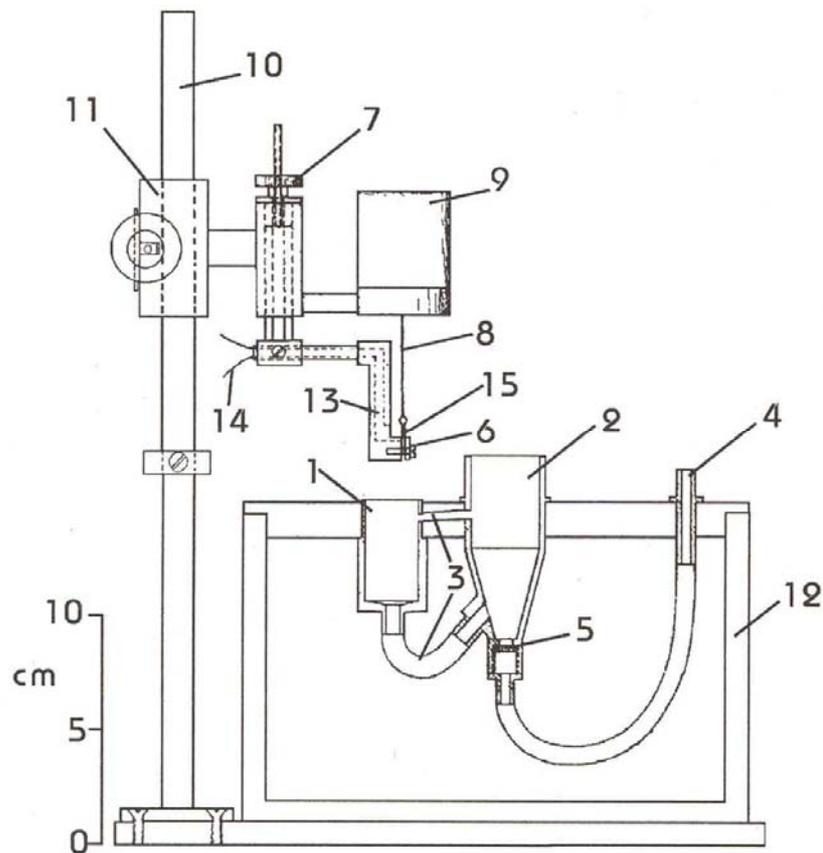


Abb. 4.5 Versuchsanordnung zur Messung der Kontraktionskraft isolierter Papillarmuskeln (modifiziert nach Reiter, 1967)

- 1 Muskelkammer
- 2 Sättigungsgefäß
- 3 Verbindungskanäle
- 4 Gaszuführung
- 5 Glasfritte
- 6 Muskelhalterung mit Reizelektrode
- 7 Feintrieb für Muskelhalterung
- 8 Kettchen mit Mikroklammer
- 9 Induktiver Kraftaufnehmer
- 10 Stativ
- 11 Stativschlitten
- 12 Wasserbad
- 13 Reizfuß
- 14 Vom Reizgerät zu den Reizelektroden
- 15 Papillarmuskel

Gleichzeitig wurden die Mess-Signale während des gesamten Versuchs kontinuierlich über einen Pigmentschreiber (Fa. Hellige, Freiburg, BRD) mit Papiervorschubgeschwindigkeit von 0,25 mm/s registriert. Nach Erreichen von steady-state-Werten wurden Kontraktionen mit einer Vorschub-Geschwindigkeit von 250 mm/s aufgenommen.

4.2.3 Versuchsdurchführung

Das Papillarmuskelende mit dem Rest der Kammermuskulatur wurde an den Reizelektroden enthaltenden Reizfuß mit einem Metallplättchen aus V2A-Stahl fixiert, das andere Ende des Papillarmuskels mit dem Klappenrandrest und der Sehne an der Mikroklammer befestigt und dann der Reizfuß in die Muskelkammer gesenkt.

Die Vorspannung der Muskeln wurde mittels eines mechanischen Feintriebes (7, Abb. 4.5), der den Abstand zwischen Reizfuß und Kraftaufnehmer variierte, auf 3,9 mN eingestellt. Dieser empirisch ermittelte Wert führt bei Meerschweinchen-Papillarmuskeln mit 0,7-1,0 mm Durchmesser nahezu zu maximaler Kontraktionskraft (Reiter, 1967). Der während der Kontraktionsphase zurückgelegte Messweg des Kraftaufnehmers beträgt bei einer maximal angenommenen Kraftentwicklung von 19,6 mN 0,04 mm. Dies entspricht bei einer durchschnittlichen Muskellänge von 3 mm ca. 1,3% der Präparatslänge; entsprechend wurden die Kontraktionen unter nahezu isometrischen Messbedingungen erzeugt.

Zu Beginn äquilibrierten die Papillarmuskeln etwa eine Stunde in der üblichen Badlösung (Lösung 1, Tab 4.1) mit 3,2 mmol/l Ca^{2+} bei einer Kontraktionsfrequenz von 1 Hz. Hierbei stellte sich die Kontraktionskraft langsam auf ein konstantes Niveau ein.

Die Zugabe von Substanzen erfolgte immer in das Sättigungsgefäß (2), so dass sie in der gewünschten Verdünnung durch den Flüssigkeitsstrom an den Muskel gelangte. Die Konzentration der jeweiligen Pflanzenextrakte wurde durch Zupipettieren kumulativ gesteigert. Nach jeder Substanzzugabe musste für die Auswertung, nachdem konstante Kontraktionskräfte erreicht waren, der ununterbrochen mitlaufende Schreiber auf Schnell-Lauf gestellt werden und jeweils eine Kontraktionskurve aufgezeichnet werden. Zusätzlich wurde eine Kontraktionskurve vom Oszilloskop abphotographiert.

4.2.4 Kalibrierung

Die Kalibrierung der induktiven Kraftaufnehmer folgte vor jedem Versuch. Die hierzu verwendeten Eichgewichte wurden an den Kraftaufnehmern befestigt und die Signale mit Hilfe des Schreibers registriert und anschließend ausgewertet.

4.2.5 Auswertung

Die mittels Schreiber aufgezeichneten Kontraktionskurven wurden folgendermaßen ausgewertet: Die Gipfelkraft (F_c) ergibt sich aus der Differenz zwischen der auf den Kraftaufnehmer während der Kontraktion wirkenden maximalen Zugkraft und der Vorspannung (siehe Abb. 4.6).

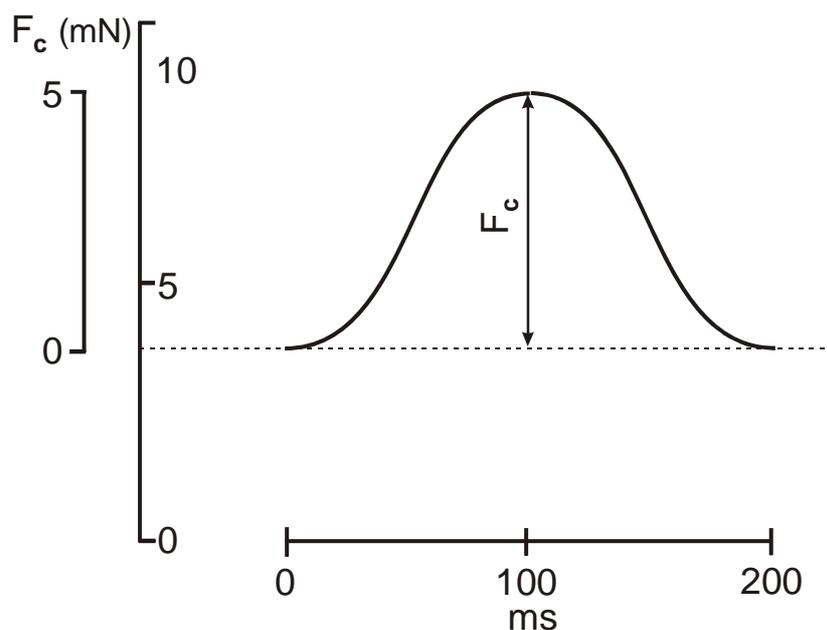


Abb. 4.6 Bestimmung der Gipfelkraft (F_c) einer isometrischen Kontraktionskurve.

4.3 Aktionspotential-Messung an isolierten Papillarmuskeln

4.3.1 Präparation der Muskeln

Für die Aktionspotentialversuche wurde der Papillarmuskel genau wie bei der Papillarmuskel-Kontraktionskraftmessung präpariert (siehe 4.2).

4.3.2 Geräte und Versuchsdurchführung

Die Abb. 4.7 stellt eine schematische Darstellung der Versuchsanordnung für das Aktionspotential dar. Das Organbad bestand wie bei der Papillarmuskel-Kontraktionskraftmessung aus einem 2-Kammergefäß, wobei der Muskel aber waagrecht eingespannt wurde (Abb. 4.7).

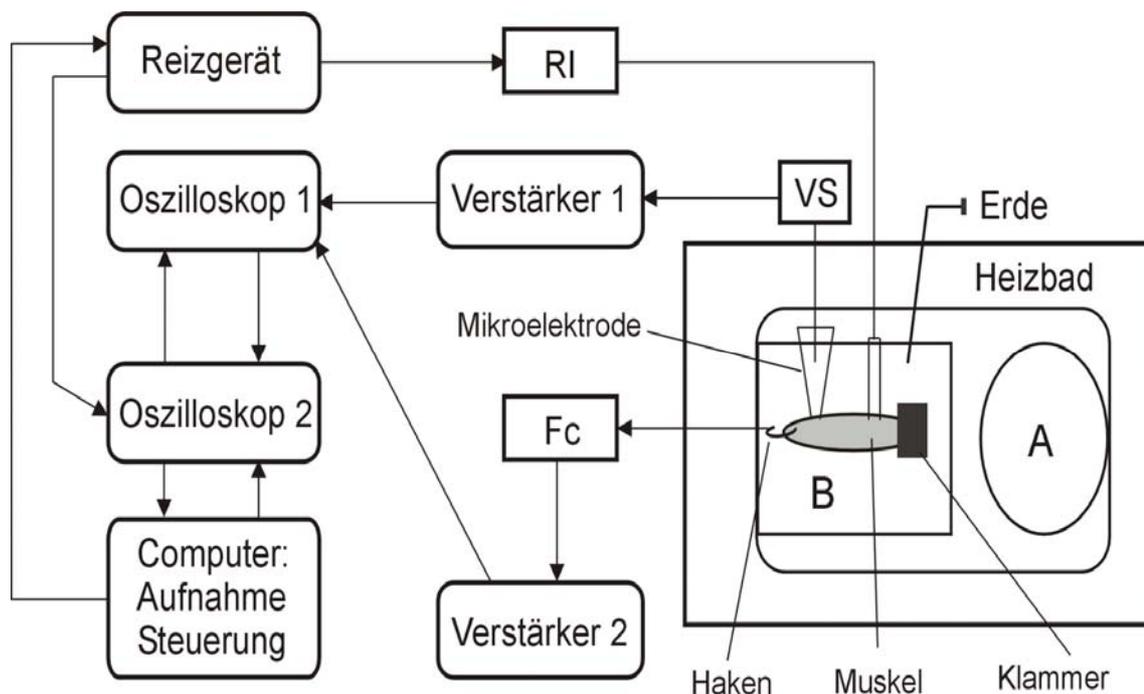


Abb. 4.7 Schematische Darstellung der Versuchsanordnung zur Messung des Aktionspotentials. A: Sättigungsgefäß, B: Muskelkammer, Fc: Induktiver Kraft-Aufnehmer, RI: Reiz-Isolier-Einheit, VS: Vorverstärker

Das Papillarmuskelende mit dem Rest der Kammermuskulatur wurde mit einem Metallplättchen in der Muskelkammer (B) befestigt und das andere Ende des Papillarmuskels mit dem Klappenrandrest an ein Häkchen gehängt und mit 3,9 mN vorgespannt.

Der Muskel konnte mit einem elektrischen Impuls (Reizgerät der Fa. Tönnies, Freiburg, Deutschland) stimuliert werden. Die Reizstärke lag knapp oberhalb der Reizschwelle. Die Steuerung des Reizgerätes mit verschiedenen Frequenzen erfolgte mit Hilfe eines Computers über einen DA-Wandler. Die Mess-Signale wurden mit einem AD-Wandler auf den Computer übertragen und gespeichert. Es kam dabei das Mess- und Steuerprogramm Iso3-Multitasking-Patch-Clamp-Programm und eine AD/DA-Wandler-Karte der Fa. MFK, Niedernhausen, Deutschland zum Einsatz.

4.3.3 Auswertung

Die Abb. 4.8 zeigt am Aktionspotential die gemessenen Größen: 1. das Membranpotential, 2. die Amplitude, 3. das Umkehrpotential (overshoot) und 4. die Aktionspotentialdauer (APD) bei 10 %, 60 % und 90 % Repolarisation. Zusätzlich wurde mit Hilfe des Iso3-Programms durch Differenzierung des Signals die maximale Depolarisations-Geschwindigkeit (V_{\max}) bestimmt.

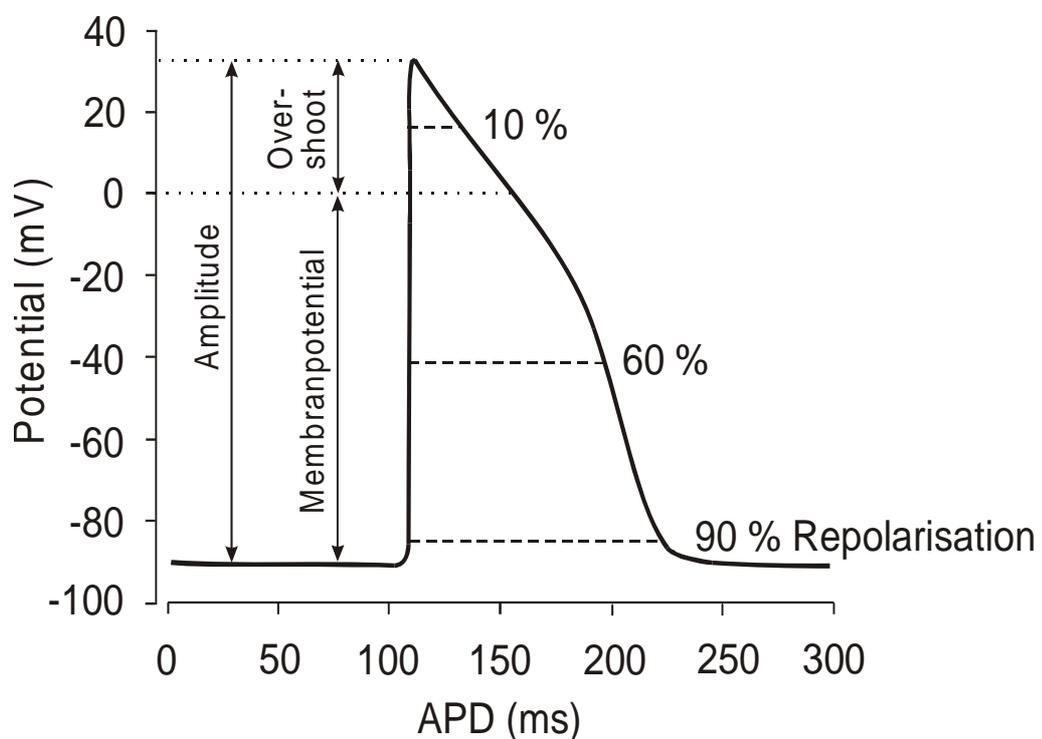


Abb. 4.8 Bestimmung von Parametern eines Aktionspotentials vom Papillarmuskel des Meerschweinchens.

4.4 Kontraktionskraftmessung an isolierten Aortenringen

4.4.1 Messprinzip

Das Testsystem beruht auf der isometrischen Messung der Kontraktionskraft isolierter Aortenringe (Hooker et al., 1977). Die Kraftmessung erfolgt mit einem induktiven Kraftaufnehmer. Der Einfluss von Testsubstanzen auf KCl- und Noradrenalin- induzierte Kontraktionen wurde ermittelt.

4.4.2 Präparation der Aorta

Meerschweinchen beiderlei Geschlechts mit einem Gewicht von 250 bis 300 g (Fa. Stock, Gelnhausen, Deutschland) wurden durch zervikale Dislokation getötet und nach sofortiger Eröffnung des Thorax wurde das Herz und ein Stück ungedehnte Aorta entnommen. In einer kalten „Extrazellulärlösung“ (Lösung 1, Tab 4.1) wurden anhaftendes Binde- und Fettgewebe entfernt und etwa 3 mm breite Aortenringe ohne Beschädigung des Endothels präpariert.

4.4.3 Versuchsaapparatur

Es wurden zylindrische Organbäder aus Borosilikatglas mit einem Badvolumen von 5 ml verwendet. Die Gefäße besaßen im unteren Teil ein Häkchen aus Wolframdraht, das der Fixierung der Aortenringe diente. Über S-förmige Stahlhäkchen wurden die Aortenringe zwischen diesem Wolframhäkchen und einem Stahlhäkchen, das an einem 10 cm langen Goldkettchen befestigt war, vertikal eingespannt. Das Goldkettchen bildet die Verbindung zum induktiven Kraftaufnehmer. Als Badlösung diente eine modifizierte Krebs-Henseleit-Lösung (Lösung 3, Tab. 4.1), die durch eine am unteren Ende des Organbads angebrachte Glasfritte ständig mit Carbogen (95 % O₂ + 5 % CO₂) durchperlt wurde. Diese Organbäder wurden in ein auf 35°C temperiertes Wasserbad eingesetzt, wodurch eine konstante Badtemperatur (35°C) gewährleistet wurde.

Die Mess-Signale wurden mit einem Analog-Digital-Wandler digitalisiert und konnten dann mit Hilfe eines Computers dargestellt, gespeichert und ausgewertet werden. Die Einstellung der Muskel-Vorspannung erfolgte über die mit Hilfe eines Kathodenstrahl-Oszilloskops sichtbar gemachten Signale des induktiven Kraftaufnehmers.

Konzentrierte Stammlösungen der verwendeten Substanzen wurden hergestellt und durch Zupipettieren zur Badlösung die entsprechenden Testkonzentrationen (Endkonzentrationen) erreicht. Soweit nicht anders vermerkt, beziehen sich die Konzentrationsangaben in der Arbeit auf die Endkonzentrationen im Bad.

4.4.4 Noradrenalin-induzierte Kontraktion

Die Methode zur Untersuchung der Noradrenalin-induzierten Kontraktion wurde nach dem Arbeiten von Nelson et al. (1984), Hagiwara et al. (1993) und Müller (1997) erstellt. Für die Vorkontraktion von Meerschweinchen-Aortenringen mit Noradrenalin wurde der Neurotransmitter dem Organbad in einer Endkonzentration von 10 $\mu\text{mol/l}$ zugesetzt. Die Kontraktion erreichte nach einer Inkubationszeit von 10 Minuten das „steady state“ und damit die tonische Komponente der Kontraktion. Wie die Versuche von Müller (1997) mit 1 $\mu\text{mol/l}$ Noradrenalin zeigen, unterdrückte eine Vorinkubation der Präparate mit 0,3 $\mu\text{mol/l}$ Nifedipin den raschen initialen Anstieg der Kontraktionskraft nur teilweise (Abb. 4.9). Nach Erreichen von etwa 50% der Vergleichskontraktion flachte die Kurve abrupt ab und blieb auf diesem Niveau. Diese Beobachtung stimmt mit den Ergebnissen von Nelson et al. (1984) überein, die ebenfalls eine Abflachung der Noradrenalin-Kontraktionskurve in Anwesenheit von 0,1 $\mu\text{mol/l}$ Nifedipin fanden. Die Wirkung von Nifedipin beschränkt sich auf die Reduzierung des Ca^{2+} -Einstroms durch L-Typ-Calcium-Kanäle der Zellmembran. Die in Anwesenheit des Calcium-Kanalblockers verbleibende Kontraktion kann durch

die Freisetzung von Ca^{2+} aus intrazellulären Speichern erklärt werden, die durch Nifedipin kaum beeinflusst wird.



Abb. 4.9 (A) Typischer Verlauf der durch Noradrenalin ($1\mu\text{mol/l}$) induzierten Kontraktion; (B) Verlauf der durch Noradrenalin ($1\mu\text{mol/l}$) induzierten Kontraktion nach Vorinkubation mit $0,3\mu\text{mol/l}$ Nifedipin. Für die Versuche wurde der selbe Ring verwendet (Müller, 1997).

4.4.5 Kalium-induzierte Kontraktion

Für die Entwicklung der Methode zur Untersuchung der Kalium-induzierten Kontraktion wurden Arbeiten von Nelson et al. (1984), Nakaki et al. (1985), Hagiwara et al. (1993) und Müller (1997) herangezogen. Die Depolarisation der Gefäßmuskelzellen wird durch Zupipettieren einer konzentrierten KCl-Lösung ausgelöst. Die Kalium-Endkonzentration in der Badlösung beträgt 30 mmol/l . Die Kalium-induzierte Depolarisation verursacht einen Einstrom des extrazellulären Calciums durch L-Typ-Calcium-Kanäle und die Aortenringe kontrahieren. Nach etwa 30 Minuten erreichte diese Kontraktion ihr „steady state“ in der tonischen Phase der Kontraktion (Abb. 4.10A). Erfolgt die Zugabe der KCl-Lösung nach Vorinkubation mit $3\mu\text{mol/l}$ Nifedipin, so wurde diese Kontraktion durch den L-Typ-Calcium-Kanalblocker beinahe vollständig unterdrückt (Abb. 4.10B). Mit Hilfe dieser Versuche war es möglich, den Einfluss einer kumulativen Zugabe einer Testsubstanz auf die Kalium-vorkontrahierten Präparate zu bestimmen. Die Unterdrückung dieser Kontraktion kann auf eine

Calcium-Kanal-blockierende Wirkung hinweisen. Der eindeutige Nachweis einer Calcium-Kanal-blockierenden Wirkung kann jedoch nur in „Patch-clamp“ Versuchen erbracht werden.

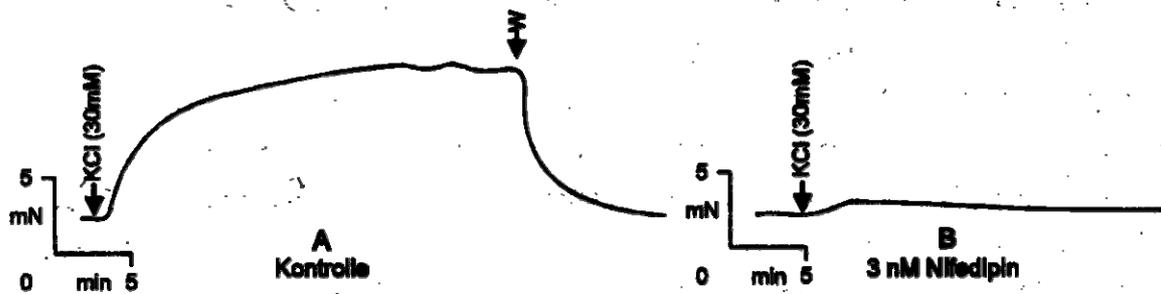


Abb. 4.10 (A) Typischer Verlauf der durch Kalium (30 mmol/l)-induzierten Kontraktion; (B) Verlauf der durch Kalium (30 mmol/l) induzierten Kontraktion nach Vorinkubation mit Nifedipin. Der selbe Ring wurde für beide Versuche verwendet. W = Auswaschen

4.4.6 Kalibrierung

Vor jedem Versuch erfolgte eine Kalibrierung der induktiven Kraftaufnehmer mit Eichgewichten. Nach deren Befestigung an den Kraftaufnehmern wurden die über den Analog-Digital-Wandler digitalisierten Mess-Signale mit Hilfe des verwendeten EDV-Programms registriert und in die Berechnung der Kraftwerte einbezogen.

4.4.7 Auswertung

Mit Hilfe des Computerprogramms wurde während des Versuchs die Muskelkraft (in mN) der Aortenringe in Mittelwerten der Mess-Signale aus Messintervallen von 5 s kontinuierlich registriert und anschließend ausgewertet. Die nach Zugabe einer kontrahierend wirkenden Substanz induzierte Kontraktionskraft (ΔF_c) ist als Differenz des vor Beginn der Zugabe gemessenen Kraftwerts der Vorkontraktion (F_{cV}) und der Endkontraktionskraft (F_{cE}) nach Erreichen des steady state der Kontraktion definiert (Abb 4.11).

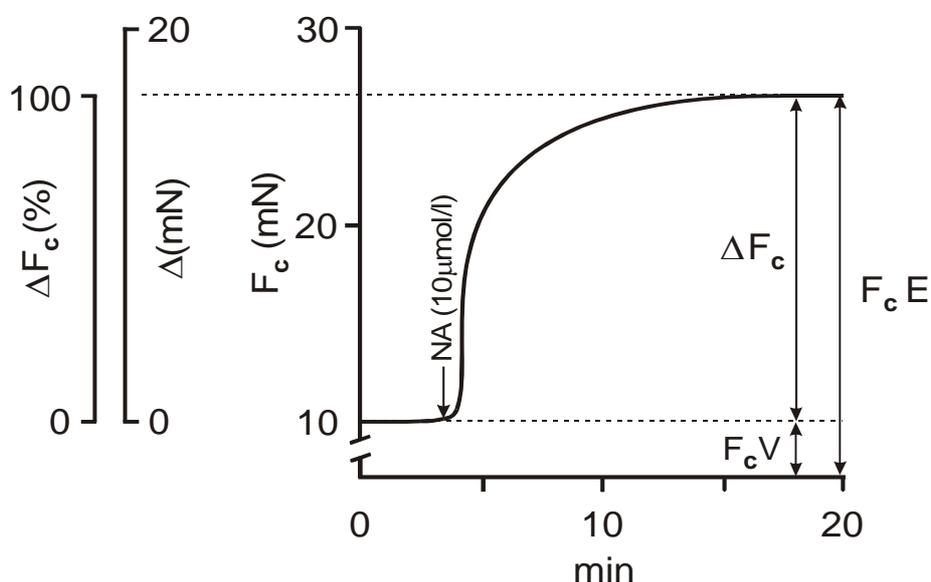


Abb. 4.11 Auswertung der Kontraktionskurven von Aortenringen am Beispiel der Noradrenalin-induzierten Kontraktion.

F_c Gemessene Kontraktionskraft in mN

F_{cV} Kontraktionskraft der Vorkontraktion vor Zugabe der Substanz

F_{cE} Kontraktionskraft der Endkontraktion nach Zugabe der Substanz

ΔF_c Induzierte Kontraktion in mN oder in % der Ausgangskraft aus der Differenz von Endkontraktion und Vorkontraktion

In den Versuchen mit vorkontrahierten Präparaten diente in jedem Einzelversuch die Noradrenalin- bzw. KCl-induzierte Kontraktionskraft (ΔF_c) als Referenzwert von 100%. Nach Zugabe der Testsubstanz wurde jeweils die

verbleibende induzierte Kontraktionskraft (ΔF_c) ermittelt und deren Prozentwert (in % der Referenzkraft) berechnet.

4.5 Wirkung auf die glatte Muskulatur der Trachea

4.5.1 Präparation der Trachea

Meerschweinchen beiderlei Geschlechts mit einem Gewicht von 250 bis 300 g (Fa. Stock, Gelnhausen, Deutschland) wurden durch zervikale Dislokation getötet und nach Entnahme des Herzens die Trachea herauspräpariert. Die weitere Präparation der Trachea wurde in kalter, sauerstoffgesättigter Krebs-Henseleit-Lösung mit 3,2 mmol/l Ca^{2+} (Lösung 1, Tab. 4.1) ausgeführt. Das Binde- und das Fettgewebe wurden entfernt. Der dünnere, distale, an die Lunge angrenzende Teil der Trachea wurde verwendet, da er sich reaktionsfähiger gegenüber spasmogenen Substanzen (z.B. Carbachol) erwies.

Tracheastücke von 3-4 mm Länge wurden abgeschnitten, die 4 bis 6 Knorpel enthielten. Zwei Schnitte wurden parallel zum Trachealmuskel geführt (Abb. 4.12). Mit den Knorpelenden wurde das Präparat in eine Halterung zur isometrischen Kraftmessung eingespannt (Reiter und Brandt, 1985, Brandt, 1988). Im Gegensatz zu verschiedenen Autoren, die die Kontraktionskraft an der Trachealkette mit mehreren Trachealringen registrierten, erlaubte diese Technik die Aktivitätsmessung des glatten Trachealmuskels weitgehend unabhängig von der Elastizität des Knorpels (Reiter und Brandt, 1985; Brandt, 1988).

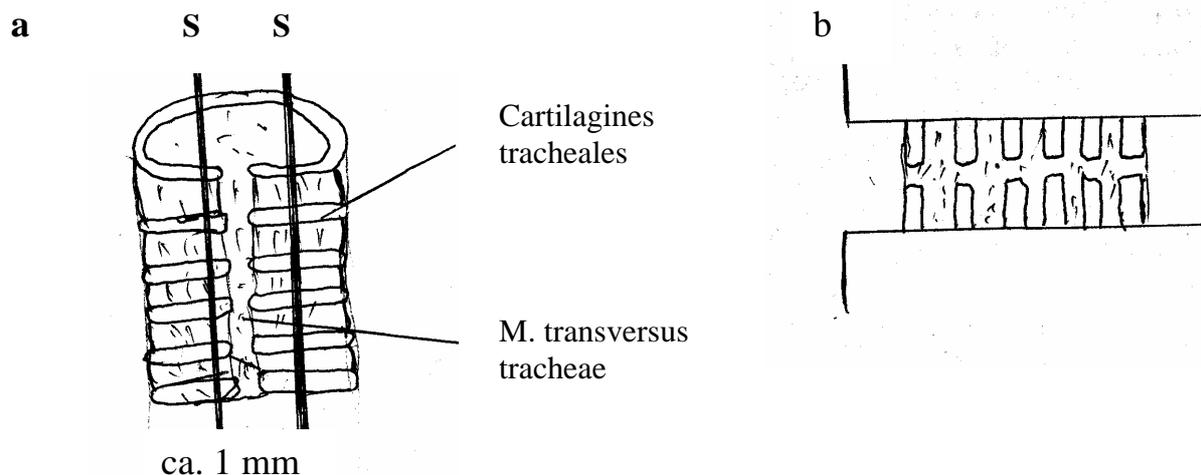


Abb. 4.12 Methode zur Messung der Wirkung auf die glatte Muskulatur der Trachea

- a) Ausgeschnittenes Stück der Trachea (S = Schnittlinien zur Abtrennung des Knorpels)
 b) Tracheapräparat mit restlichen Knorpelansätzen in einer Halterung zur Messung der isometrischen Kontraktion (nach Brandt, 1988).

4.5.2 Versuchsausrüstung

Es wurde dieselbe Apparatur wie bei der Papillarmuskel-Kontraktionskraftmessung verwendet (siehe Abb. 4.5).

4.5.3 Versuchsdurchführung

Der Trachealmuskel besitzt eine hohe Ruhekraft und kann ohne Zugabe von spasmolytischen Substanzen relaxieren (Brandt, 1988). In unseren Versuchen wurde der Muskel mit 7-10 mN Kraft vorgespannt. Ein „steady state“ der Ruhekraft wurde nach 1 bis 2 Stunden erreicht.

Anschließend wurden die Muskel durch 1 $\mu\text{mol/l}$ Carbachol vorkontrahiert. Carbachol ist ein direktes Parasympathomimetikum und wirkt im Prinzip wie Acetylcholin. Der Vorteil dieser Substanz gegenüber Acetylcholin ist, dass die Wirkung von Carbachol an Organen länger anhält, weil es nur langsam abgebaut wird.

Eine nahezu vollständige Relaxation der mit Carbachol vorkontrahierten Trachea kann z.B. durch Zugabe eines β -Adrenozeptor-Agonisten oder verschiedener ätherischer Öle ausgelöst werden (Reiter und Brandt, 1985).

Mit Hilfe dieser Versuche war es möglich den Einfluss einer kumulativen Zugabe einer Testsubstanz auf die mit Carbachol vorkontrahierten Präparate zu bestimmen.

4.5.4 Kalibrierung und Auswertung

Die Kalibrierung und Auswertung der Trachea-Versuche wurde wie bei den Papillarmuskel-Versuchen durchgeführt.

4.6 Chemische Untersuchung

Die Dünnschicht-Chromatographie wurde mit Hilfe von Prof. Lacaille-Dubois, „Faculté de Pharmacie, Université de Bourgogne“, in Dijon, Frankreich, Prof. Hildebert Wagner, Institut für Pharmazeutische Biologie der Ludwig-Maximilians-Universität München und von Dr. Alain Bertrand Dongmo, „Faculté des Sciences, Université de Douala“, Kamerun durchgeführt.

4.7 Referenzsubstanzen

Ascorbinsäure: Fa. Merck, Darmstadt, Deutschland

ATP: Na_2ATP (Adenosin-5'-Triphosphorsäure-Dinatriumsalz):
Fa. Merck, Darmstadt, Deutschland

Calciumchlorid: Fa. Merck, Darmstadt, Deutschland

Carbogen: Fa. Linde, Höllriegelskreuth, Deutschland

Carbachol: Fa. Merck, Darmstadt, Deutschland

DMSO (Dimethylsulfoxid): Fa. Merck, Darmstadt, Deutschland

D-(+)-Glucose: Fa. Merck, Darmstadt, Deutschland

Heparin: Fa. Ratiopharm GmbH, Ulm, Deutschland

Hepes (N-2-Hydroxyethylpiperazin-N-2-ethansulfonsäure):
Fa. Sigma, Deisenhofen, Deutschland

KCl: Fa. Merck, Darmstadt, Deutschland

Kollagenase (Worthington 173 U/mg): Fa. Biochrom, Berlin, Deutschland

Magnesium-D,L-Hydrogenaspartat-Tetrahydrat:
Fa. Trommsdorff, Alsdorf, Deutschland

Natriumchlorid: Fa. Merck, Darmstadt, Deutschland

Natriumdihydrogenphosphat reinst: Fa. Merck, Darmstadt, Deutschland

Noradrenalin: (\pm)-Noradrenalin-HCl: Fa. Sigma, Deisenhofen, Deutschland

Protease: Fa. Sigma, Deisenhofen, Deutschland

Trypsin: Fa. Serva, Heidelberg, Deutschland

4.8 Pflanzenextrakte

Die Extrakte von *D. oliveri* und *V. cienkowskii* wurden von Dr. Nkeng-Efouet-Alango, Faculté des Sciences, Université de Dschang, Kamerun hergestellt. Die Abbildungen 4.13 und 4.14 zeigen die Extraktionsmethoden für beide Pflanzen. Die Extrakte wurden als Dickextrakte gewonnen und mit DMSO als Lösungsvermittler gelöst und verwendet. Die Stammlösung wurde in einer Mischung aus 50% DMSO und 50% Badlösung (3,2 mmol/l Ca^{2+}) angefertigt. Weitere Verdünnungen der im Versuch verwendeten Konzentrationen erfolgten nur mit Badlösung.

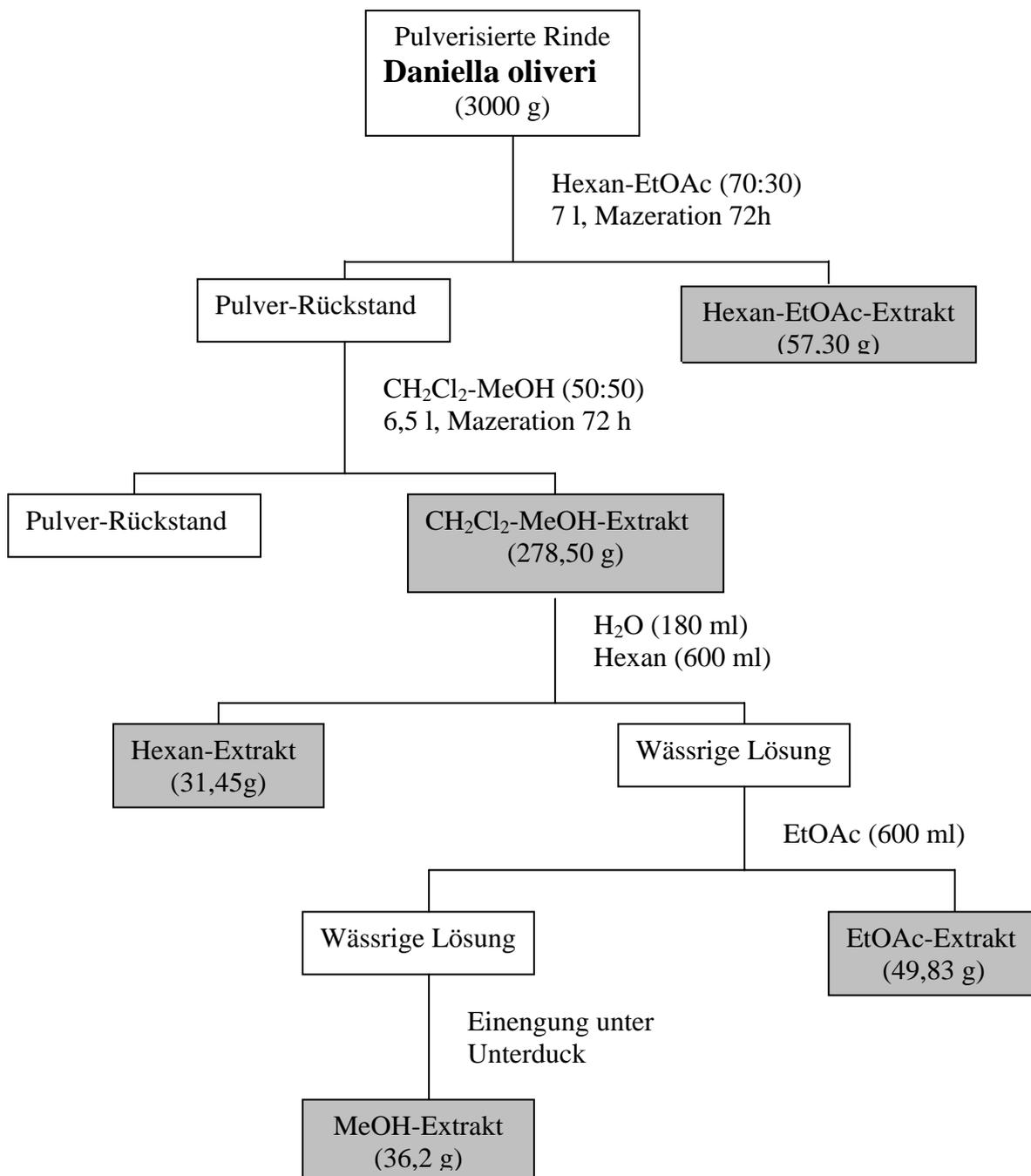


Abb. 4.13 Schematische Darstellung der Extraktion von *Daniella oliveri*.

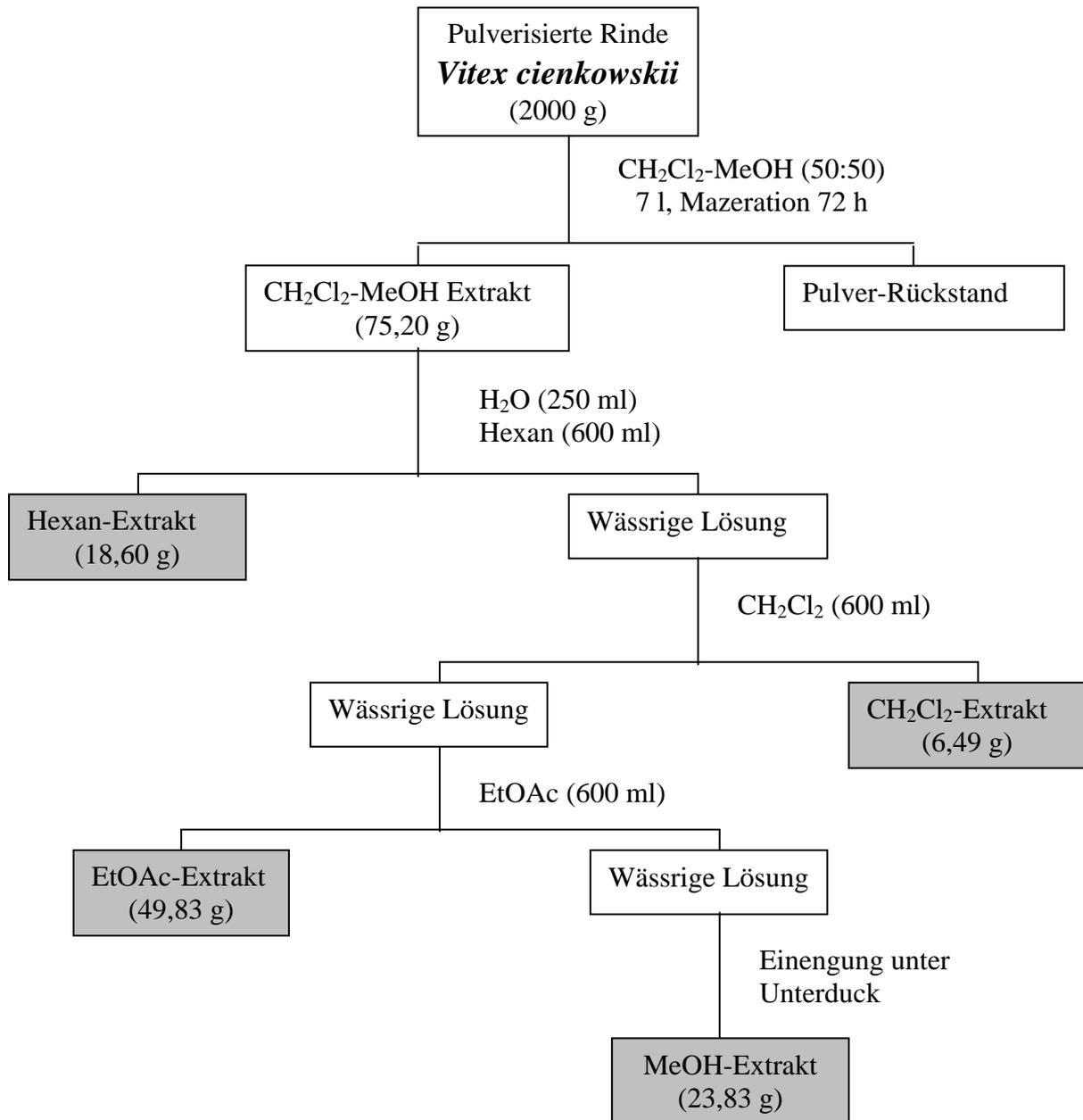


Abb. 4.14 Schematische Darstellung der Extraktion von *Vitex cinkowskii*.

4.9 Statistische Auswertung

4.9.1 Standardfehler

Alle in dieser Arbeit dargestellten Ergebnisse sind als Mittelwerte mit den zugehörigen Standardfehlern des Mittelwerts angegeben ($MW \pm \text{s.e.m.}$). Sie wurden mit Hilfe der Sigma-Plot-Software (Fa. SPSS, Chicago, IL, USA) berechnet.

4.9.2 Berechnung des EC_{50} -Werts

Mit Hilfe eines Computerprogramms (GraphPad-Software Inc., San Diego, CA, USA) wurde eine sigmoide Funktion (siehe Formel) an die Daten der Experimente nach der Methode von Gauß-Newton angepasst und daraus der EC_{50} -Wert ermittelt.

$$E = K_1 - \frac{(K_1 - K_2) \cdot C^{K_3}}{C^{K_3} + K_4^{K_3}}$$

- E: Effekt
- C: Konzentration
- K_1 : asymptotischer Maximalwert
- K_2 : asymptotischer Minimalwert
- K_3 : Steigungsparameter
- K_4 : EC_{50}

5. Ergebnisse

5.1 Einfluss der Erhöhung der extrazellulären Magnesium- und Kalium- Konzentration auf die Schwelle für die Auslösung des Natrium-Stroms

5.1.1 Magnesium

Die Magnesiumkonzentration in der Badlösung wurde auf 0,5 mmol/l eingestellt und die Schwelle für die Auslösung des Natrium-Stroms mit Hilfe der Patch-Clamp-Technik festgestellt. Abb. 5.1a zeigt ein Beispiel für Bestimmungen der Schwelle für die Auslösung des I_{Na} . Eine Depolarisation der Zelle bei 0,5 mmol/l Magnesium auf -54 mV führte zu keinem nennenswerten Einwärtsstrom. Bei einer Depolarisation auf -53 mV kam es zu einer leichten Reaktion, d.h. ein geringer Einwärtsstrom trat auf, der wieder abklang. Bei -52 mV kam es dagegen zu einem massiven Einwärtsstrom, d.h. bei -52 mV lag die Schwelle für die Auslösung des schnellen I_{Na} dieser Zelle.

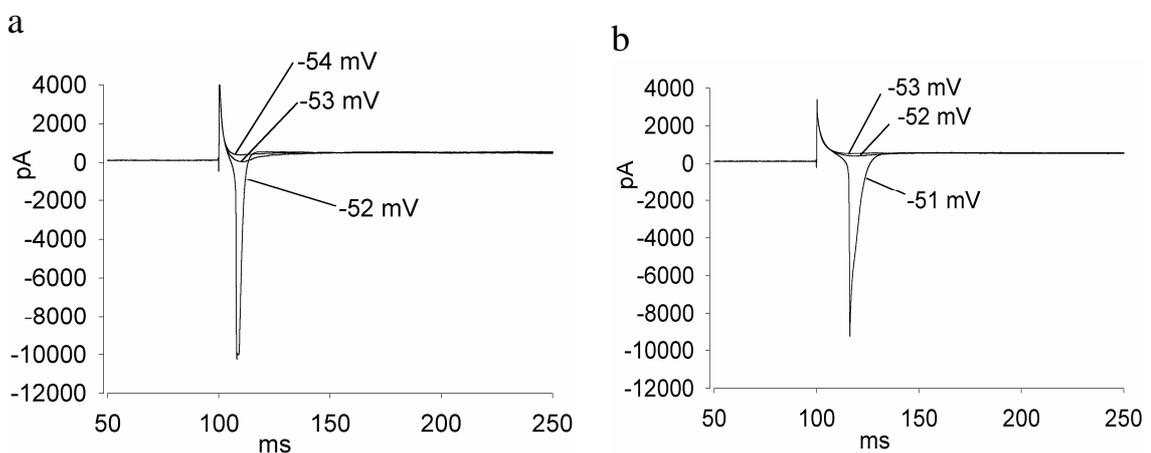


Abb. 5.1 Änderung der Schwelle für die Auslösung des Natrium-Stroms bei Erhöhung der extrazellulären Magnesium-Konzentration. Ausgehend von 0,5 mmol/l Magnesium (a) wurde die extrazelluläre Magnesium-Konzentration auf 1,5 mmol/l erhöht (b).

Eine Erhöhung der extrazellulären Magnesiumkonzentration von 0,5 mmol/l auf 1,5 mmol/l führte zu einer Änderung der Schwelle für die Auslösung des I_{Na} an

der selben Zelle (Abb. 5.1b). Bei einem Potential von -52 mV, bei dem der I_{Na} in $0,5$ mmol/l Magnesium ausgelöst wurde, reagierte die Zelle nicht. Durch Erniedrigung des Potentials auf -51 mV kam es zu einem starken Einwärtsstrom. Das heißt mit der Erhöhung der $[\text{Mg}^{2+}]_o$ von $0,5$ auf $1,5$ mmol/l hat sich die Schwelle der Auslösung des I_{Na} von -52 auf -51 mV erhöht.

In Abb. 5.2 ist die Wirkung einer Erhöhung der $[\text{Mg}^{2+}]_o$ von $0,5$ auf 3 mmol/l auf die Schwelle der Auslösung des Na^+ -Stroms wiedergegeben. In der Badlösung mit $0,5$ mmol/l (Abb. 5.2a) reagierte die Zelle nicht auf Depolarisationen von -66 und -65 mV. Erst bei einer Depolarisation auf -64 mV war der schnelle starke Natrium-Einwärtsstrom zu beobachten. Bei einer Erhöhung der $[\text{Mg}^{2+}]_o$ von $0,5$ mmol/l auf 3 mmol/l (Abb. 5.2b), war bei Depolarisationen auf -64 und -63 mV kein Effekt auf die Zelle zu sehen.

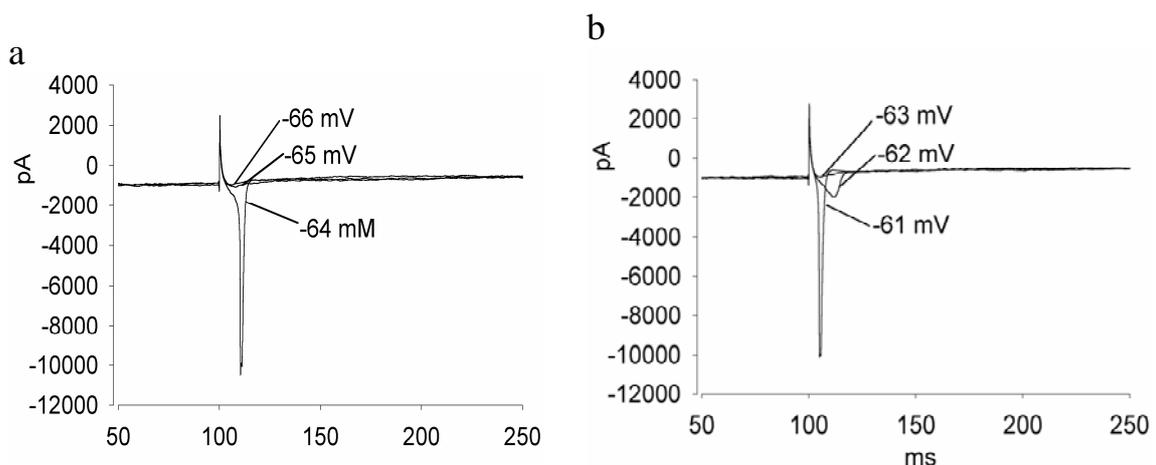


Abb. 5.2 Änderung der Schwelle für die Auslösung des Natrium-Stroms bei Erhöhung der extrazellulären Magnesium-Konzentration. Ausgehend von $0,5$ mmol/l Magnesium (a) wurde die extrazelluläre Magnesium-Konzentration auf 3 mmol/l erhöht (b).

Die folgende Depolarisation (-62 mV) führte zu einem kleinen Einwärtsstrom, der sehr schnell wieder abklang. Der erste starke Einwärtsstrom wurde erst bei -61 mV beobachtet. Bei der Änderung der $[\text{Mg}^{2+}]_o$ von $0,5$ auf 3 mmol/l erhöhte sich die Schwelle der Auslösung des Na-Stroms also von -64 auf -61 mV.

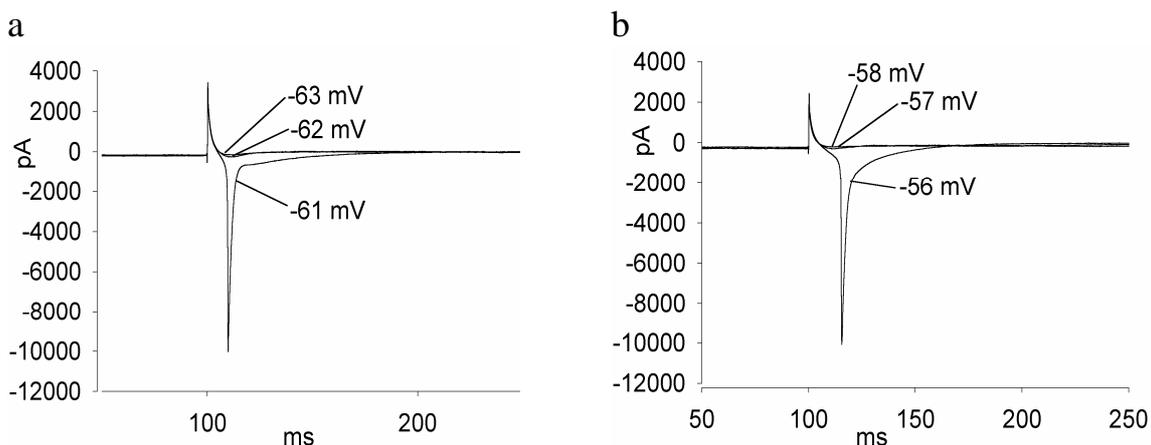


Abb. 5.3 Änderung der Schwelle für die Auslösung des Natrium-Stroms bei Erhöhung der extrazellulären Magnesium-Konzentration. Ausgehend von 0,5 mmol/l Magnesium (a) wurde die extrazelluläre Magnesium-Konzentration auf 5 mmol/l erhöht (b).

Die Abb. 5.3 zeigt die Änderung der Schwelle für die Auslösung des Natrium-Einwärtsstroms durch eine Erhöhung der $[Mg^{2+}]_o$ von 0,5 auf 5 mmol/l. Die Schwelle für die Auslösung des I_{Na} wurde in diesem Versuch um 5 mV erhöht.

Die Abb. 5.4 ist eine Vergrößerung eines Ausschnitts von Abb. 5.3 und zeigt deutlich, wie die Schwelle für die Auslösung des Na-Stroms sich mit der Erhöhung der extrazellulären Mg-Konzentration von 0,5 auf 5 mmol/l geändert hat.

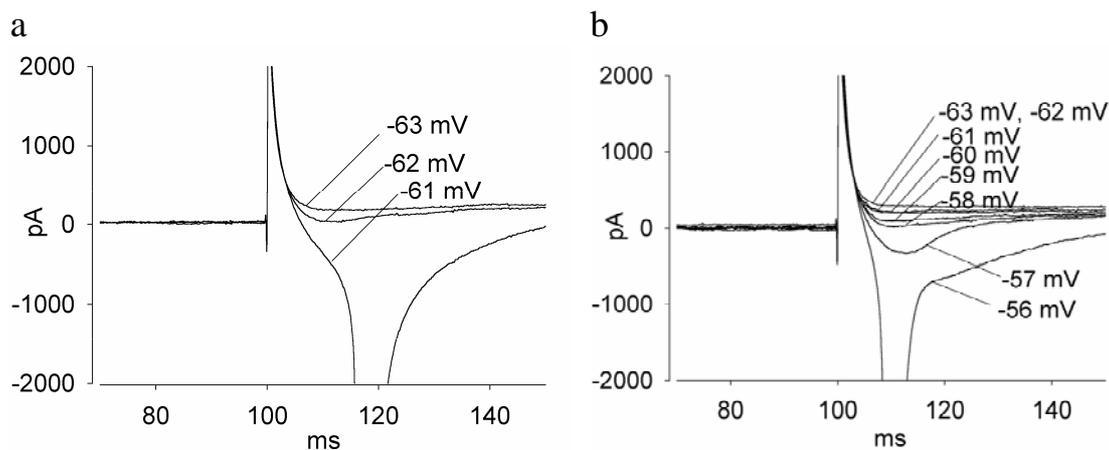


Abb. 5.4 Änderung der Schwelle für die Auslösung des Natrium-Stroms bei Erhöhung der extrazellulären Magnesium-Konzentration von 0,5 auf 5 mmol/l. Gedeckte X und Y-Skala.

In der Badlösung mit 0,5 mmol/l Magnesium (Abb. 5.4a) reagierte die Zelle nicht auf eine Depolarisation von -63 mV. Sie zeigte bei -62 mV einen kleinen Einwärtsstrom und erst bei -61 mV kam es zu der Auslösung des Na-Stroms. Wie aus Abb. 5.4b hervorgeht, kam es bei einer Erhöhung der $[Mg^{2+}]_o$ von 0,5 auf 5 mmol/l bei -62 mV und -61 mV Depolarisationsspannung zu keinem Effekt auf die Zelle. Es wird deutlich, dass ab -58 und -57 mV kleine Einwärtsströme ausgelöst wurden. Ab -56 mV wurde der erste große Einwärtsstrom ausgelöst, d.h. in dieser 5 mmol/l Mg-Lösung lag die Schwelle für die Auslösung des Na-Einwärtsstroms bei -56 mV.

Abb. 5.5 fasst die Wirkung der Erhöhung der $[Mg^{2+}]_o$ auf die Schwelle für die Auslösung des Natrium-Einwärtsstroms zusammen. Ausgehend von einem mittleren Schwellenpotential von $-59,9 \pm 4,3$ mV ($n = 15$) in 0,5 mmol/l $[Mg^{2+}]_o$, wurden hier die durch die verschiedenen Magnesium-Konzentrations-Erhöhungen erzielten Änderungen aufgetragen.

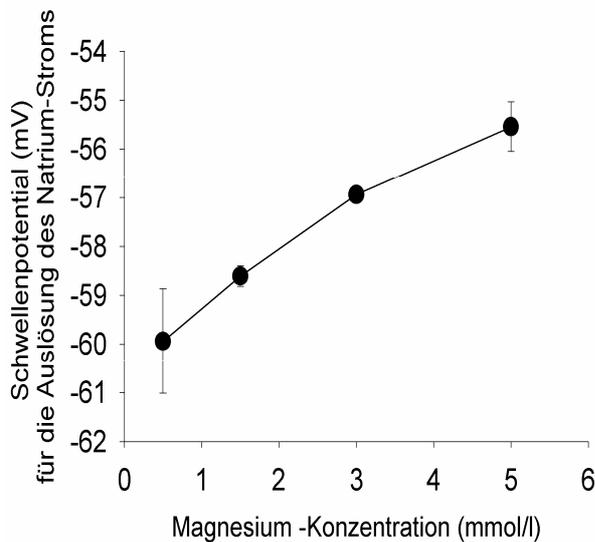


Abb. 5.5 Konzentrationsabhängigkeit der Wirkung von extrazellulärem Magnesium auf die Schwelle für die Auslösung des Natrium-Stroms.

Es wurde von einem Schwellenpotential von -60 mV bei $0,5$ mmol/l Magnesium ausgegangen und dann die Schwellenwerte bei den höheren Konzentrationen mit den in den einzelnen Versuchen erzielten Differenzwerten berechnet (bei $0,5$ mmol/l $[Mg]_o$: $n=15$ und bei $1,5$, 3 und 5 mmol/l $[Mg]_o$: $n=5$).

Abb. 5.5 zeigt, dass die Schwelle für die Auslösung des I_{Na} mit der Erhöhung der $[Mg^{2+}]_o$ steigt. Diese Abhängigkeit folgt keiner Geraden, sondern einer leicht nach oben konvexen Kurve. Das heißt, wenn man von einer niedrigen Magnesium-Konzentration ausgeht, ist die Wirkung einer Magnesium-Erhöhung etwas stärker, als wenn man von einer höheren Magnesium-Konzentration ausgeht. Aber es ist klar zu sehen, dass eine Erhöhung der $[Mg^{2+}]_o$ um 1 mmol/l die Schwelle für die Auslösung des Natrium-Einwärtsstroms um ca. 1 mV erhöht.

5.1.2 Kalium

Der Effekt von Kalium auf die Schwelle für die Auslösung des Natrium-Einwärtsstroms wurde ebenfalls geprüft. Die Kalium-Konzentration in der Badlösung betrug 4 mmol/l und wurde in verschiedenen Versuchen auf 5 , 6 und 7 mmol/l erhöht.

Abbildung 5.6 zeigt die Wirkung einer Erhöhung der $[K^+]_o$ von 4 mmol/l auf 5 mmol/l auf die Schwelle für die Auslösung des Natrium-Einwärtsstroms. In der

Badlösung (Abb. 5.6a) lag die Schwelle des I_{Na} bei -62 mV. Nach Erhöhung der $[K^+]_o$ auf 5 mmol/l (Abb. 5.6b) wurde die Schwelle des I_{Na} auf -60 mV erhöht. Mit der Änderung der $[K^+]_o$ von 4 auf 5 mmol/l erhöhte sich bei dieser Zelle die Schwelle der Auslösung des Natrium-Einwärtsstroms von -62 mV auf -60 mV.

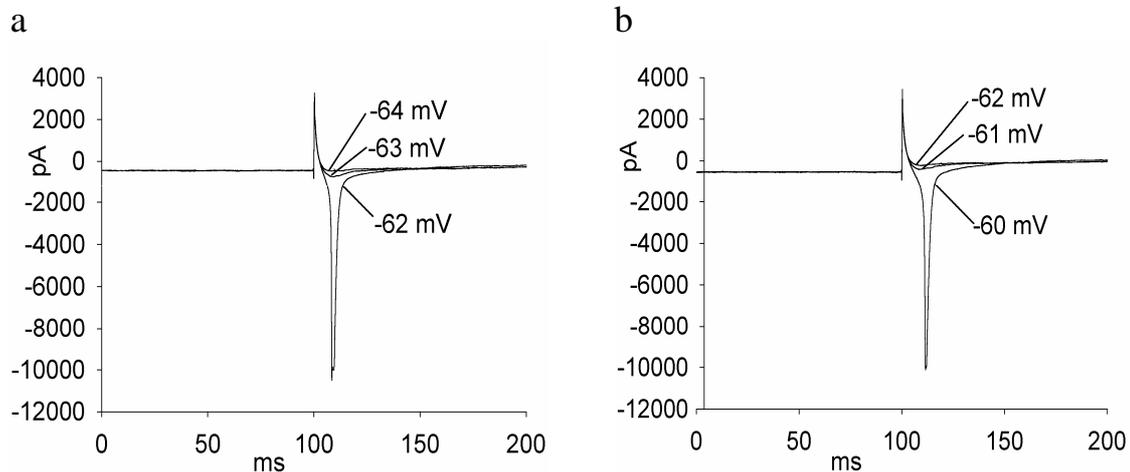


Abb. 5.6 Änderung der Schwelle für die Auslösung des Natrium-Stroms bei Erhöhung der extrazellulären Kalium-Konzentration. Ausgehend von 4 mmol/l Kalium (a) wurde die extrazelluläre Kalium-Konzentration auf 5 mmol/l (b) erhöht.

In Abb. 5.7 ist zu erkennen, dass eine Erhöhung des $[K^+]_o$ von 4 mmol/l auf 7 mmol/l, zu einer deutlichen Erhöhung der Schwelle des Natrium-Stroms von -65 mV auf -55 mV führt.

Abb. 5.8 fasst die Wirkungen der Kalium-Erhöhungen auf die Schwelle für die Auslösung des Natrium-Einwärtsstroms zusammen. Bei einer extrazellulären Kalium-Konzentration von 4 mmol/l lag die Schwelle für die Auslösung des Natrium-Einwärtsstroms im Mittel bei ca. $-62,4$ mV ($n = 15$). Die Erhöhung der $[K^+]_o$ von 4 mmol/l auf 5, 6 und 7 führte zu einer deutlichen Erhöhung der Schwelle des Natrium-Stroms von $-62,4$ mV auf $-60,0$, $-57,8$ und $-57,2$ mV, d.h. das Potential für die Auslösung des I_{Na} war bei Erhöhung der $[K^+]_o$ weniger

negativ. Eine Erhöhung der Kalium-Konzentration um 1 mmol/l führte zu einer Erhöhung der Schwelle für die Auslösung des Natrium-Stroms um ca. 1,8 mV.

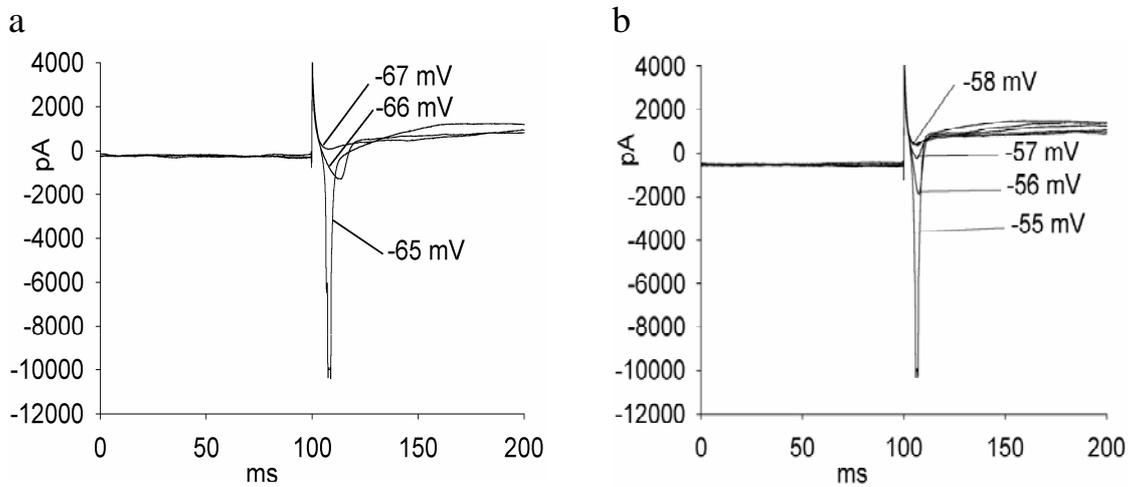


Abb. 5.7 Änderung der Schwelle für die Auslösung des Natrium-Stroms bei Erhöhung der extrazellulären Kalium-Konzentration. Ausgehend von 4 mmol/l Kalium (a) wurde die extrazelluläre Kalium-Konzentration auf 7 mmol/l (b) erhöht.

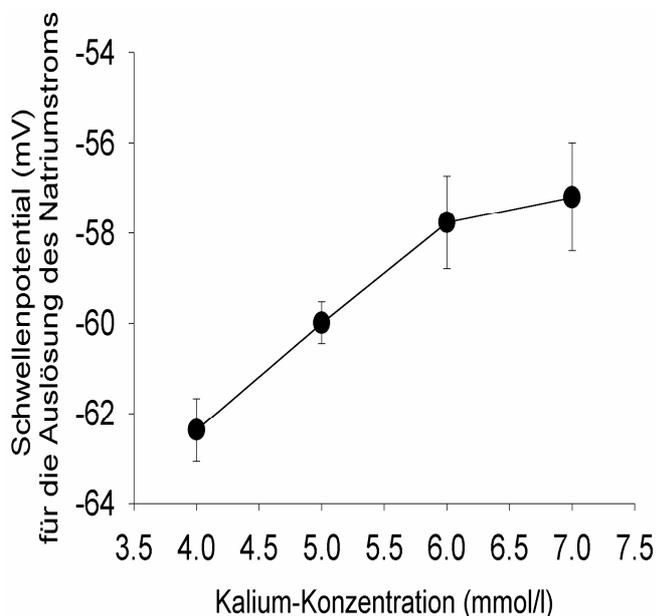


Abb. 5.8 Konzentrationsabhängigkeit der Wirkung von extra-zellulärem Kalium auf die Schwelle für die Auslösung des Natrium-Stroms. Es wurde von einem Schwellenpotential von $-62,4$ mV bei $0,5$ mmol/l Kalium ausgegangen und dann die Schwellenwerte bei den höheren Konzentrationen mit den in den einzelnen Versuchen erzielten Differenzwerten berechnet (bei 4 mmol/l $[K]_o$: $n=19$ und bei 5, 6 und 7 mmol/l $[K]_o$: $n=8, 5$ und 6).

5.1.3 Natrium

Die Wirkung einer Erhöhung der extrazellulären Natrium-Konzentration auf die Schwelle der Auslösung des Na-Stroms wurde ebenfalls untersucht. Eine Erhöhung der $[Na^+]_o$ von 140 mmol/l auf 143 mmol/l bewirkte keine Änderung der Schwelle des I_{Na} (Abb. 5.9). Die Schwelle der Auslösung des I_{Na} lag bei beiden Natrium-Konzentrationen bei -61 mV.

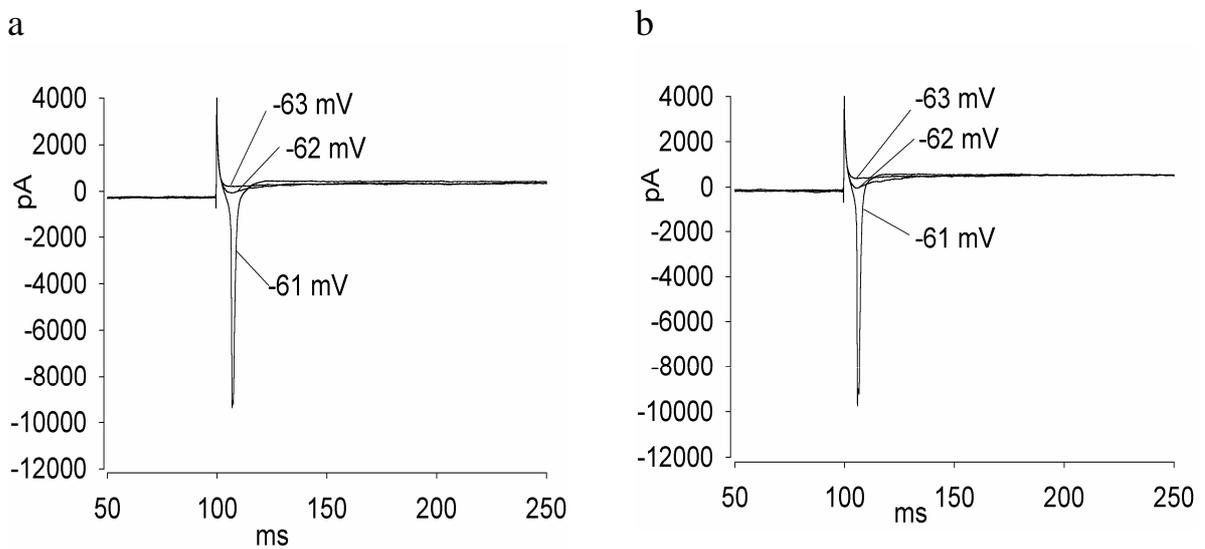


Abb. 5.9 Wirkung einer Erhöhung der extrazellulären Natrium-Konzentration auf die Schwelle für die Auslösung des Natrium-Stroms. Ausgehend von 140 mmol/l Natrium (a) wurde die extrazelluläre Natrium-Konzentration auf 143 mmol/l (b) erhöht.

5.1.4 Einfluss einer anti- und einer proarrhythmischen Substanz auf die Schwelle für die Auslösung des Natrium-Stroms

5.1.4.1 Sotalol

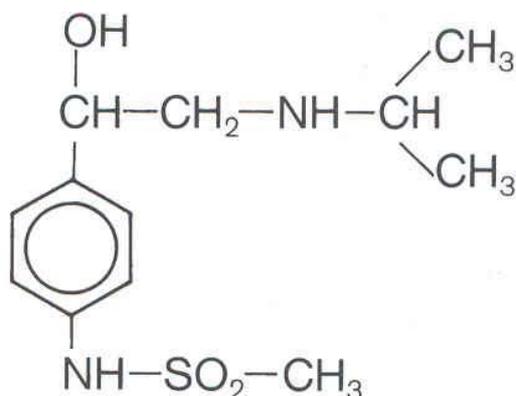


Abb. 5.10 Sotalol

Die Wirkung von 10 $\mu\text{mol/l}$ Sotalol (Strukturformel siehe Abb. 5.10), einem Klasse III Antiarrhythmikum, auf die Schwelle für die Auslösung des Natrium-Stroms am Herzmuskel wurde ebenfalls geprüft. Es wurde keine wesentliche Änderung der Schwelle für die Auslösung des Natrium-Stroms durch Sotalol gefunden.

Abbildung 5.11 zeigt ein Beispiel der Wirkung von 10 $\mu\text{mol/l}$ Sotalol auf die Schwelle des I_{Na} . Die Schwelle der Auslösung des I_{Na} wurde sowohl mit als auch ohne Sotalol bei -62 mV beobachtet. Ausgehend von 5 Versuchen konnte festgestellt werden, dass eine Zugabe von Sotalol zu einer Erhöhung der Schwelle für die Auslösung des Natrium-Stroms um ca. $0,60$ mV führt.

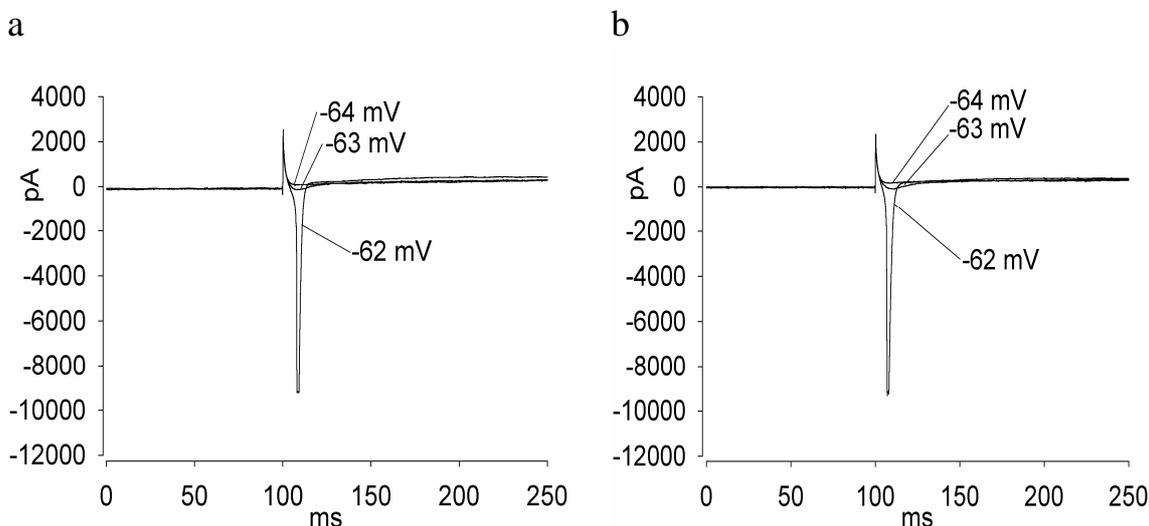


Abb. 5.11 Wirkung von 10 $\mu\text{mol/l}$ Sotalol auf die Schwelle für die Auslösung des Natrium-Stroms. Ausgehend von der Badlösung ohne Sotalol (a) wurde die Zelle mit einer Lösung, die 10 $\mu\text{mol/l}$ Sotalol (b) enthält, superfundiert.

5.1.4.2 Veratridin

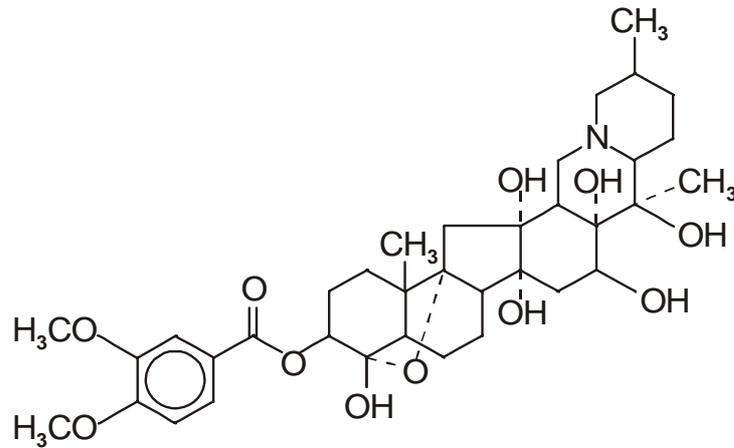


Abb. 5.12 Veratridin

Die Wirkung von Veratridin (Strukturformel siehe Abb. 5.12), einem Natrium-Kanalöffner (Ulbricht, 1972; Honerjäger & Reiter, 1975; 1977), auf die Schwelle der Auslösung des Natrium-Stroms wurde ebenfalls geprüft. Obwohl die Natrium-Kanäle lange offen blieben, zeigte Veratridin keinen Effekt auf die Schwelle des Natrium-Stroms.

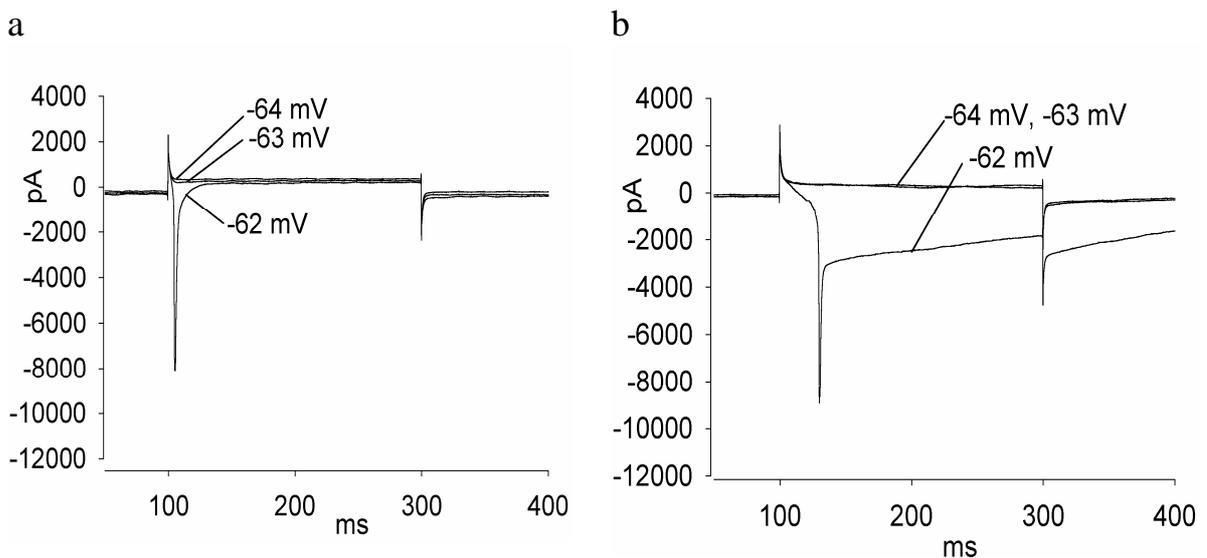
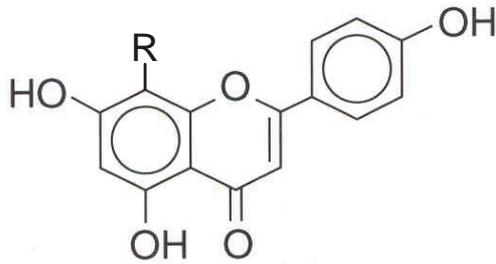


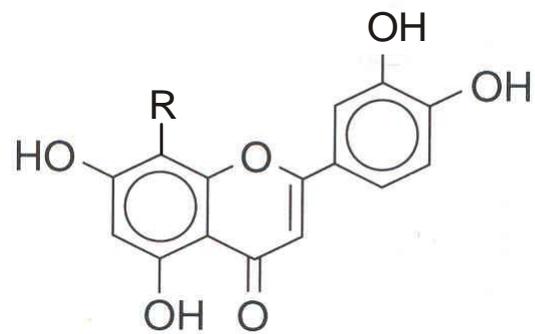
Abb. 5.13 Wirkung von $10 \mu\text{mol/l}$ Veratridin auf die Schwelle für die Auslösung des I_{Na} . Ausgehend von der Badlösung ohne Veratridin (a) wurde die Zelle mit einer Lösung, die $10 \mu\text{mol/l}$ Veratridin (b) enthielt, superfundiert.

5.1.5 Einfluss von verschiedenen Flavonoiden auf die Schwelle für die Auslösung des Natrium-Stroms



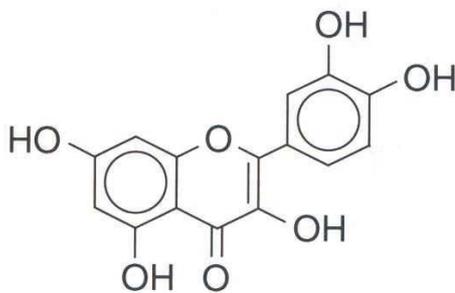
Vitexin

R: Glucosid

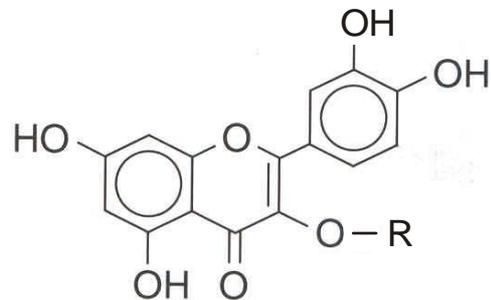


Orientin

R: Glucosid

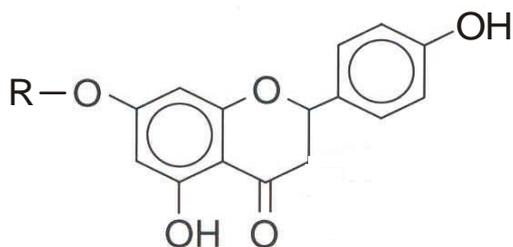


Quercetin



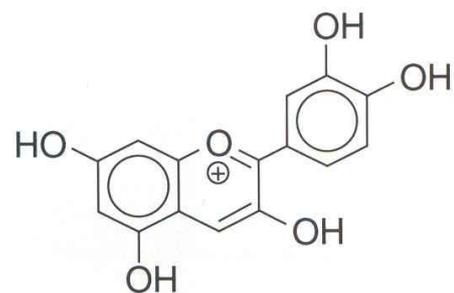
Rutin

R: Rutinosid



Naringin

R: Neohesperidosid



Cyanidin

Abb. 5.14 Strukturformeln der verwendeten Flavonoide. Flavone: Vitexin und Orientin, Flavonole: Quercetin und Rutin, Flavanon: Naringin, Anthocyanidin: Cyanidin.

Nachdem in den Extrakten von *D. oliveri* bei der chemischen Analyse Flavonoide gefunden wurden (siehe Kapitel 5.2), wurde die Wirkung von

Flavonoiden (jeweils 10 mg/l) auf die Schwelle des Natrium-Stroms untersucht. Diese Flavonoide wurden aus den vier wichtigen Gruppen ausgewählt (Abb. 5.14): Flavone: Vitexin und Orientin, Flavonole: Quercetin und Rutin, Flavonone: Naringin, Anthocyanidine: Cyanidin (Wagner, 1993) .

Es wurde keine Änderung der Schwelle für die Auslösung des Natrium-Stroms durch diese Flavonoide festgestellt.

5.2 *Daniella oliveri*

5.2.1 Chemische Untersuchung

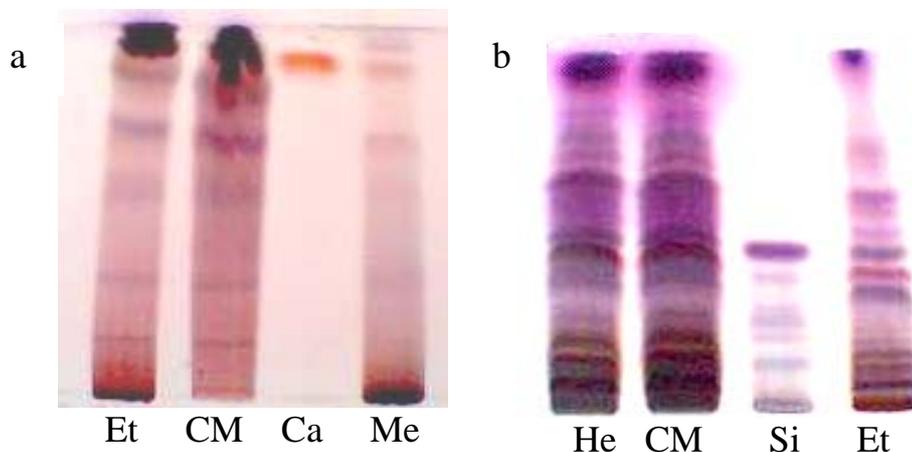


Abb. 5.15 Beispiel für Dünnschicht- Chromatogramme von *D. oliveri*-Extrakten.
 (a) Et: EtOAc-Extrakt, CM: CH_2Cl_2 -MeOH-Extrakt, Ca: Catechin, Me: MeOH-Extrakt
 (b) He: Hexan-Extrakt, CM: CH_2Cl_2 -MeOH-Extrakt, Si: β -Sitosterol, Et: EtOAc-Extrakt.

In ersten chemischen Analysen wurde versucht, mit Hilfe der Dünnschicht-Chromatographie wichtige Stoffgruppen in den Extrakten zu identifizieren. Dabei zeigte sich, dass in den Extrakten reichlich Tannine enthalten waren, wodurch die Detektion der anderen Inhaltsstoffe erschwert wurde. Deshalb wurden zunächst die Tannine mit einer Säule, die Polyamid (Fa. Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland) enthielt entfernt. Abb. 5.15 zeigt die nach Entfernung der Tannine erhaltenen Dünnschicht-Chromatogramme. In Abb. 5.15a wurde

EtAOc-CH₃-COOH-H₂O (50:20:30) als Fließmittel benutzt und in Abb. 5.15b war Toluol-CH₃COOH-MeOH (50:40:5) das Fließmittel. In beiden Fällen wurde die Detektion mittels Komarowsky-Reagenz durchgeführt. In Tab. 5.1 sind die nachgewiesenen Stoffgruppen oder Einzelstoffe der verschiedenen Extrakte von *D. oliveri* aufgelistet.

Tab. 5.1 Inhaltsstoffe der Extrakte von D. oliveri

Extrakt	Stoffe
Hexan	Chlorophyll Terpenoide
Hexan-EtAOc	Chlorophyll Terpenoide
CH ₂ Cl ₂ -MeOH	Chlorophyll Terpenoide Flavonoide (Catechin) Tannine
EtAOc	Chlorophyll Tannine
MeOH	Tannine Flavonoide (Catechin) dimere Procyanidine

5.2.2 Einfluss von *D. oliveri*-Extrakten auf die Aktionspotentialparameter von Papillarmuskeln des Herzens

5.2.2.1 Wirkung des MeOH-Extraktes bei 1Hz

Abb. 5.16 zeigt den Einfluss des MeOH-Extraktes von *D. oliveri* (10 ml/l) auf das Aktionspotential eines Papillarmuskels bei 1 Hz Stimulationsfrequenz. Während des Beobachtungszeitraums von 10 min änderte sich das Aktionspotential nicht.

Die Abbildungen 5.17 und 5.18 zeigen den Effekt des MeOH-Extraktes von *D. oliveri* auf die Aktionspotentialdauer (APD) bei mit 1 Hz stimulierten Papillarmuskeln bei 10, 60 und 90 % Repolarisation. Fünf Minuten nach der Extraktzugabe war keine Änderung der APD festzustellen. Die APD's bei 10, 60 und 90 % blieben fast unverändert.

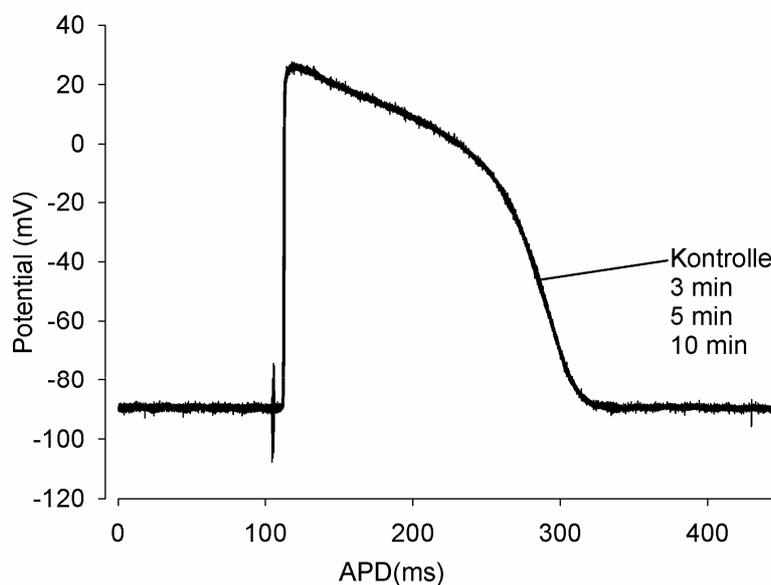


Abb. 5.16 Wirkung des MeOH-Extraktes von *D. oliveri* auf das Aktionspotential eines Meerschweinchen-Papillarmuskels bei 1 Hz. Ausgehend von einem Aktionspotential vor Zugabe des Extraktes wurden die Aktionspotentiale 3, 5 und 10 Minuten nach der Zugabe von 10 mg/l Extrakt aufgenommen.

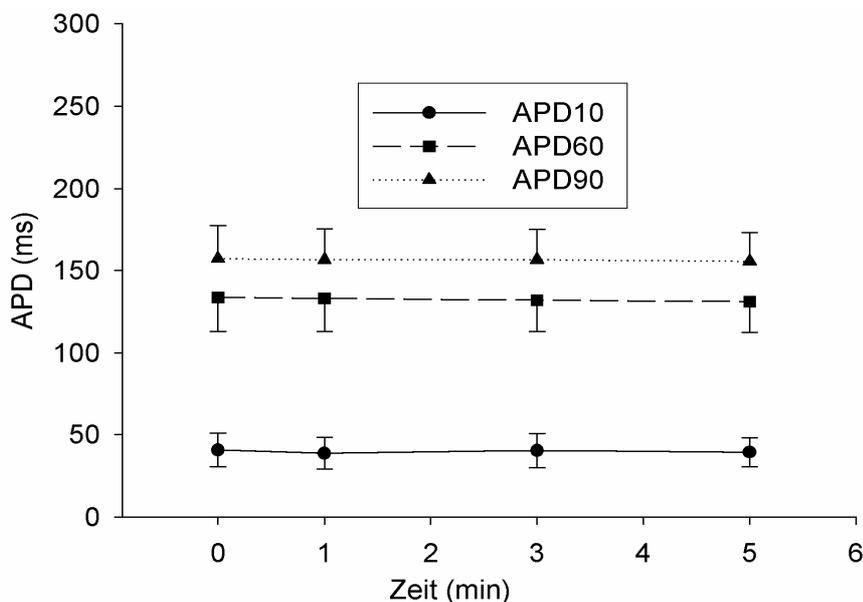


Abb. 5.17 Effekt des MeOH-Extraktes von *D. oliveri* (10 mg/l) auf die Aktionspotentialdauer bei 1 Hz bei 10, 60 und 90 % Repolarisation (Mittelwerte \pm s.e.m von 3 Muskeln).

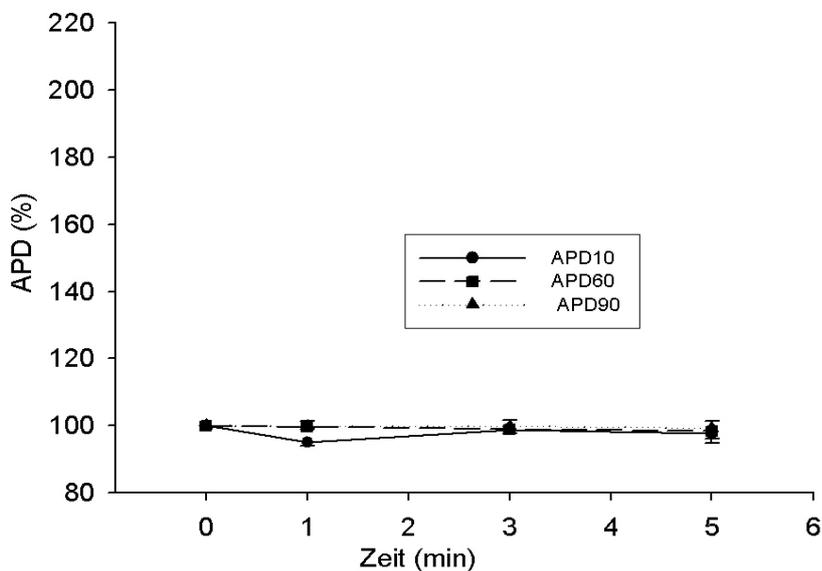


Abb. 5.18 Wirkung des MeOH-Extraktes von *D. oliveri* auf die relative Dauer der APD's bei 1 Hz. Es wurde von den APD's vor Zugabe des Extraktes in der Badlösung (100 %) ausgegangen und dann die relativen APD-Werte bei 10, 60 und 90 % Repolarisation berechnet (Mittelwerte \pm s.e.m von 3 Muskeln).

In Abb. 5.19 ist die Wirkung des MeOH-Extraktes von *D. oliveri* bei 1 Hz auf die Amplitude und die maximale Depolarisations-Geschwindigkeit (dv/dt) des Aktionspotentials dargestellt. Diese Parameter blieben nahezu unverändert.

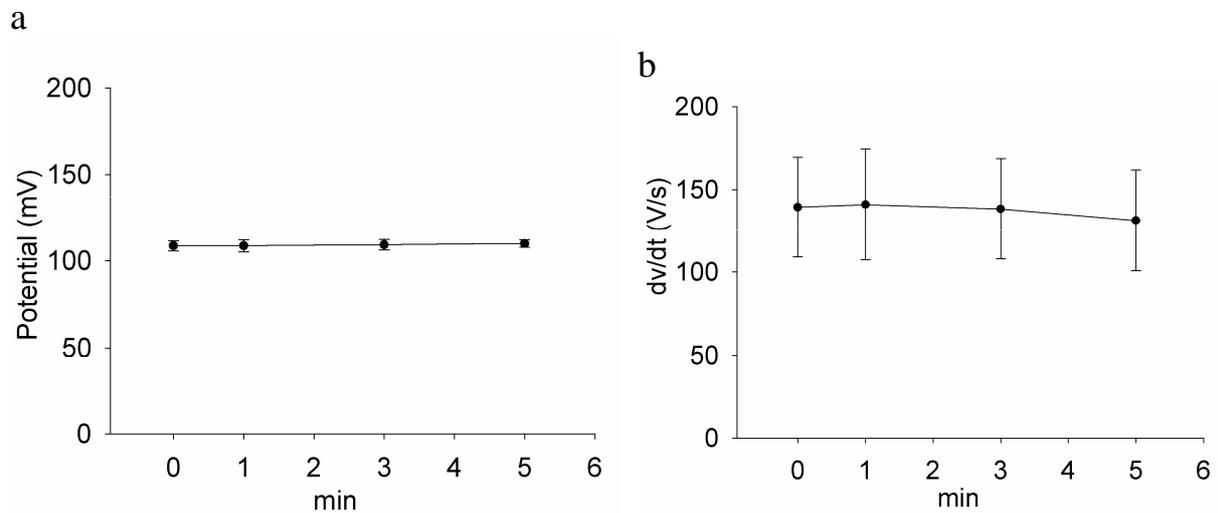


Abb. 5.19 Wirkung des MeOH-Extraktes von *D. oliveri* (10 mg/l) bei 1 Hz auf die Amplitude (a) und auf die maximale Depolarisations-Geschwindigkeit (b) des Aktionspotentials (Mittelwerte \pm s.e.m von 3 Muskeln).

5.2.2.2 Wirkung des MeOH-Extraktes bei 0,2 Hz

Abb. 5.20 zeigt den Einfluss des MeOH-Extraktes von *D. oliveri* (10 mg/l) auf das Aktionspotential eines Papillarmuskels bei 0,2 Hz Stimulationsfrequenz. Während des Beobachtungszeitraums von 5 min wurde die APD drastisch verlängert.

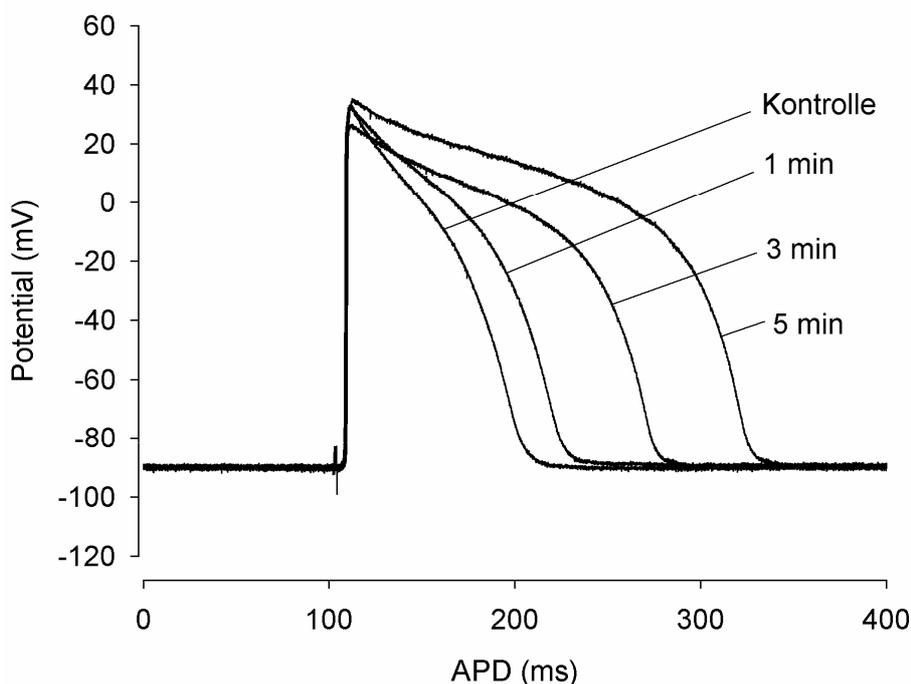


Abb. 5.20 Verlängerung der APD durch den MeOH-Extrakt von *D. oliveri* (10 mg/l) bei 0,2 Hz Stimulationsfrequenz. Die Amplitude bleibt unverändert. Ausgehend von einem Aktionspotential vor Zugabe des Extraktes (Kontrolle) wurden die Aktionspotentiale 1, 3 und 5 Minuten nach der Zugabe von 10 mg/l Extrakt aufgenommen.

Abb. 5.21 und 5.22 zeigen den Effekt des MeOH-Extraktes von *D. oliveri* auf die Aktionspotentialdauer (APD) bei mit 0,2 Hz stimulierten Papillarmuskeln nach 10, 60 und 90 % Repolarisation. Eine Minute nach der Extraktzugabe war die Verlängerung der APD's bereits festzustellen. Etwa 15 min nach Zugabe des Extraktes wurde ein „steady state“ erreicht. Dabei kam es besonders zu einer starken Verlängerung der APD nach 10 % Repolarisation (um $77,8 \pm 36,6$ %), während die Veränderungen bei 60 bzw. 90 % geringer ausfielen (Verlängerung um $43,9 \pm 14,6$ bzw. $35,0 \pm 10,8$ %).

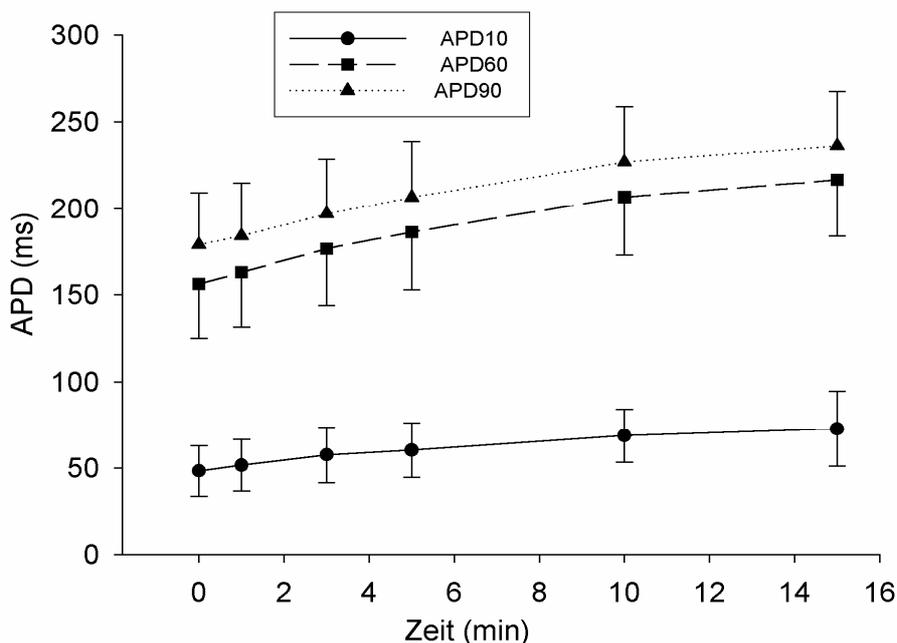


Abb. 5.21 Effekt des MeOH-Extraktes von *D. oliveri* (10 mg/l) auf die Aktionspotentialdauer bei 0,2 Hz bei 10, 60 und 90 % Repolarisation (Mittelwerte \pm s.e.m von 4 Muskeln).

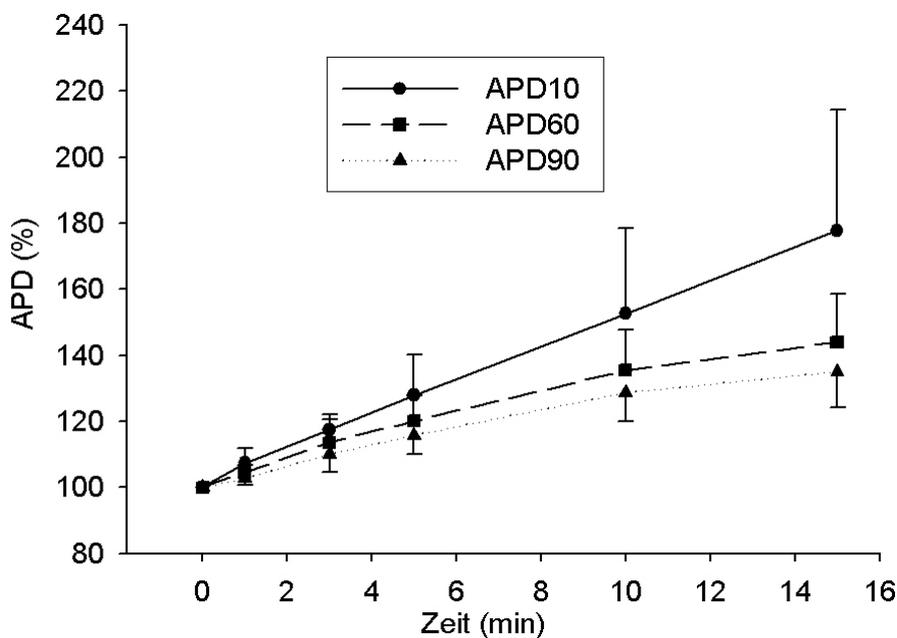


Abb. 5.22 Wirkung des MeOH-Extraktes von *D. oliveri* (10 mg/l) auf die relative Dauer der APD's bei 0,2 Hz. Es wurde von den APD's vor Zugabe des Extraktes (100 %) ausgegangen und dann die relativen APD-Werte bei 10, 60 und 90 % Repolarisation berechnet (Mittelwerte \pm s.e.m von 4 Muskeln).

In Abb. 5.23 ist die Wirkung des MeOH-Extraktes von *D. oliveri* bei 0,2 Hz auf die Amplitude und die maximale Depolarisations-Geschwindigkeit des Aktionspotentials dargestellt. Beide Parameter wurden durch den Extrakt nicht verändert.

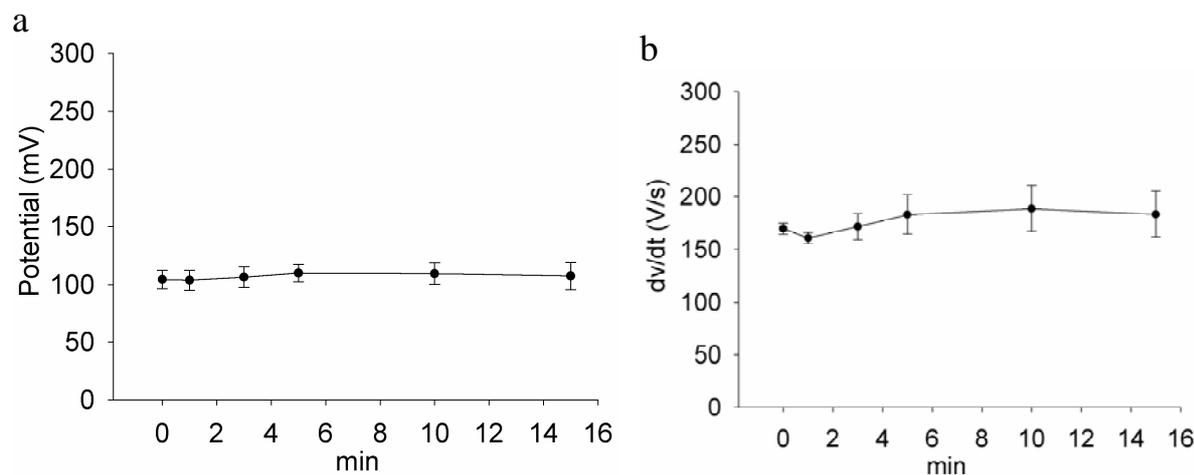


Abb. 5.23 Wirkung des MeOH-Extraktes von *D. oliveri* (10 mg/l) bei 0,2 Hz auf die Amplitude (a) und auf die maximale Depolarisations-Geschwindigkeit (b) des Aktionspotentials (Mittelwerte \pm s.e.m von 4 Muskeln).

5.2.2.3 Hexan-Extrakt

Die Abb. 5.24 zeigt ein Beispiel der Wirkung des Hexan-Extraktes von *D. oliveri* auf das Aktionspotential bei 0,2 Hz. Drei Minuten nach der Zugabe des Extraktes kam es zu einer geringen Verlängerung der APD, die sich aber in den nächsten Minuten teilweise wieder zurückbildete.

Die Abb. 5.25 und 5.26 geben die Ergebnisse der statistische Auswertung der Versuche wieder. Es ergab sich kein Effekt des Hexan-Extraktes von *D. oliveri* bei 0,2 Hz auf die APD.

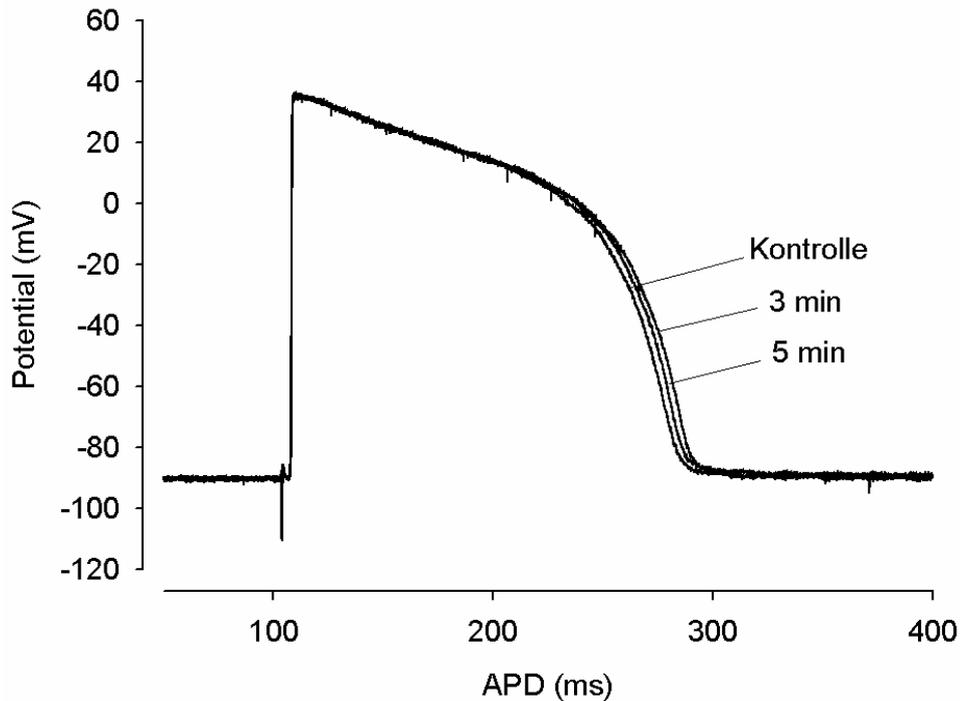


Abb. 5.24 Wirkung des Hexan-Extraktes von *D. oliveri* auf das Aktionspotential. Ausgehend von einem Aktionspotential unter Kontrollbedingungen wurden die Aktionspotentiale 3 und 5 Minuten nach der Zugabe von 10 mg/l Extrakt aufgenommen.

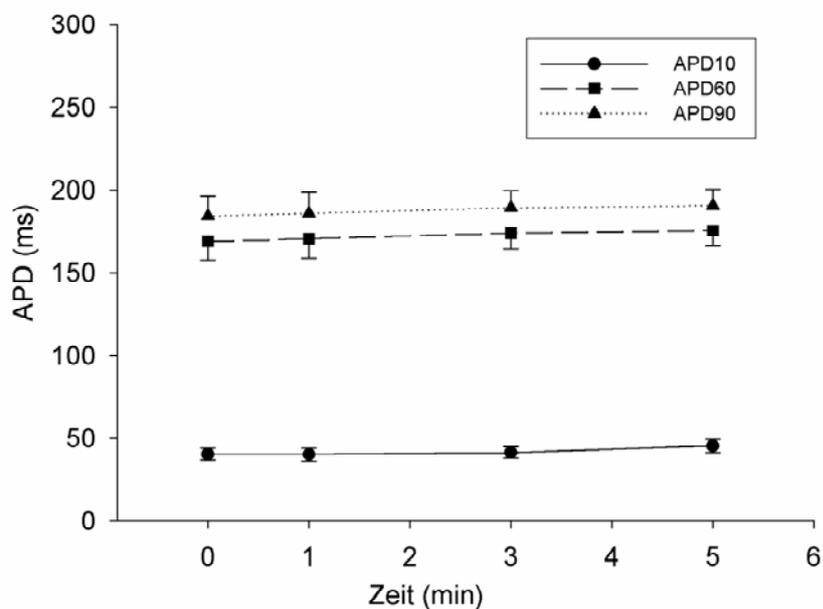


Abb. 5.25 Effekt des Hexan-Extraktes von *D. oliveri* (10 mg/l) auf die Aktionspotentialdauer bei 0,2 Hz bei 10, 60 und 90 % Repolarisation (Mittelwerte \pm s.e.m von 5 Muskeln).

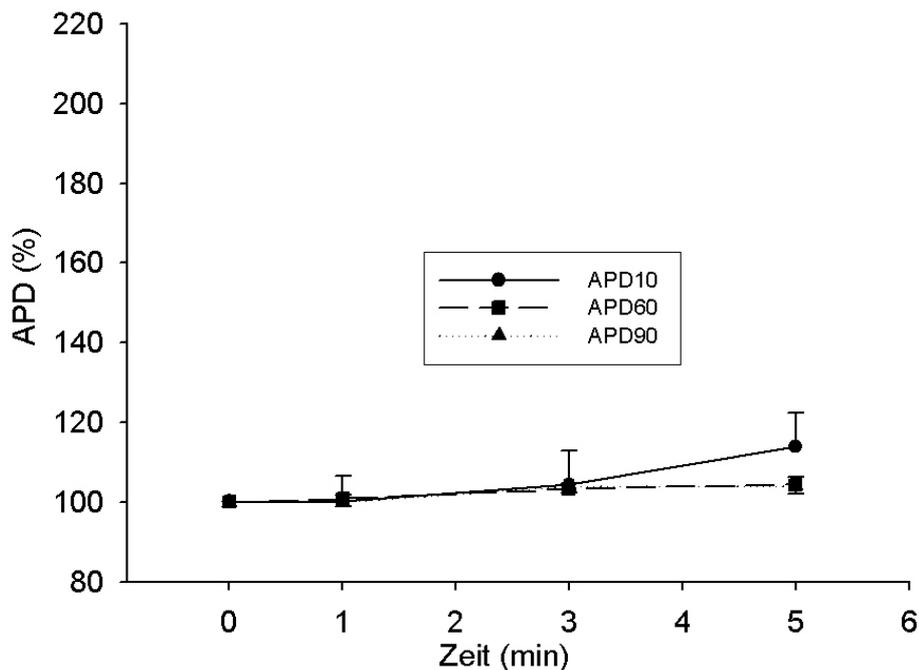


Abb. 5.26 Wirkung des Hexan-Extraktes von *D. oliveri* (10 mg/l) auf die relative Dauer der APD bei 0,2 Hz. Es wurde von den APD's in der Badlösung (100 %) ausgegangen und dann die relativen APD-Werte bei 10, 60 und 90 % Repolarisation berechnet (Mittelwerte \pm s.e.m von 5 Muskeln).

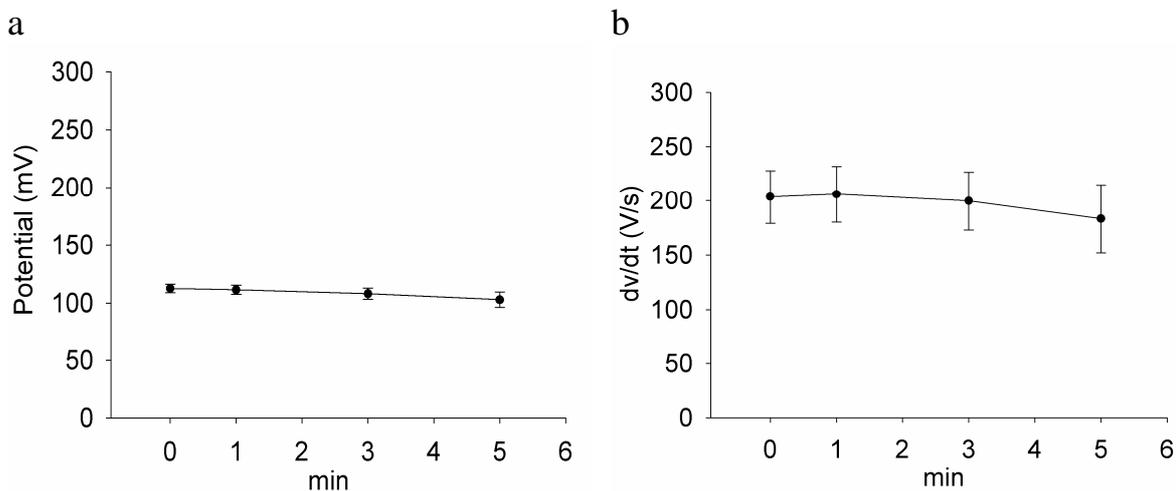


Abb. 5.27 Wirkung des Hexan-Extraktes von *D. oliveri* (10 mg/l) bei 0,2 Hz auf die Amplitude (a) und auf die maximale Depolarisations-Geschwindigkeit (b) des Aktionspotentials (Mittelwerte \pm s.e.m von 5 Muskeln).

In Abb. 5.27 ist die Wirkung des Hexan-Extraktes von *D. oliveri* bei 0,2 Hz auf die Amplitude und die maximale Depolarisations-Geschwindigkeit des Aktionspotentials dargestellt. Auch diese Parameter wurden durch den Hexan-Extrakt nur unwesentlich verändert.

5.2.2.4 CH₂Cl₂-MeOH-Extrakt

In den Abb. 5.28 und 5.29 ist die Wirkung des CH₂Cl₂-MeOH-Extraktes von *D. oliveri* (10 mg/l) auf die APD bei 1 Hz dargestellt. Die APD wurde durch den CH₂Cl₂-MeOH-Extrakt von *D. oliveri* bei 1 Hz nicht verändert. Auch bei 0,2 Hz zeigte der CH₂Cl₂-MeOH-Extrakt keine Wirkung auf das AP.

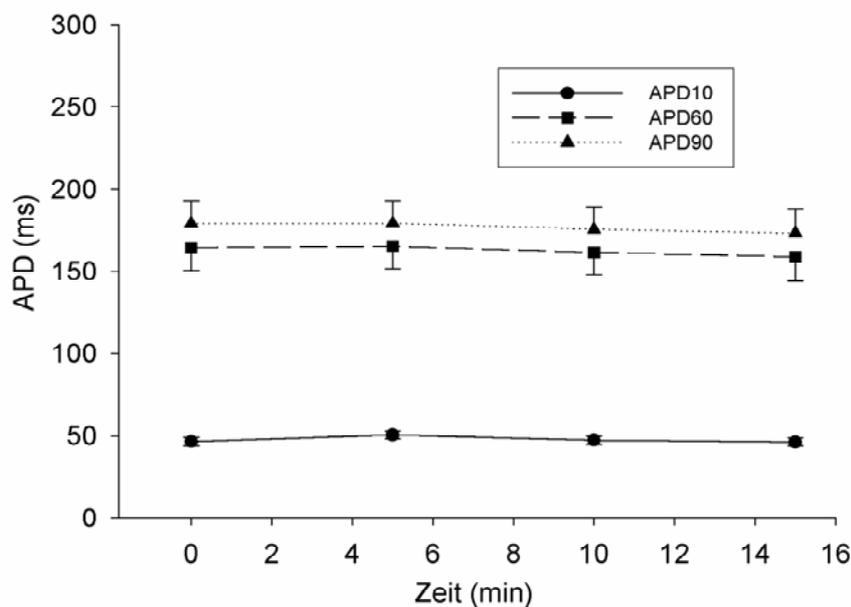


Abb. 5.28 Einfluss des CH₂Cl₂-MeOH-Extraktes von *D. oliveri* (10 mg/l) auf die Aktionspotentialdauer bei 1 Hz bei 10, 60 und 90 % Repolarisation (Mittelwerte \pm s.e.m von 5 Muskeln).

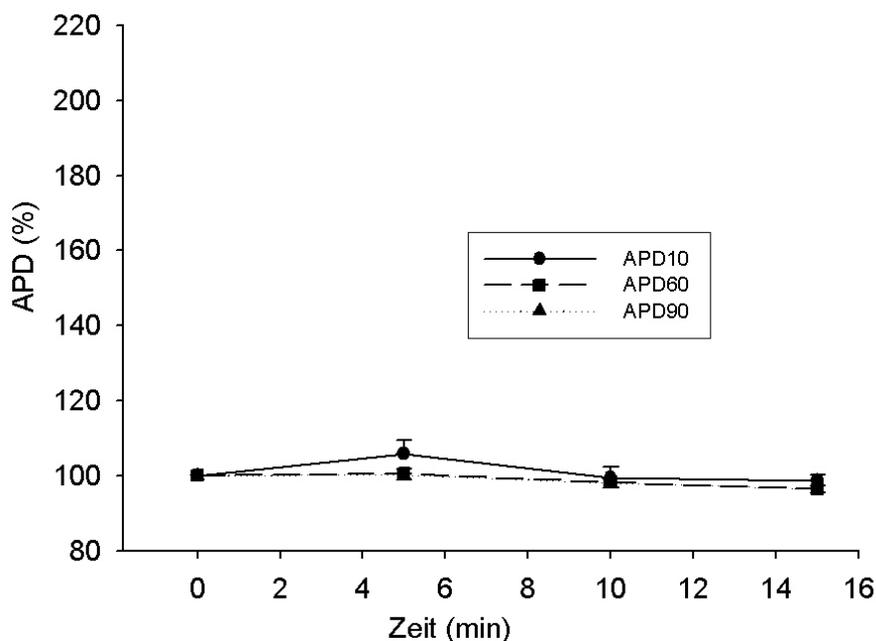


Abb. 5.29 Wirkung des CH_2Cl_2 -MeOH-Extraktes von *D. oliveri* (10 mg/l) auf die relative Dauer des AP's bei 1 Hz. Ausgehend von den APD's vor Zugabe des Extraktes (100 %) wurden die relativen APD-Werte bei 10, 60 und 90 % Repolarisation berechnet (Mittelwerte \pm s.e.m von 5 Muskeln).

In Abb. 5.30 ist die Wirkung des CH_2Cl_2 -MeOH-Extraktes von *D. oliveri* (10 mg/l) bei 1 Hz auf die Amplitude und die maximale Depolarisations-Geschwindigkeit des Aktionspotentials dargestellt. Unter dem Einfluss des CH_2Cl_2 -MeOH-Extraktes wurden diese Parameter nicht wesentlich verändert.

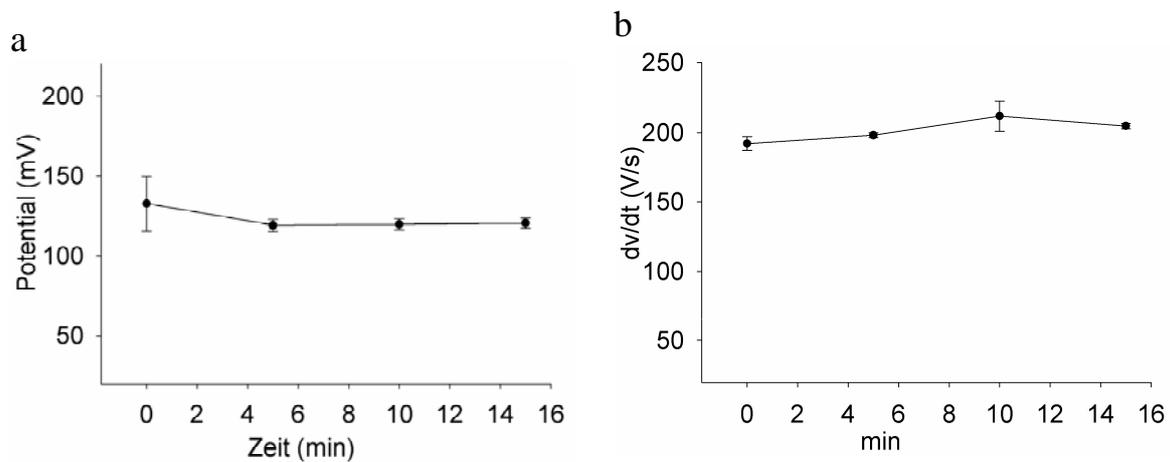


Abb. 5.30 Wirkung des CH_2Cl_2 -MeOH-Extraktes von *D. oliveri* (10 mg/l) bei 1 Hz auf die Amplitude (a) und auf die maximale Depolarisations-Geschwindigkeit (b) des Aktionspotentials (Mittelwerte \pm s.e.m von 5 Muskeln).

5.2.3 Referenzsubstanz: Sotalol

Um einen Vergleich zwischen dem Einfluss der Extrakte und dem eines üblichen Klasse-III-Antiarrhythmikums auf die elektrophysiologischen Parameter des Herzmuskels ziehen zu können, wurde Sotalol als Referenzsubstanz eingesetzt. Sotalol hat neben seiner β -Adrenozeptoren-blockierenden Wirkung einen hemmenden Einfluss auf Kalium-Kanäle des Herzens.

5.2.3.1 Wirkung von Sotalol bei 1 Hz

Die Abb. 5.31 zeigt ein Beispiel der Wirkung von Sotalol auf das Aktionspotential bei 1 Hz. Innerhalb von 15 Minuten nach der Zugabe der Substanz wurde keine Änderung des Aktionspotentials festgestellt.

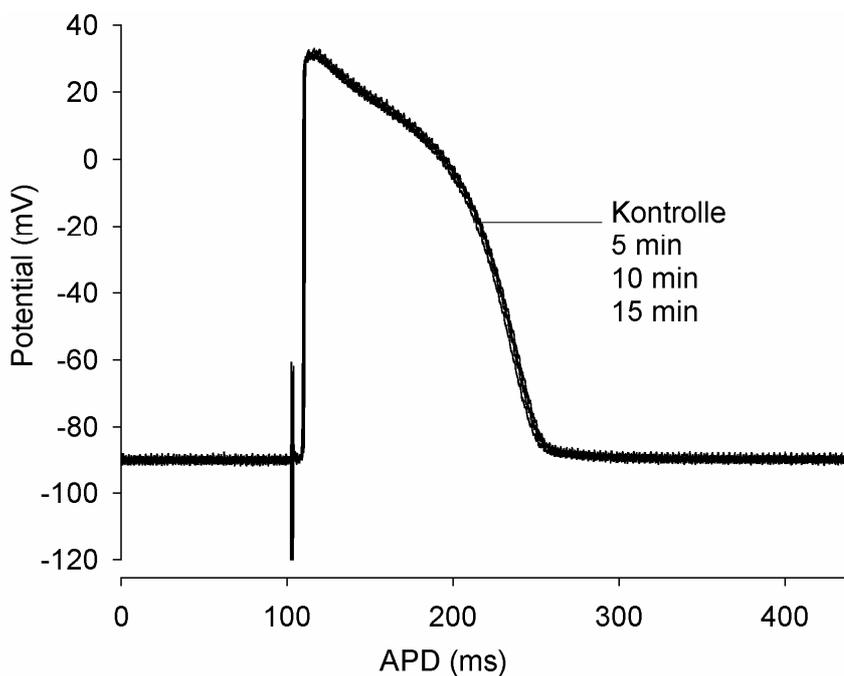


Abb. 5.31 Wirkung von Sotalol bei 1 Hz. Ausgehend von einem Aktionspotential unter Kontrollbedingung wurden Aktionspotentiale 1, 3 und 5 Minuten nach der Zugabe von $10 \mu\text{mol/l}$ Sotalol aufgenommen.

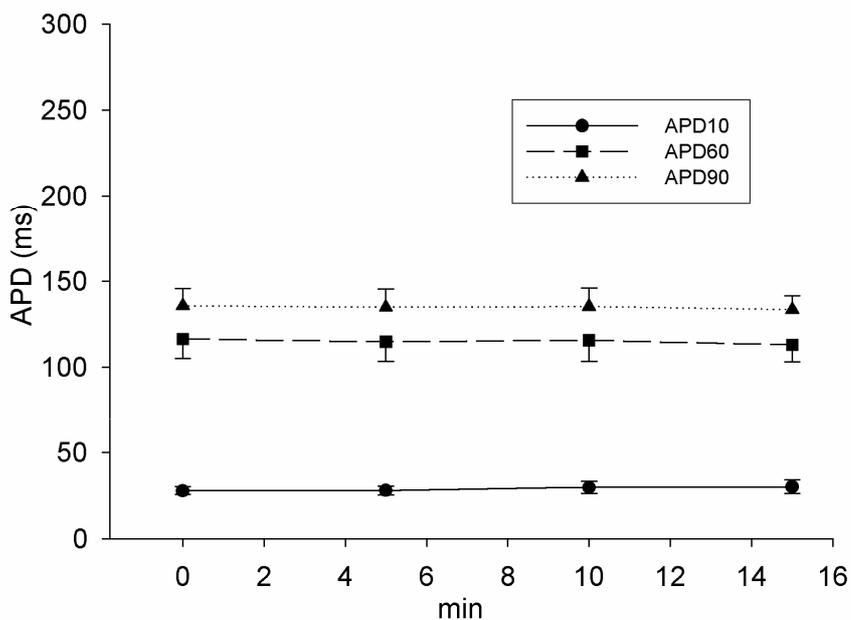


Abb. 5.32 Effekt von $10 \mu\text{mol/l}$ Sotalol auf die Aktionspotentialdauer bei 1 Hz bei 10, 60 und 90 % Repolarisation (Mittelwerte \pm s.e.m von 5 Muskeln).

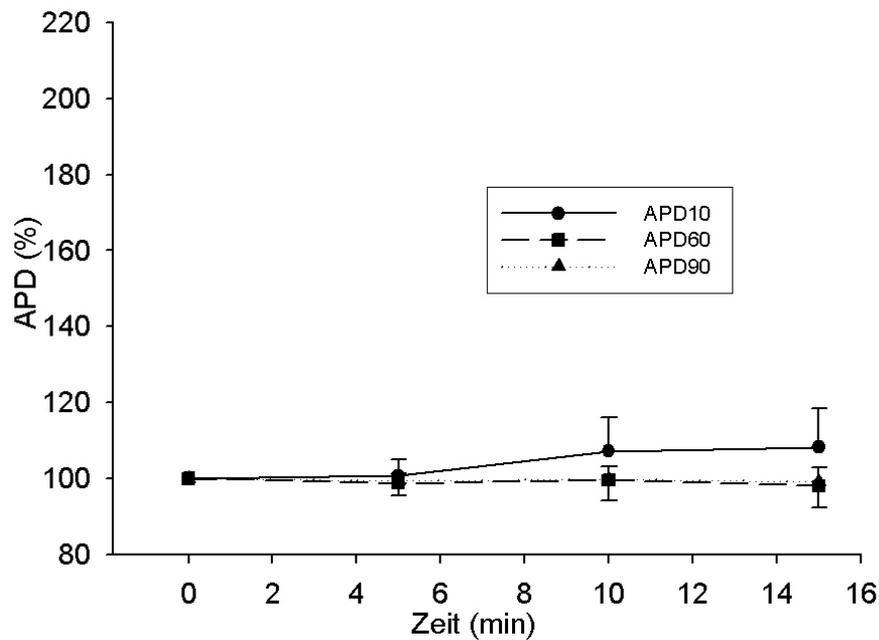


Abb. 5.33 Wirkung von Sotalol ($10 \mu\text{mol/l}$) auf die relative Dauer der APD bei 1 Hz. Es wurde von der APD in der Badlösung (100 %) ausgegangen und dann die relativen APD-Werte bei 10, 60 und 90 % Repolarisation berechnet (Mittelwerte \pm s.e.m von 5 Muskeln).

Die Abb. 5.32 und 5.33 zeigen gemittelte Absolut- und Relativwerte der APD bei 1 Hz unter dem Einfluss von $10 \mu\text{mol/l}$ Sotalol. Es wurde kein Effekt von Sotalol bei 1 Hz festgestellt.

5.2.3.2 Wirkung von Sotalol bei 0,2 Hz

Die Abb. 5.34 zeigt die Wirkung von $10 \mu\text{mol/l}$ Sotalol auf das Aktionspotential bei 0,2 Hz. Bei dieser Frequenz wurde eine deutliche Verlängerung der APD beobachtet, während die anderen Parameter nur wenig verändert wurden.

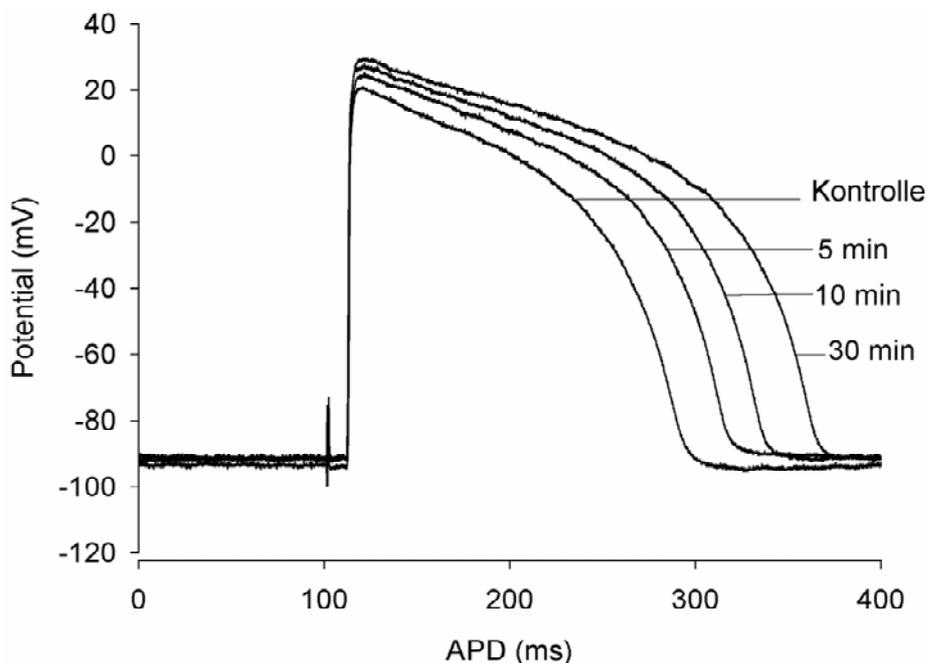


Abb. 5.34 Verlängerung der APD durch Sotalol bei 0,2 Hz. Die Amplitude blieb nahezu unverändert. Ausgehend von einem Aktionspotential unter Kontrollbedingungen wurden Aktionspotentiale 5, 10 und 30 Minuten nach der Zugabe von $10 \mu\text{mol/l}$ Sotalol aufgenommen.

Abb. 5.35 und 5.36 zeigen die absoluten und relativen Werte der APD unter dem Einfluss von $10 \mu\text{mol/l}$ Sotalol bei 0,2 Hz. Im Vergleich zur Wirkung des MeOH-Extraktes von *D. oliveri*, der eine stärkere relative Verlängerung der APD bei 10 % verursachte (siehe Kapitel 5.2.1.2), wurden unter dem Einfluss von Sotalol die APD's bei 10, 60 und 90 % Repolarisation relativ zum Ausgangswert etwa gleich stark verlängert.

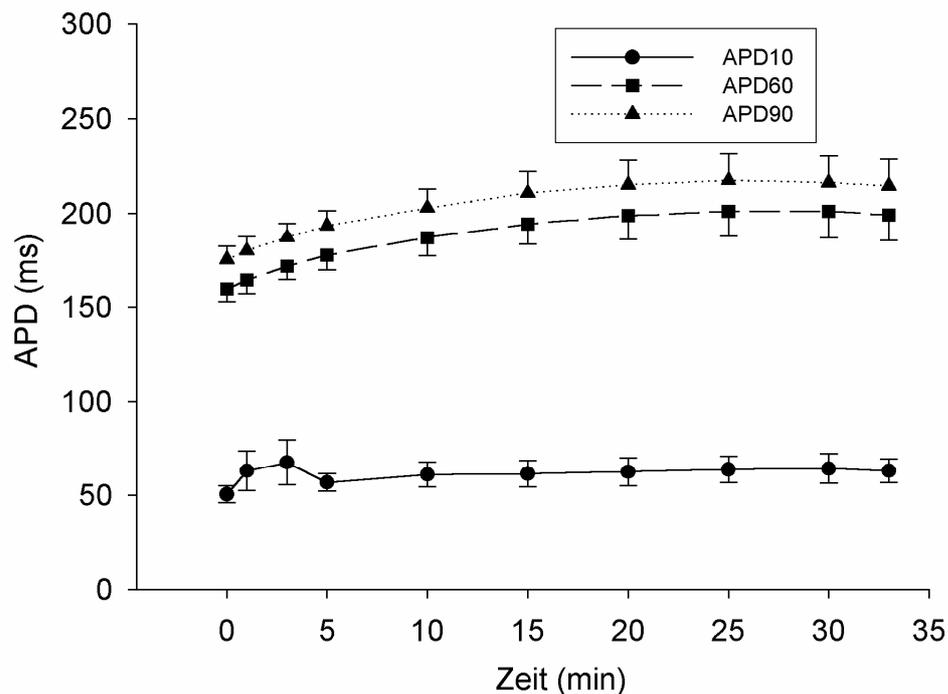


Abb. 5.35 Effekt von 10 $\mu\text{mol/l}$ Sotalol auf die Aktionspotentialdauer bei 0,2 Hz bei 10, 60 und 90 % Repolarisation (Mittelwerte \pm s.e.m von 4 Muskeln).

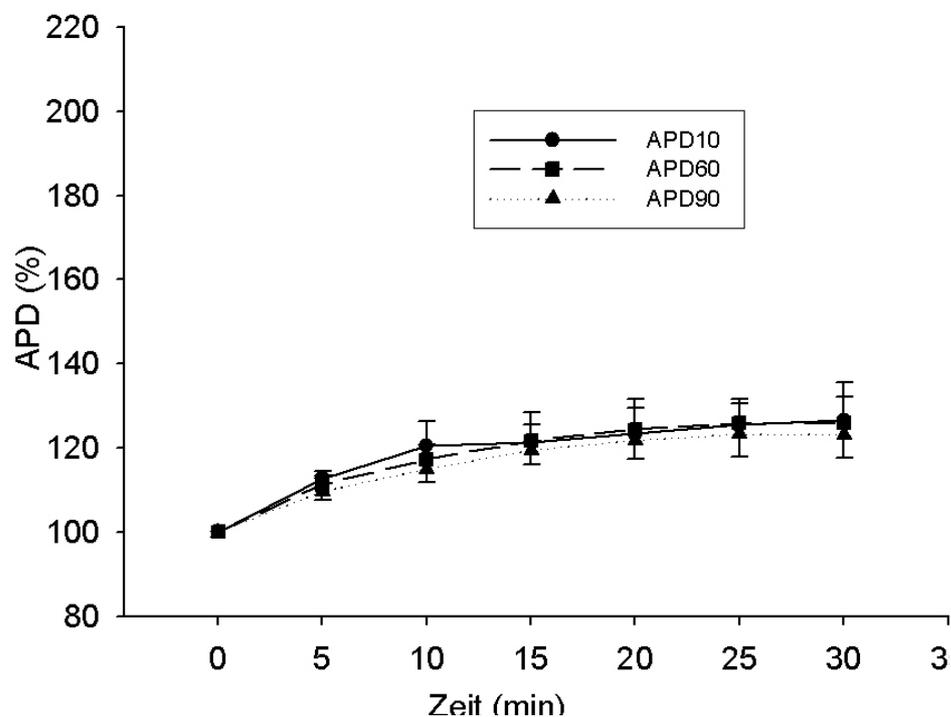


Abb. 5.36 Wirkung von Sotalol auf die relative Dauer des AP's bei 0,2 Hz. Es wurde von der APD unter Kontrollbedingungen (100 %) ausgegangen und die relativen APD-Werte bei 10, 60 und 90 % Repolarisation berechnet (Mittelwerte \pm s.e.m von 4 Muskeln).

Abb. 5.37 stellt die Wirkung von Sotalol bei 0,2 Hz auf die Amplitude und die maximale Depolarisations-Geschwindigkeit des Aktionspotentials dar. Es wurde kein Effekt festgestellt.

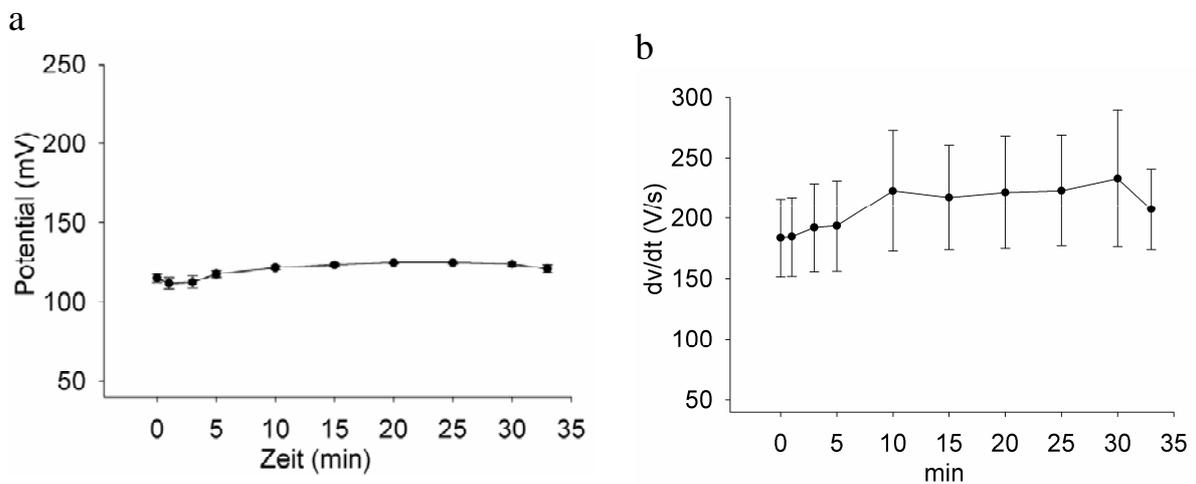


Abb. 5.37 Wirkung von Sotalol bei 0,2 Hz auf die Amplitude (a) und auf die maximale Depolarisations-Geschwindigkeit (b) des Aktionspotentials (Mittelwerte \pm s.e.m von 4 Muskeln).

5.2.4 Wirkung von Kalium auf die APD nach Einwirkung von Sotalol oder dem Methanol-Extrakt von *D. oliveri*

Abb. 5.38 stellt den Effekt von Kalium auf ein durch 10 μ mol/l Sotalol verlängertes Aktionspotential dar. Eine Anhebung der extrazellulären Kalium-Konzentration von 4 auf 6 mmol/l bewirkte nur eine geringe Verkürzung der APD. Abb. 5.39 zeigt ebenfalls eine leichte Verkürzung eines durch MeOH-Extrakt von *D. oliveri* (10 mmol/l) verlängerten Aktionspotentials unter dem Einfluss von Kalium. In beiden Fällen konnte man, wie zu erwarten, eine Depolarisation des Membranpotentials durch die Erhöhung der extrazellulären Kalium-Konzentration feststellen.

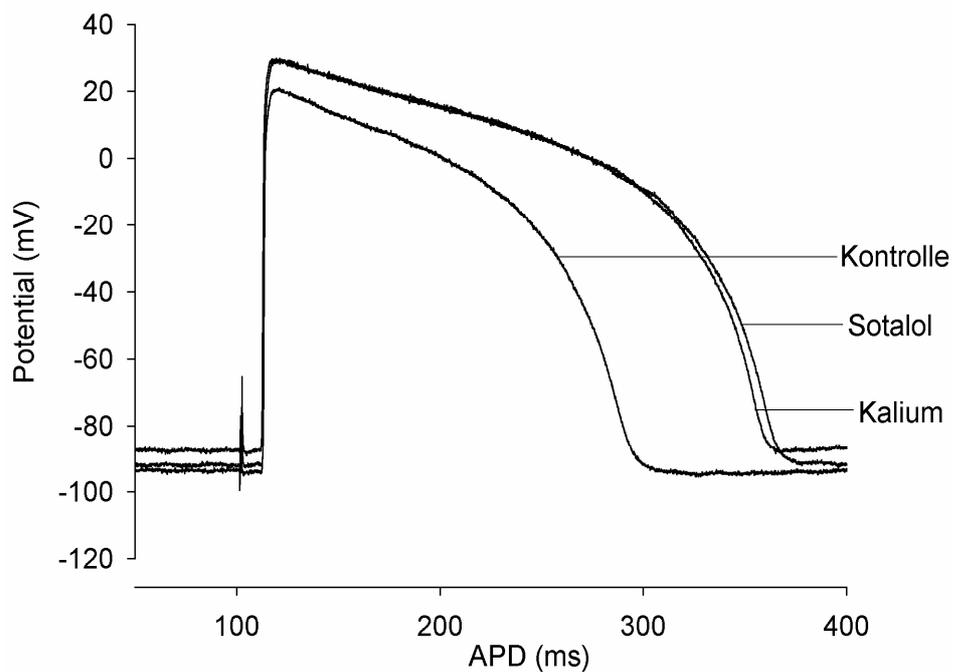


Abb. 5.38 Wirkung von Kalium auf ein durch 10 $\mu\text{mol/l}$ Sotalol verlängertes Aktionspotential. Die Kalium-Konzentration im Bad wurde 30 min nach der Zugabe von Sotalol von 4 auf 6 mmol/l erhöht.

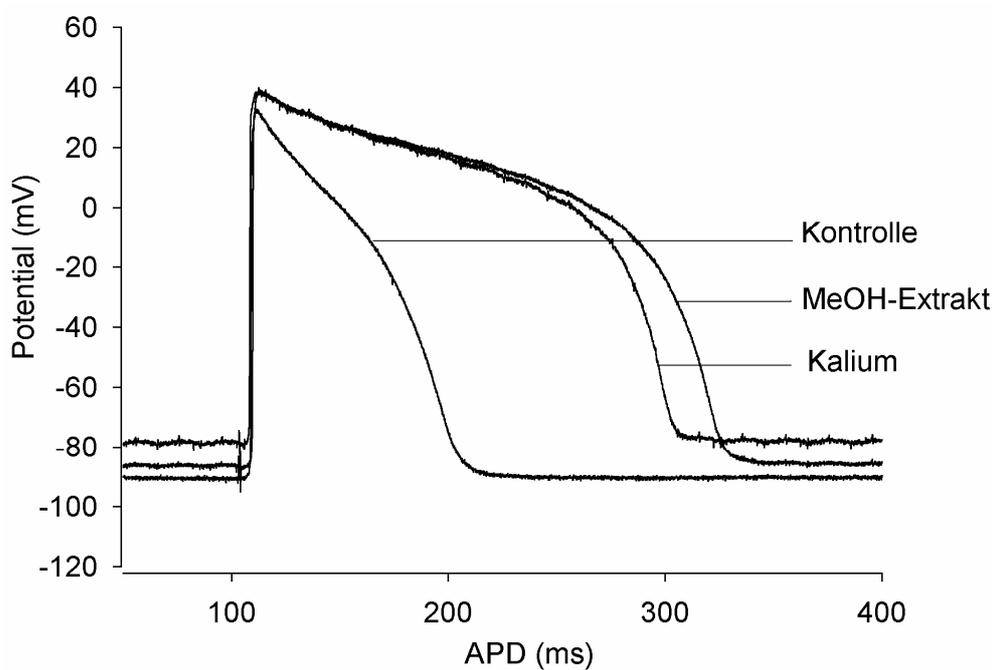


Abb. 5.39 Wirkung von Kalium auf ein durch den MeOH-Extrakt von *D. oliveri* (10 mg/l) verlängertes Aktionspotential. Die Kalium-Konzentration im Bad wurde von 4 auf 6 mmol/l erhöht.

5.2.5 Einfluss von *D. oliveri*-Extrakten auf die Kontraktion von Meer-schweinchen-Aortenringen

5.2.5.1 Noradrenalin-induzierte Kontraktionen

Um den Einfluss der *D. oliveri*-Extrakte auf Noradrenalin-induzierte Kontraktionen der glatten Gefäßmuskulatur untersuchen zu können, wurden Aortenringe mit einer Badkonzentration von 10 $\mu\text{mol/l}$ Noradrenalin vorkontrahiert und die Extrakt-Konzentration kumulativ erhöht. Die Extrakte wurden jeweils an 6 Präparaten untersucht. In jedem Einzelversuch diente die Kontraktionskraft vor Zugabe des Extraktes als Referenzwert (=100 %).

Tab. 5.2 Wirkung verschiedener Extrakte von *D. oliveri* auf NA-vorkontrahierte Aortenringe (EME: Erreichter Maximaler Effekt).

<i>Danilla oliveri</i> -Extrakte	EME (% Relaxation)	Konzentration bei EME (mg/l)	EC ₅₀ (mg/l) Halbmaximal wirksame Konzentration
Hexan	14,0 \pm 13,6	70	/
MeOH	60,7 \pm 3,7	3	0,77
CH ₂ Cl ₂ -MeOH	70,6 \pm 8,4	30	4,88
EtOAc	21,3 \pm 4,4	100	/
Hexan-EtOAc	6,2 \pm 7,1	300	/

Abb. 5.40 und Tab. 5.2 zeigen die Wirkung von *D. oliveri*-Extrakten auf Noradrenalin- (NA-) vorkontrahierte Aortenringe. Bei den Hexan-EtOAc-, bzw. Hexan- und EtOAc- Extrakten zeigte sich nur eine relativ geringe Relaxation. Die CH₂Cl₂-MeOH- und MeOH-Extrakte bewirkten dagegen starke Relaxationen. Unter Kontrollbedingungen (Lösungsmittel ohne Pflanzenextrakt) kam es zu keiner Relaxation sondern sogar zu einer nicht unwesentlichen Zunahme der Kraft um 33,8 \pm 6,0 %.

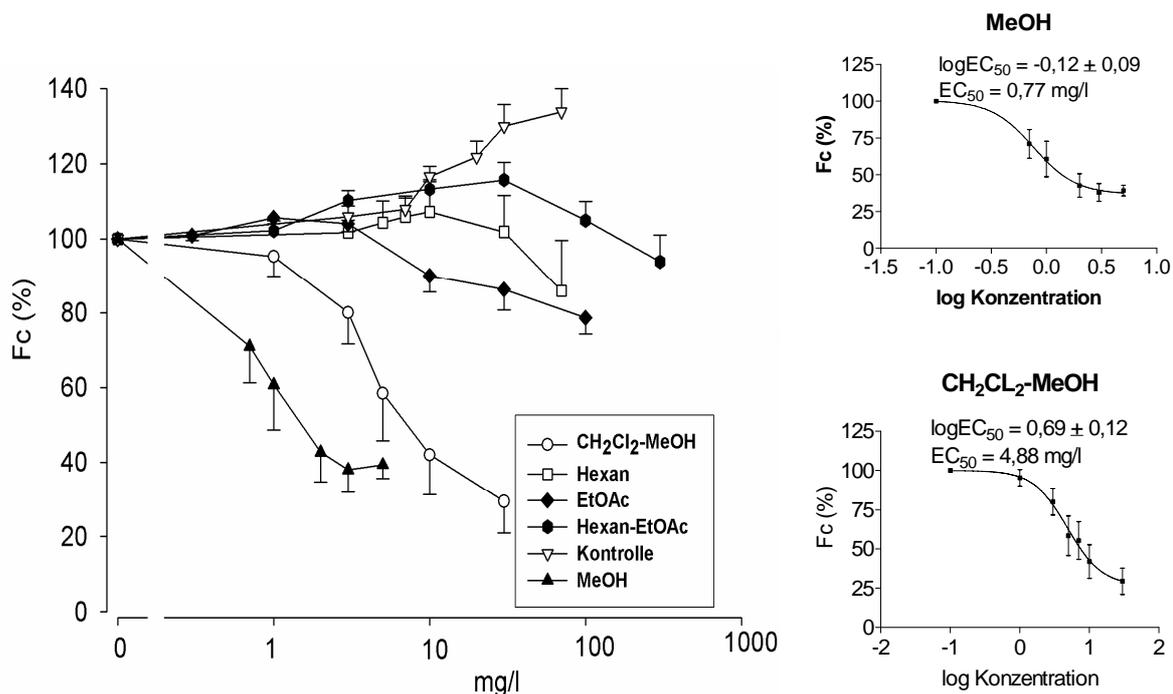


Abb. 5.40 Relaxation vorkontrahierter Aortenringe durch kumulative Zugabe von Extrakten von *D. oliveri*. Vorkontraktion mit NA ($10 \mu\text{mol/l}$) = 100 % (Mittelwerte \pm s.e.m aus 6 Versuchen). Die rechten Abbildungen stellen gefittete Konzentrations-Wirkungskurven für die MeOH- und CH₂Cl₂-MeOH-Kurven dar.

5.2.5.2 Kalium-induzierte Kontraktionen

Der Effekt der *D. oliveri*-Extrakte wurde auch an Kalium (30 mmol/l) - vorkontrahierten Aortenringen untersucht. Die Extrakte wurden jeweils an 6 Präparaten untersucht. In jedem Einzelversuch diente wieder die Kontraktionskraft der Vorkontraktion vor Zugabe des Extraktes als Referenzwert (=100 %).

Abb. 5.41 und Tab. 5.3 zeigen die Wirkung von *D. oliveri*-Extrakten auf Kalium-vorkontrahierte Aortenringe. Die CH₂Cl₂-MeOH- und MeOH-Extrakte zeigten deutliche relaxierende Wirkungen. Maximal wurden die Aorten um $76,6 \pm 4,3$ und $43,5 \pm 8,6$ % relaxiert.

Tab. 5.3 Wirkung verschiedener Extrakte von *D. oliveri* auf KCl-vorcontrahierte Aortenringe (EME: Erreichter Maximaler Effekt)

<i>Daniella oliveri</i> Extrakte	EME (% Relaxation)	Konzentration bei EME (mg/l)	EC ₅₀ (mg/l) Halb Maximale wirksame Konzentration
MeOH	43,51 ± 8,7	3	0,85
CH ₂ Cl ₂ -MeOH	76,6 ± 4,3	30	9,44

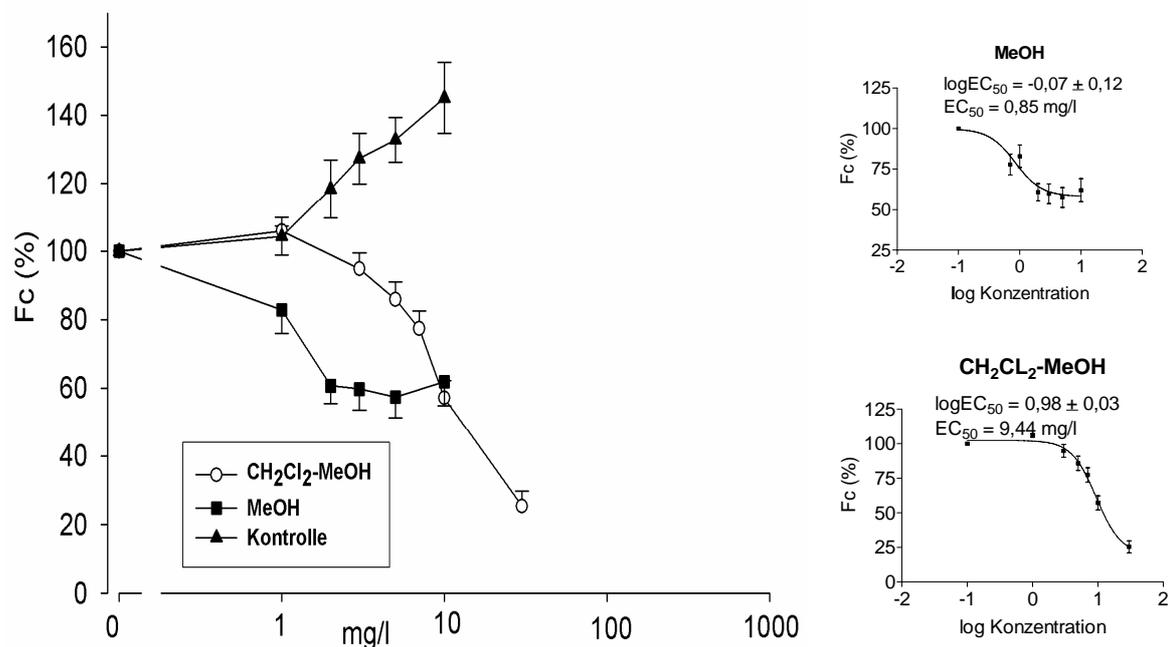


Abb. 5.41 Relaxation vorkontrahierter Aortenringe durch kumulative Zugabe von Extrakten von *D. oliveri*. Vorkontraktion mit Kalium (30 mmol/l) = 100 % (Mittelwerte ± s.e.m aus 6 Versuchen). Die rechten Abbildungen stellen die gefittete Konzentrations-Wirkungskurven für die MeOH- und CH₂Cl₂-MeOH-Extrakte dar.

Die EC₅₀ des Effekts des MeOH-Extraktes war im Vergleich zu dem Versuch mit den NA-vorkontrahierten Aortenringen etwas höher. Dagegen war die EC₅₀ des CH₂Cl₂-MeOH-Extraktes unter dem Einfluss von Kalium fast doppelt so hoch wie die unter NA.

Ähnlich wie bei den NA-vorkontrahierten Aortenringen zeigten die Hexan-EtOAc-, Hexan- und EtOAc-Extrakte auch unter dem Einfluss von Kalium nur eine geringe relaxierende Wirkung.

5.2.5.3 Einfluss von Sotalol, Amiodaron und Clofilium auf Noradrenalin-vorkontrahierte Aortenringe

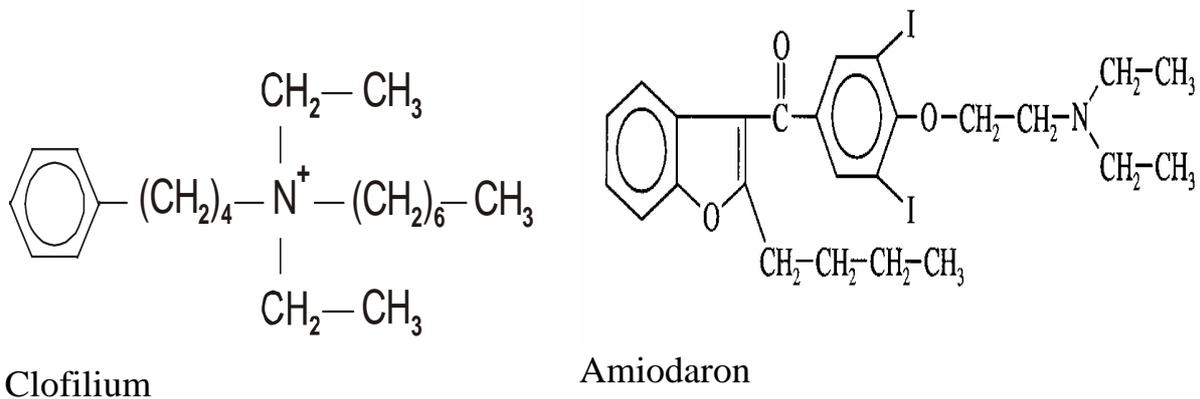


Abb. 5.42 Clofilium und Amiodaron

Die Wirkung der Kalium-Kanal-Blocker Clofilium, Amiodaron (Struktur Formeln siehe Abb. 5.42) und Sotalol (Nand & Dogrell, 2000, Bhattacharyya et al., 1997, Carmeliet, 1985), wurde an NA-vorkontrahierten Aortenringen geprüft. Sotalol und Amiodaron verursachten keine Relaxation sondern leichte Spannungszunahmen von $23,3 \pm 3,0$ und $18,5 \pm 5,8$ % (Abb. 5.43). Clofilium bewirkte bis zu einer Konzentration von $30 \mu\text{mol/l}$ ebenfalls keine Relaxation. Eine Konzentration von $100 \mu\text{mol/l}$ führte dann aber zu einer sehr starken Relaxation mit einer EME von $91,5 \pm 6,9$ %.

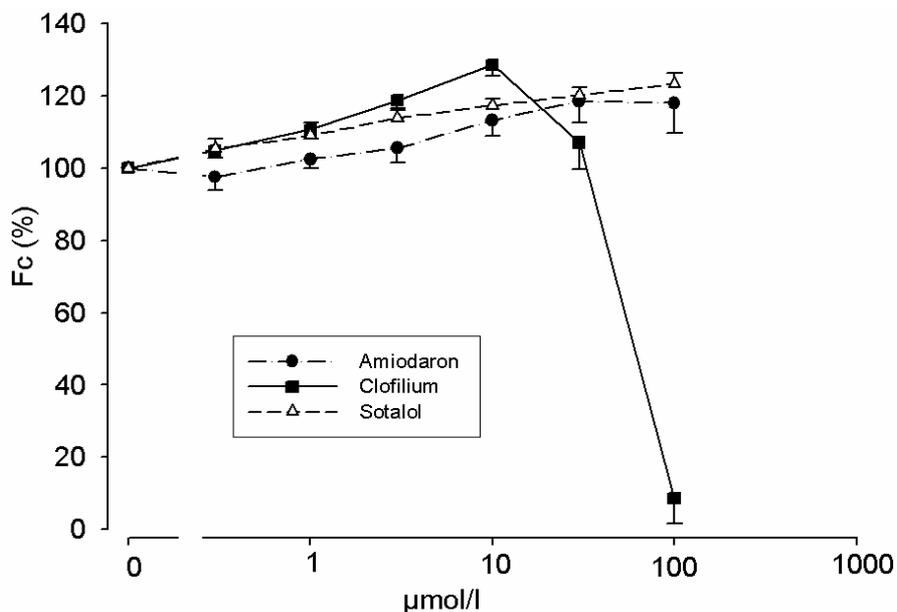


Abb. 5.43 Wirkung von drei Kalium-Kanal-Blockern (Sotalol, Amiodaron und Clofilium) an vorkontrahierten Aortenringen. Vorkontraktion mit NA ($10 \mu\text{mol/l}$) = 100 % (Mittelwerte \pm s.e.m aus jeweils 6 Versuchen).

5.2.5.4 Einfluss von Flavonoiden auf Noradrenalin-vorkontrahierte Aortenringe

Ausgehend von der Tatsache, dass die MeOH- und CH_2Cl_2 -MeOH-Extrakte die wirksamsten Extrakte an kontrahierten Aortenringe waren und dass in beiden Extrakten Flavonoide nachgewiesen werden konnten, wurde der Effekt von Flavonoiden auf die Aortenringe untersucht (Abb. 5.44).

Es wurden insgesamt 7 Flavonoide aus vier Gruppen (Flavone: Orientin und Vitexin, Flavonole: Quercetin und Rutin, Flavonone: Naringin, Anthocyanidine: Cyanidin) eingesetzt. Die Aortenmuskulatur wurde nur von zweien (Cyanidin, $\text{EC}_{50} = 5,8 \pm 0,03 \text{ mg/l}$ und Quercetin, $\text{EC}_{50} = 8,4 \pm 0,03 \text{ mg/l}$) der sieben gewählten Flavonoide relaxiert.

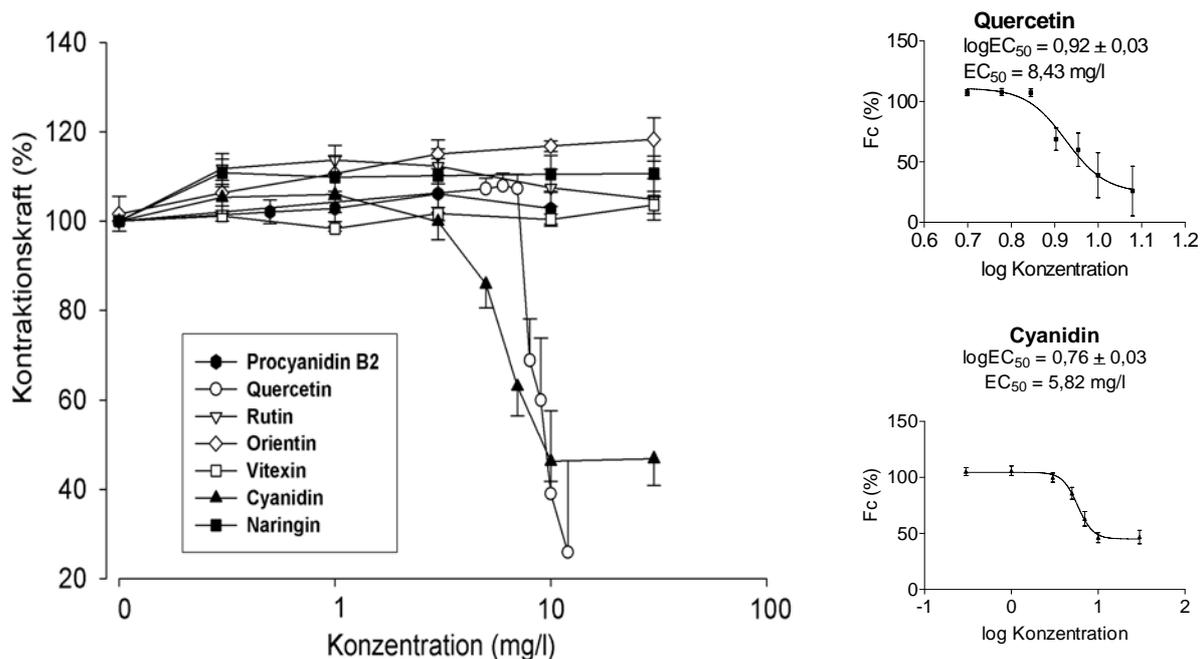


Abb. 5.44 Wirkung von Flavonoiden auf NA-vorkontrahierte Aortenringe. Vorkontraktion mit NA ($10 \mu\text{mol/l}$) = 100 % (Mittelwerte \pm s.e.m. aus jeweils 6 Versuchen). Die rechte Abbildung zeigt die gefittete Konzentrations-Wirkungskurven für Quercetin und Cyanidin.

5.2.6 Einfluss von *D. oliveri*-Extrakten auf die Kontraktion isolierter Papillarmuskeln

Weitere Untersuchungen mit den verschiedenen Extrakten von *D. oliveri* wurden an Papillarmuskeln von Meerschweinchen-Herzen durchgeführt. Wie in Abb. 5.45 zu sehen ist, wurde unter dem Einfluss der Extrakte keine wesentliche Änderung der Kontraktionsgipfelkraft und der anderen Parameter der Kontraktionskurve festgestellt.

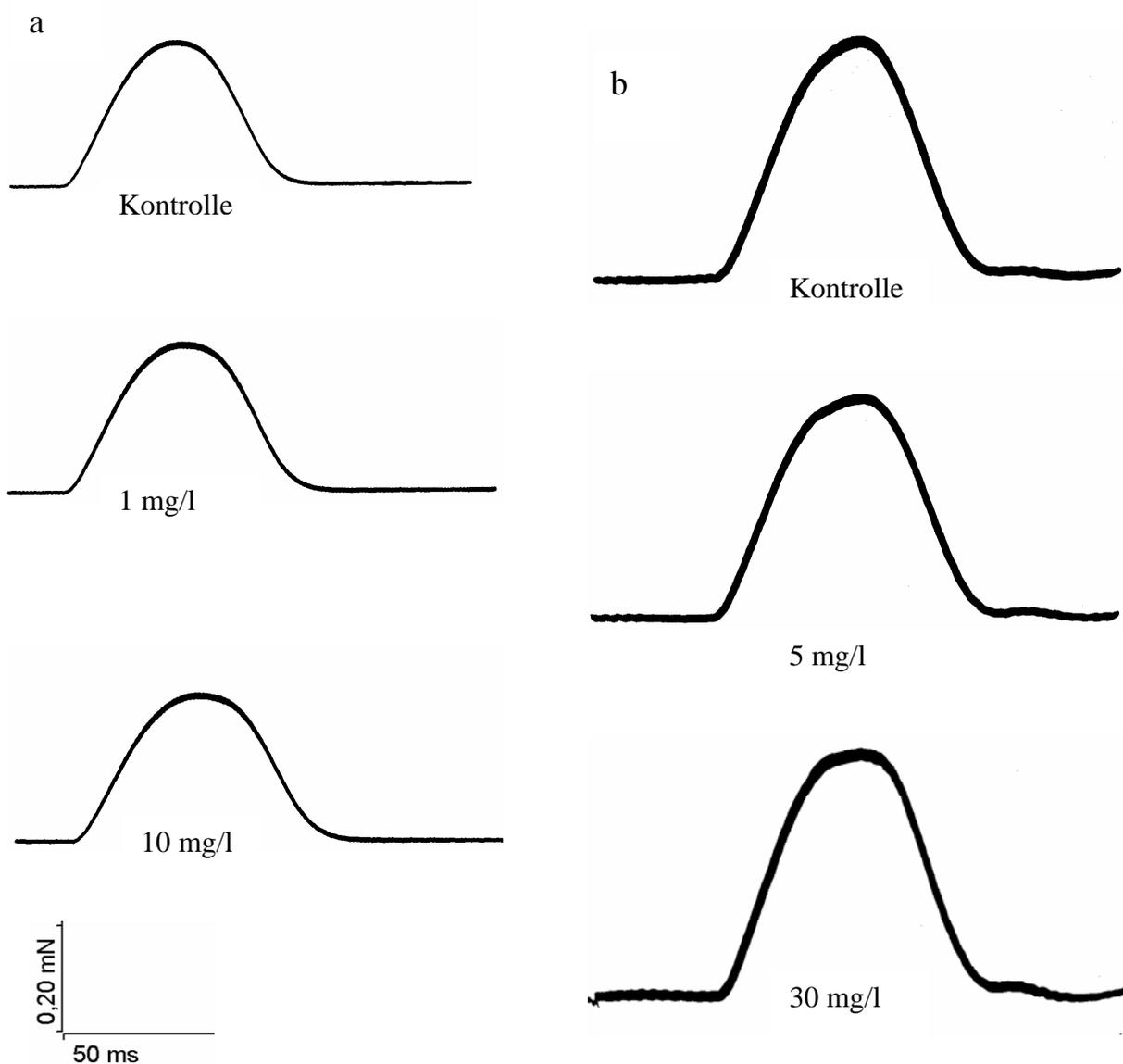


Abb. 5.45 Wirkung des MeOH- und des CH₂Cl₂-MeOH Extraktes von *D. oliveri* auf die Kontraktionskurve des Papillarmuskels. (a) Effekt des MeOH-Extraktes (b) Effekt des CH₂Cl₂-MeOH-Extraktes

Abb. 5.46 zeigt den Effekt der Extrakte von *D. oliveri* auf die Kontraktionskraft von Papillarmuskeln. Unter dem Einfluss der Hexan- und EtOAc-Extrakte kam es zu keiner Kraftabnahme der Muskeln. Maximale Kraftabnahmen von $23,4 \pm 5,5$ und $14,8 \pm 7,0$ % wurden durch CH₂Cl₂-MeOH- und MeOH-Extrakte erzeugt. Ausgehend von der Tatsache, dass es auch unter Kontrollbedingungen zu einer ähnlich starken Kraftabnahme (um $23,0 \pm 3,8$ %) kam, kann man den

CH₂Cl₂-MeOH- bzw. den MeOH-Extrakt als nicht effektiv am Papillarmuskel betrachten.

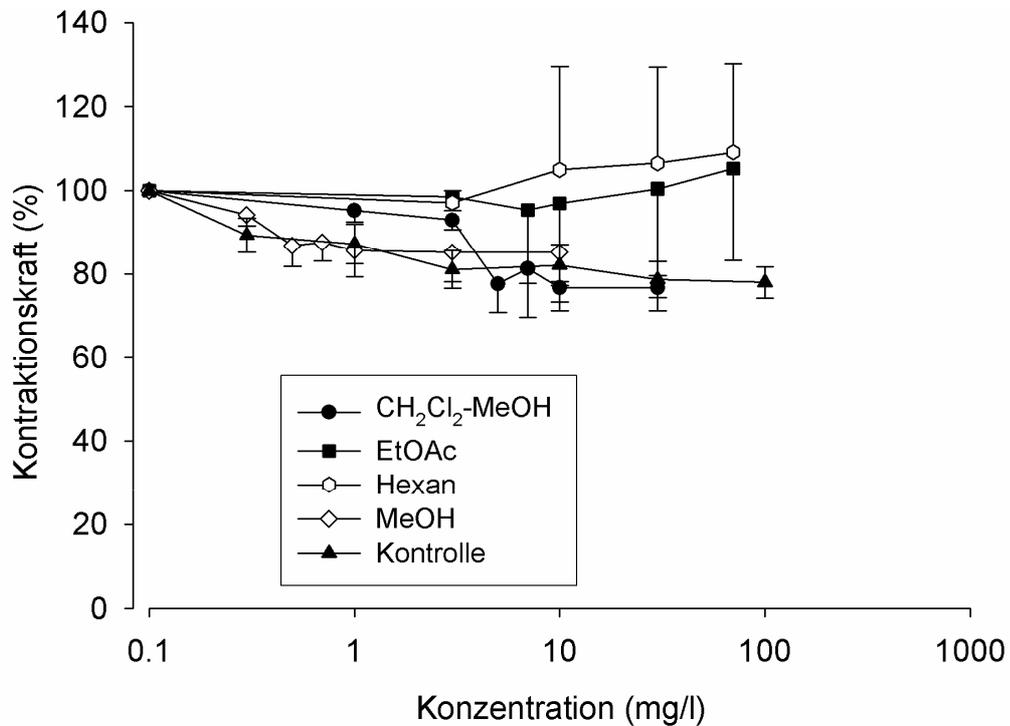


Abb. 5.46 Wirkung der Extrakte von *D. oliveri* auf die Kontraktionskraft von Papillarmuskeln. Im Kontrollversuch wurde nur der Lösungsvermittler (DMSO) ohne Extrakt zugegeben (Mittelwerte \pm s.e.m aus jeweils 6 Versuchen).

5.2.7 Einfluss von *D. oliveri*-Extrakten auf die Kontraktion der Meerschweinchen-Trachea

Abb. 5.47 zeigt die Wirkung des MeOH-Extraktes von *D. oliveri* auf die Carbachol-vorkontrahierte Trachea. Eine leichte Erschlaffung (um ca. $36,7 \pm 5,1$ %) bei einer Konzentration von 10 mg/l wurde festgestellt.

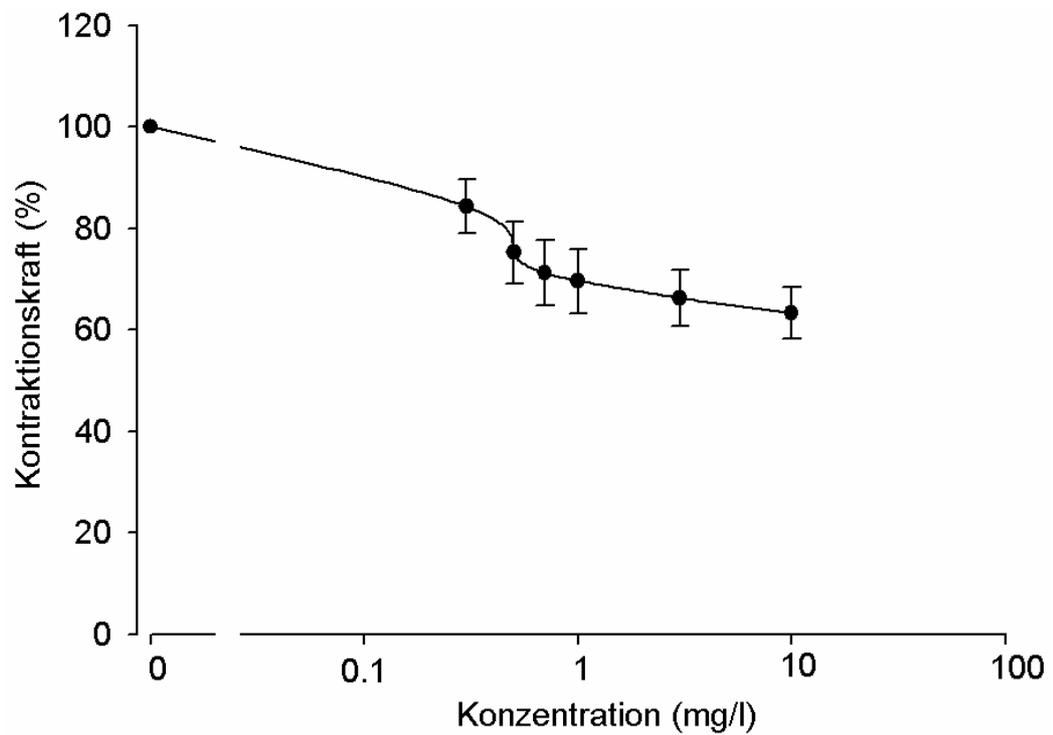


Abb. 5.47 Wirkung des MeOH-Extraktes von *D. oliveri* auf die vorkontrahierte glatte Muskulatur der Meerschweinchen-Trachea. Vorkontraktion mit Carbachol ($1\mu\text{mol/l}$) = 100 %, Mittelwerte \pm s.e.m aus 7 Versuchen.

5.3 *Vitex cienkowskii*

5.3.1 Chemische Untersuchung

Auch bei den *D. oliveri*-Extrakten waren reichlich Tannine vorhanden. Diese wurden mit Hilfe einer Säule, die Polyamid enthielt, entfernt.

Abb. 5.48 zeigt die dann erhaltenen Dünnschicht-Chromatogramme. Als Fließmittel wurde Toluol-CH₃COOH-MeOH (50:40:5) verwendet. Die Detektion wurde mit Hilfe von Komarowsky-Reagenz durchgeführt. In Tab. 5.4 sind nachgewiesene Stoffgruppen von *V. cienkowskii*-Extrakten aufgelistet.



Abb. 5.48 Beispiel für DC-Chromatogramme von *V. cienkowskii*.
He: Hexan-Extrakt, Ch: CH₂Cl₂-Extrakt, Si: β -Sitosterol, Et: EtOAc-Extrakt.

Tab. 5.4 Inhaltstoffe der Extrakte von *V. cienkowskii*

Pflanzen-Extrakt	Stoffe
Hexan	Tannine Terpenoide
CH ₂ Cl ₂	Tannine Terpenoide
EtOAc	Tannine Terpenoide
MeOH	Tannine Terpenoide

5.3.1 Einfluss von *V. cienkowskii*-Extrakten auf das Aktionspotential von Meerschweinchen-Herzen

Nach der Zugabe von *V. cienkowskii*-Extrakten wurden keine Änderungen des Aktionspotentials festgestellt.

Abb. 5.49 zeigt ein Beispiel der Wirkung des MeOH-Extraktes von *V. cienkowskii* auf das Aktionspotential. In Abb. 5.50 und ist der Einfluss des MeOH-Extraktes auf Aktionspotentialdauer wiedergegeben. Die AP-Dauer, die Amplitude und dv/dt wurden durch den Extrakt nicht wesentlich verändert.

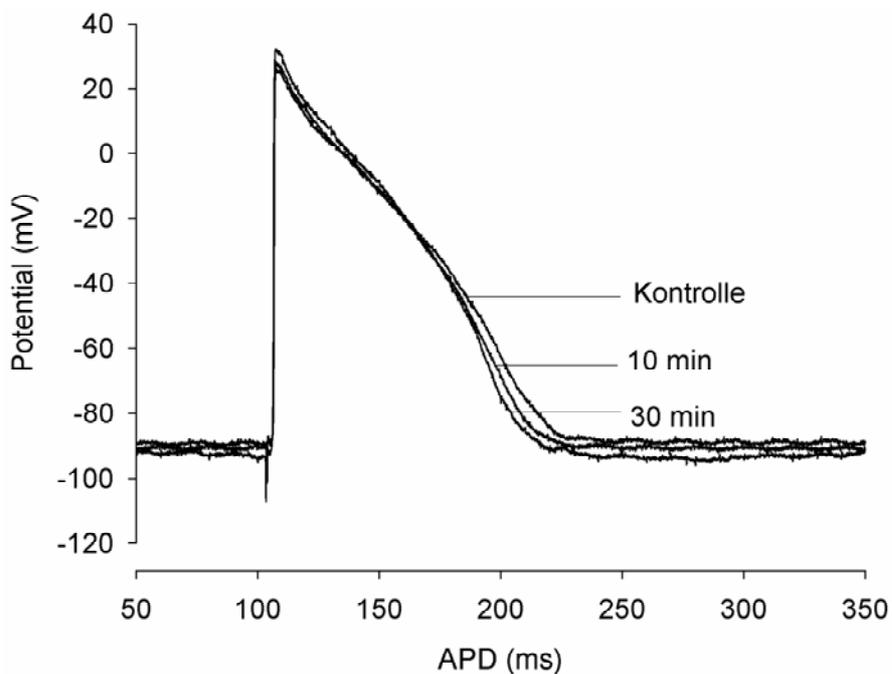


Abb. 5.49 Wirkung des MeOH-Extraktes (10 mg/l) von *V. cienkowskii* auf das Aktionspotential bei 0,2 Hz. Ausgehend von einem Aktionspotential unter Kontrollbedingungen wurden die Aktionspotentiale 10 und 30 Minuten nach der Zugabe von 10 mg/l Extrakt aufgenommen.

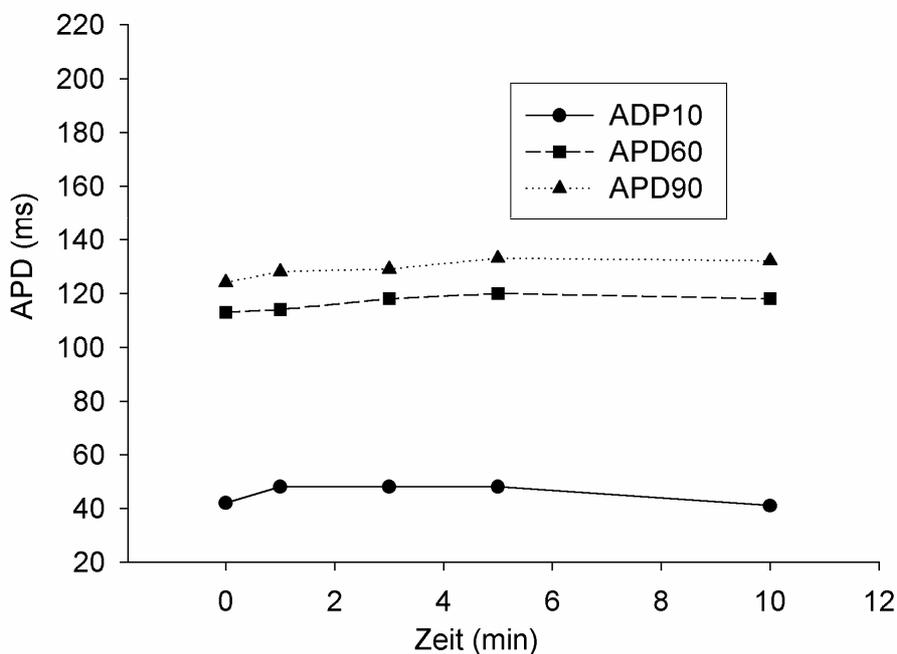


Abb. 5.50 Wirkung des MeOH-Extraktes (10 mg/l) von *V. cienkowskii* auf die relative Dauer des APs bei 1 Hz. Es wurde von der APD unter Kontrollbedingung ausgegangen und die relativen APD-Werte bei 10, 60 und 90 % Repolarisation berechnet (Mittelwerte aus 2 Versuche).

5.3.2 Einfluss von *V. cienkowskii*-Extrakten auf die Kontraktion von Meerschweinchen-Aortenringen

5.3.2.1 Noradrenalin-induzierte Kontraktionen

Um den Einfluss der *V. cienkowskii*-Extrakte auf die Noradrenalin-Kontraktion von Aortenringen untersuchen zu können, wurden die Ringe mit 10 $\mu\text{mol/l}$ Noradrenalin vorkontrahiert und dann die Extrakte kumulativ zugegeben. Die Extrakte wurden jeweils an 6 Präparaten untersucht. In jedem Einzelversuch diente die Kontraktionskraft der Vorkontraktion als Referenzwert (= 100 %).

Abb. 5.51 und Tab. 5.5 stellen die Wirkung von *V. cienkowskii*-Extrakten auf NA-vorkontrahierte Aortenringe dar. Die erreichten maximalen Effekte (EME) waren bei den CH_2Cl_2 - bzw. Hexan- und EtOAc-Extrakten Relaxationen um $5,7 \pm 13,0$ % bzw. $17,2 \pm 8,5$ % und $40,7 \pm 10,0$ %. Der MeOH-Extrakt verursachte eine starke maximale Relaxation von $85,35 \pm 3,90$ % bei 30 mg/l. Unter Kontrollbedingungen (Zugabe des Lösungsvermittlers DMSO ohne Extrakt) kam es zu keiner Relaxation sondern zu einer Kraftzunahme (maximal um $33,9 \pm 6,1$ %).

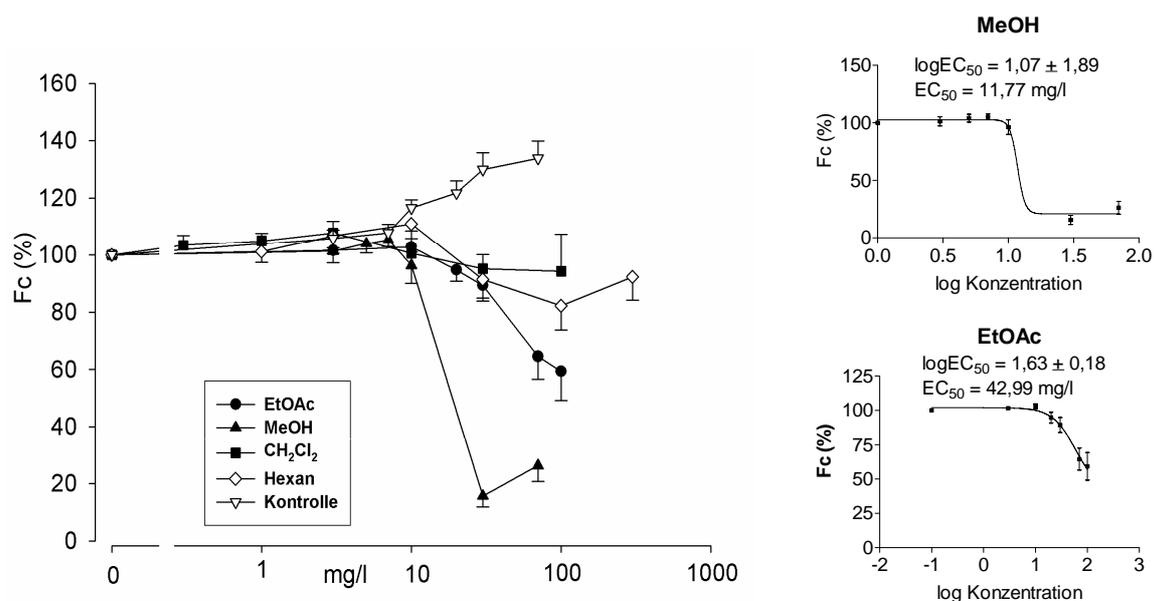


Abb.5.51 Relaxation vorkontrahierter Aortenringe durch kumulative Zugabe von Extrakten von *V. cienkowskii*. Vorkontraktion mit NA ($10 \mu\text{mol/l}$) = 100 %. Mittelwerte \pm s.e.m aus jeweils 6 Versuchen Die rechten Abbildungen stellen die gefittete Konzentrations-Wirkungskurven für die MeOH- und EtOAc-Extrakte dar.

Tab. 5.5 Wirkung verschiedener Extrakte von *V. cienkowskii* auf NA-vorkontrahierte Aortenringe. (EME: Erreichter Maximaler Effekt)

<i>V. Cienkowskii</i> - Extrakte	EME (% Relaxation)	Konzentration bei EME (mg/l)	EC_{50} (mg/l) Halbmaximale Konzentration
Hexan	$17,2 \pm 8,5$	100	/
MeOH	$85,4 \pm 3,9$	30	11,7
CH_2Cl_2	$5,7 \pm 13,0$	30	/
EtOAc	$40,7 \pm 10,0$	100	43,0

5.3.2.2 Kalium-induzierte Kontraktionen

Abb. 5.52 und Tab 5.6 stellen die Wirkung von *V. cienkowskii*-Extrakten auf mit Kalium (30 mmol/l) vorkontrahierte Aortenringe dar. Die Extrakte wurden jeweils an 6 Präparaten untersucht. In jedem Einzelversuch diente die Kontraktionskraft der Vorkontraktion als Referenzwert (= 100 %).

Ähnlich wie bei den NA-vorkontrahierten Aortenringen verursachten die Hexan-, CH₂Cl₂- und EtOAc-Extrakte nur geringe Relaxationen.

Der MeOH-Extrakt zeigte dagegen eine stärker relaxierende Wirkung mit einem maximalen Effekt von $36,8 \pm 9,7$ %. Dieser Effekt des MeOH-Extraktes war aber weniger stark im Vergleich zu dem in NA-vorkontrahierten Aortenringen und die für den Maximaleffekt nötige Konzentration erhöhte sich auf 70 mg/l.

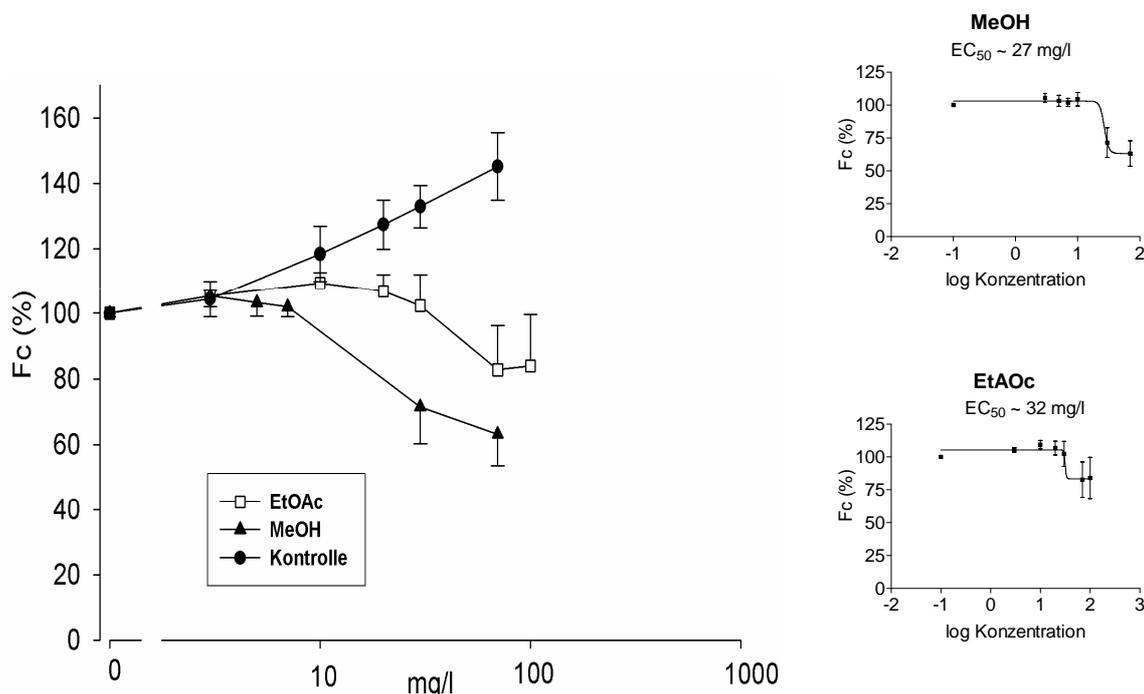


Abb. 5.52 Relaxation vorkontrahierter Aortenringe durch kumulative Zugabe von Extrakten von *V. cienkowskii*. Vorkontraktion mit Kalium (30 mmol/l) = 100 % (Mittelwerte \pm s.e.m aus jeweils 6 Versuchen). Die rechten Abbildungen stellen die gefittete Konzentrations-Wirkungskurven für die MeOH- und EtOAc-Extrakte dar.

Tab. 5.6 Wirkung verschiedener Extrakte von *V. cienkowskii* auf Kalium-vorkontrahierte Aortenringe. (EME: Erreichter Maximaler Effekt).

<i>V. Cienkowskii</i> Extrakte	EME (% Relaxation)	Konzentration bei EME (mg/l)	EC ₅₀ (mg/l) Halbmaximale Konzentration
MeOH	36,8 ± 9,7	70	≈ 27
EtOAc	17,3 ± 13,5	70	≈ 32

5.3.3 Einfluss von *V. cienkowskii*-Extrakten auf die Kontraktion isolierter Papillarmuskeln

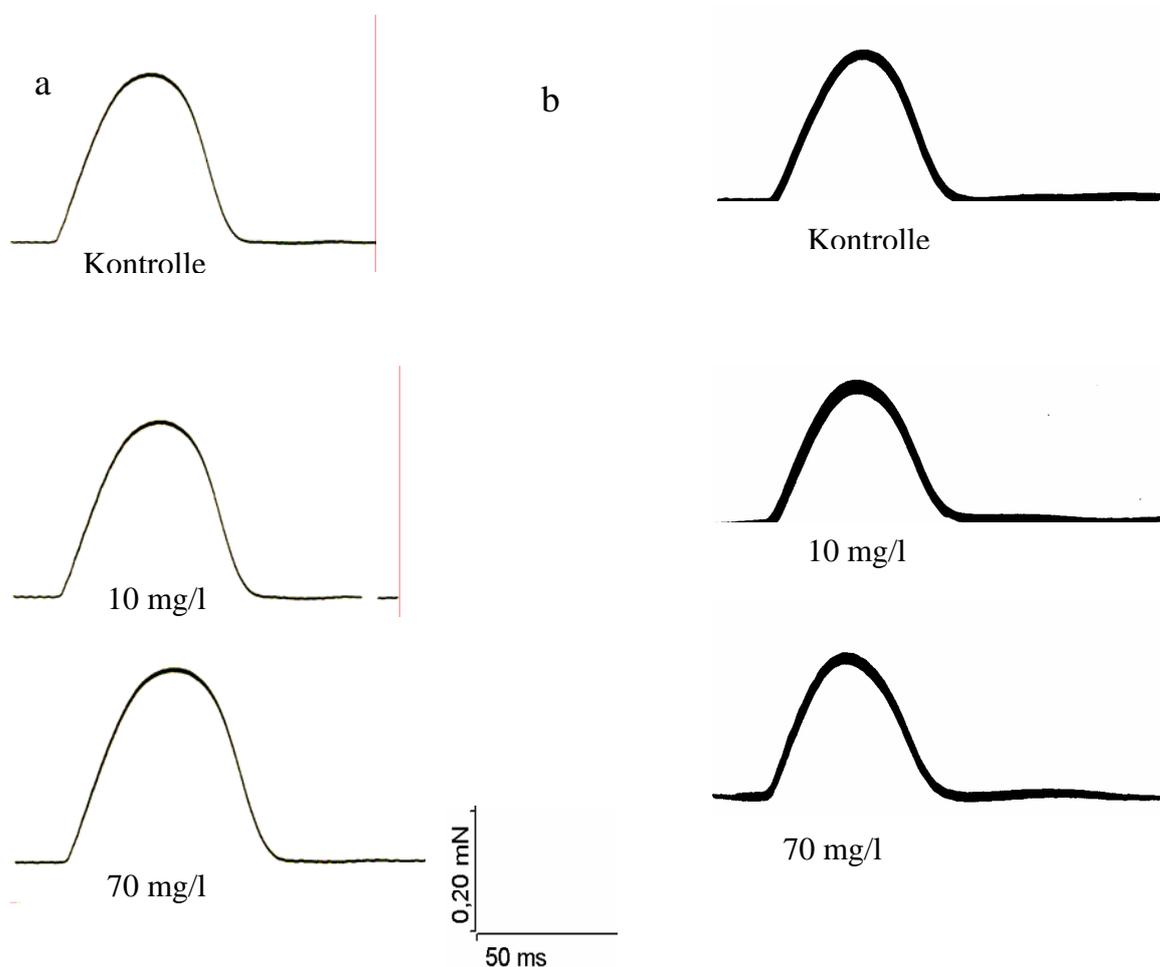


Abb. 5.53 Wirkung zweier Extrakte von *V. cienkowskii* auf die Kontraktionskurve des Papillarmuskels. (a) Effekt des MeOH-Extraktes, (b) Effekt des Hexan-Extraktes.

Untersuchungen mit den verschiedenen Extrakten von *V. cienkowskii* wurden an Papillarmuskeln von Meerschweinchen-Herzen durchgeführt. Abb. 5.53 zeigt Beispiele der Wirkung dieser Extrakte auf die Kontraktionskurve von Papillarmuskeln. Die Extrakte hatten keinen wesentlichen Einfluss auf die Kontraktionen.

Abbildung 5.54 stellt den Effekt der Extrakte von *V. cienkowskii* auf die Kontraktionskraft von Papillarmuskeln dar. Es kam zu einer leichten zeitabhängigen Kraftabnahme. Da unter Kontrollbedingungen (Zugabe des Lösungsvermittlers, DMSO, ohne Extrakt) die Kraft ebenfalls abnahm (um $22,07 \pm 3,75 \%$), kann geschlossen werden, dass die Extrakte am Herzen nicht negativ inotrop wirken.

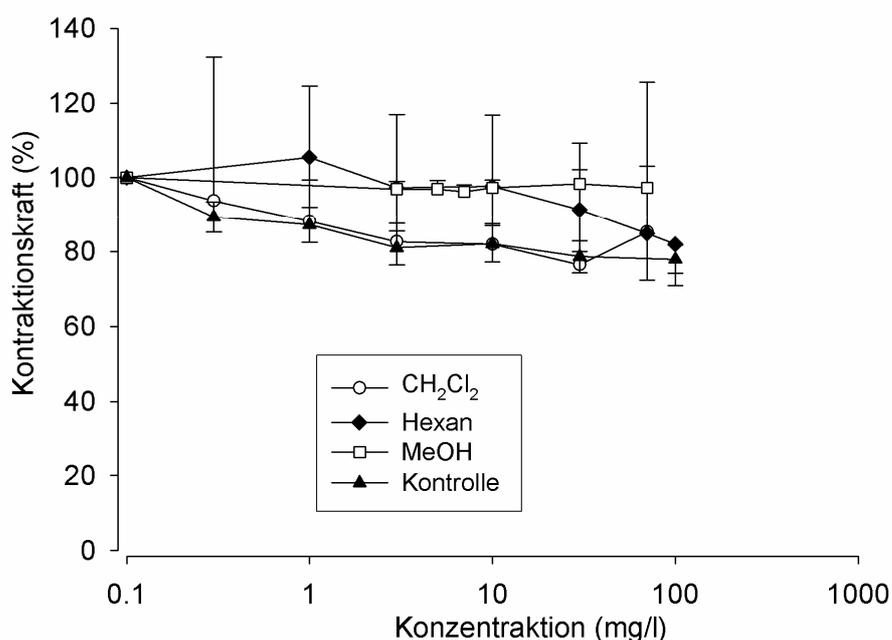


Abb. 5.54 Wirkung der Extrakte von *V. cienkowskii* auf die Kontraktionskraft von Papillarmuskeln. Bei den Kontrollversuchen wurde der Lösungsvermittler (DMSO) ohne Extrakte zugegeben (Mittelwerte \pm s.e.m von jeweils 6 Versuchen).

5.3.4 Einfluss von *V. cienkowskii*-Extrakten auf die Kontraktion der Meerschweinchen- Trachea

Abb. 5.55 zeigt die Wirkung des MeOH-Extraktes von *V. cienkowskii* auf die Carbachol-vorkontrahierte Trachea. Eine Erschlaffung (um $48,6 \pm 3,6$ % bei einer Konzentration von 70 mg/l) wurde festgestellt.

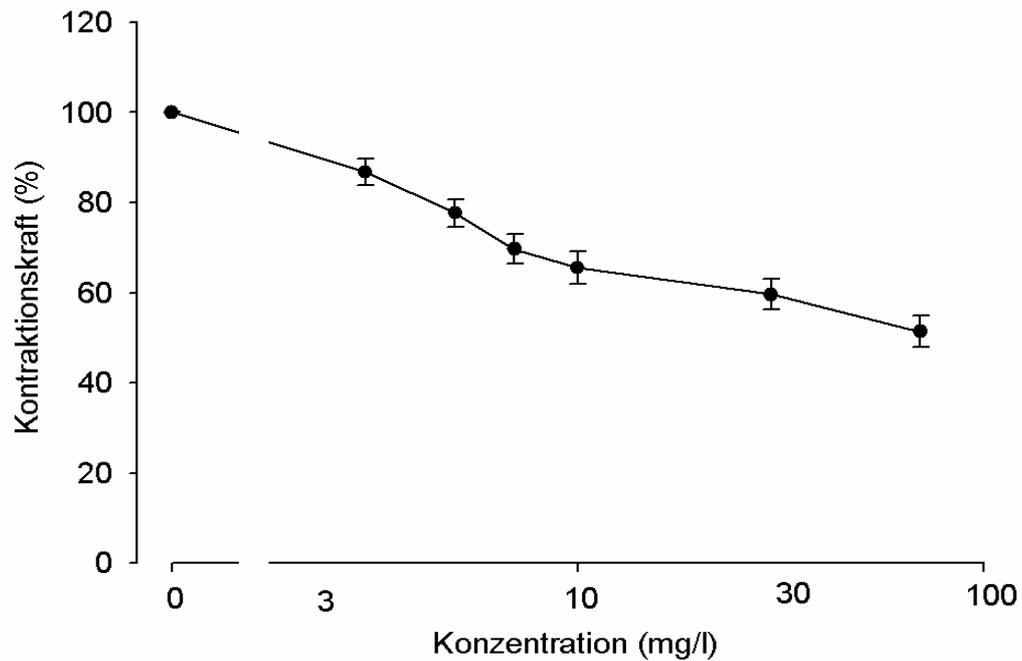


Abb. 5.55 Wirkung des MeOH-Extraktes von *V. cienkowskii* auf die vorkontrahierte glatte Muskulatur der Meerschweinchen-Trachea. Vorkontraktion mit Carbachol ($1 \mu\text{mol/l}$) = 100 %. Mittelwerte \pm s.e.m von 7 Versuchen.

6. Diskussion

In der traditionellen kamerunischen Medizin werden *Vitex cienkowskii* und *Daniella oliveri* für die Behandlung verschiedener Krankheiten eingesetzt, u.a. für die Therapie von epileptischen Anfällen und von Herzrhythmusstörungen. Eine einfache Erklärung dafür, dass *Vitex cienkowskii* und *Daniella oliveri* diese beiden Erkrankungen beeinflussen, wäre, dass Wirkstoffe beider Pflanzen die Schwelle für die Erregung von Nerven- bzw. Herzmuskelzellen anheben würden. So ist z.B. bekannt, dass das 2-wertige Kation Magnesium einen erregungshemmenden Effekt besitzt, der sich sowohl am Herzen (Ghani & Rabah, 1977; Hall & Fry, 1992) als auch am Nervensystem (Shils, 1969; Fehlinger, 1991; Fricker et al., 1999) auswirkt. Deshalb wurde in grundlegenden Experimenten zunächst der Einfluss von Magnesium auf die Erregungsschwelle, d.h. die Schwelle für die Auslösung des Natrium-Stroms am Herzen genauer untersucht und mit der Wirkung anderer physiologischer Kationen verglichen. Überraschenderweise wurde gefunden, dass auch eine leichte Erhöhung der Kalium-Konzentration eine Anhebung dieser Schwelle bewirkt.

Um die Wirkung der Extrakte von *Vitex cienkowskii* und *Daniella oliveri* aufzuklären, wurde, nach einer orientierenden Bestimmung möglicher Inhaltsstoffe, zunächst ihr Einfluss auf elektrophysiologische Eigenschaften des Herzens untersucht. Dabei wurden zwar keine Hinweise auf eine Erhöhung der Erregungsschwelle, aber ein unerwarteter Effekt eines *Daniella oliveri*-Extraktes auf die Aktionspotential-Dauer beobachtet, durch den eine antiarrhythmische Wirkung erklärt werden könnte. In weiteren Untersuchungen zeigte sich ein vasodilatierender Effekt von Extrakten beider Pflanzen, durch den andere, schon bekannte Indikationsgebiete begründet, aber möglicherweise auch neue Indikationen erschlossen werden können.

6.1 Einfluss von Magnesium, Kalium und Sotalol auf die Schwelle für die Auslösung des Natriumsstroms

Aus den vorliegenden Ergebnissen ist ersichtlich, dass sowohl Magnesium als auch Kalium die Schwelle für den Natrium-Strom anheben. Im Mittel ergab sich eine Anhebung der Schwelle des I_{Na} um 1 mV bei Erhöhung der extrazellulären Magnesium-Konzentration um 1 mmol/l. Dieses Ergebnis hatte Ähnlichkeit mit dem von Hall & Fry (1992). Diese Autoren zeigten, dass eine Erhöhung der $[Mg^{2+}]_o$ von 1 auf 10 mmol/l zu einer Anhebung der Depolarisations-Schwelle für die Auslösung von Aktionspotentialen an Herzmuskelzellen von -62 auf -54 mV führt, was einer Anhebung von ca. 0,8 mV durch eine Erhöhung von 1 mmol/l Magnesium entspricht. Bei Erhöhung der $[Mg^{2+}]_o$ werden demnach Aktionspotentiale erst bei weniger negativen Potentialen ausgelöst.

Bereits früher (Weidmann, 1955a) wurde beobachtet, dass bei Erhöhung der $[Ca^{2+}]_o$ die Zelle stärker depolarisiert werden muss, damit es zur Auslösung eines Aktionspotentials kommt. Die von uns gezeigte Zunahme der Schwelle für die Auslösung des I_{Na} bei erhöhtem $[Mg]_o$ spiegelt die verminderte Erregbarkeit der Zelle wieder. Die Wirkung von Magnesium kann man durch eine Änderung des Oberflächenpotentials erklären (siehe Abb. 6.1). Nach dieser Theorie besteht eine Potentialdifferenz zwischen Intra- und Extrazellulärflüssigkeit (innen negativ und außen positiv) die hauptsächlich durch den Konzentrationsgradienten von Kalium bestimmt wird (Kalium-Diffusionspotential). Zusätzlich spielen aber negative Ladungen an den Phospholipiden der Zellmembran eine Rolle, die vorwiegend an der äußeren Oberfläche der Zelle lokalisiert sind. Das sogenannte „Oberflächenpotential“ ist dem Diffusionspotential entgegengerichtet. Das bedeutet, dass die Spannungssensoren der spannungsabhängigen Kanäle einer geringeren Potential-Differenz, d.h. einem geringeren „effektiven“ Potential ausgesetzt sind. Die Zugabe positiver Ladungen (z.B. durch Zugabe von Mg^{2+} oder Ca^{2+}) in das extrazelluläre Milieu führt zu einer Neutralisierung der

negativen Ladungen auf der Membranoberfläche. Dadurch wird das „effektive“ Potential angehoben. Das Membranpotential muss dann stärker vermindert werden, um einen bestimmten Effekt an den spannungsabhängigen Kanälen der Membran zu erreichen bzw. um ein Aktionspotential der Zelle auszulösen (Frankenhäuser & Hodgkin, 1957; Hille, 1968; 2000; Gilbert & Ehrenstein, 1969; Muller & Finkelstein, 1972; McLaughlin et al., 1972; Vierling et al., 1987; McLaughlin, 1989; Dichtl & Vierling, 1991; Vierling, 1997; Fricker et al., 1999). Es kommt zu einer Anhebung der Schwelle des I_{Na} .

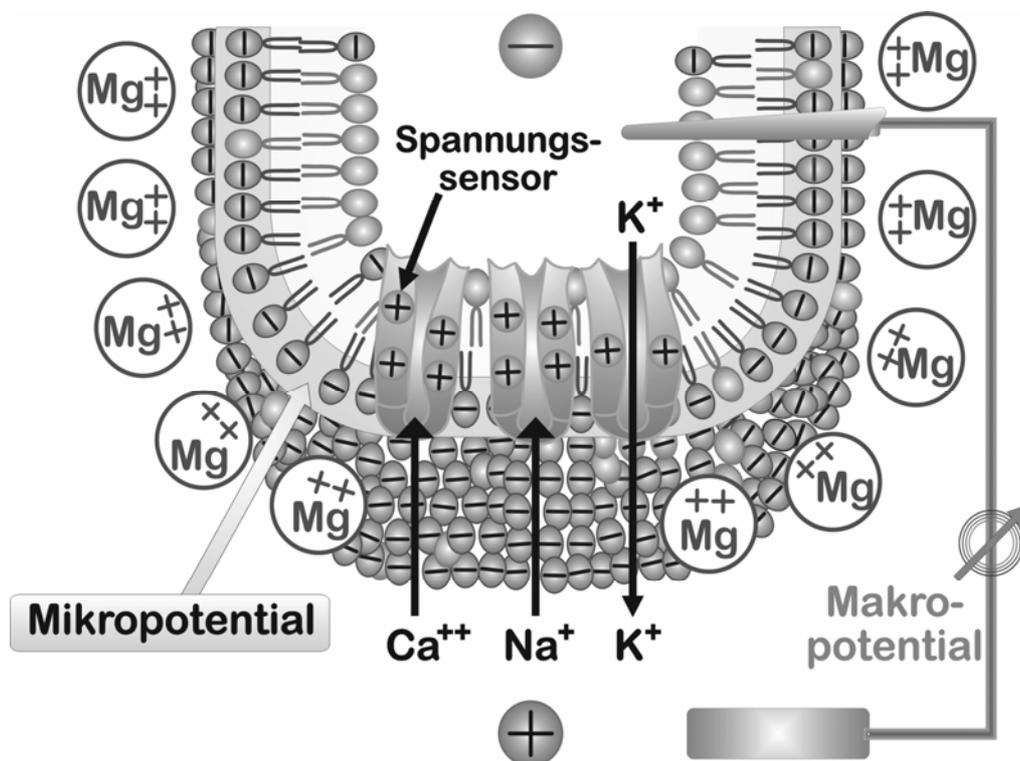


Abb. 6.1 Effekt von Kalium und Magnesium auf das Membran-Diffusionspotential und auf das Oberflächenpotential der Herzzellen.

Das Membranpotential (Makropotential) kann mit Mikroelektroden gemessen werden und wird hauptsächlich durch die Kalium-Diffusion vom intrazellulären ins extrazelluläre Milieu bestimmt. Das Membranoberflächenpotential (Mikropotential) auf der äußeren Seite der Membran ist durch negativ geladene Phospholipide bestimmt (nach Vierling, 1997).

Durch eine Erhöhung der $[K^+]_o$ sinkt der Kalium-Konzentrationsgradient ab und das Diffusionspotential der Zelle wird erniedrigt (siehe Vierling et al., 1987). Das Membranpotential während der Ruhe wurde aber in unseren Versuchen konstant auf -80 mV eingestellt. Überraschenderweise wurde trotzdem durch eine Erhöhung der $[K^+]_o$ die Schwelle für den Natrium-Strom ähnlich wie bei Magnesium angehoben. Eine Erhöhung der $[K^+]_o$ um 1 mmol/l führte sogar zu einer stärkeren Anhebung der Schwelle für die Auslösung des Natrium-Stroms, nämlich um ca. $1,8$ mV.

Die Wirkung von Kalium kann wahrscheinlich nicht mit der Oberflächenpotential-Theorie erklärt werden, da nach dieser Theorie die Wirkung zweiwertiger Kationen erheblich stärker ist als die einwertiger Kationen. Unsere Ergebnisse zeigen aber, dass die Wirkung von Kalium auf die Schwelle für die Auslösung des Natrium-Einwärtsstroms fast zweimal stärker als die von Magnesium ist.

Eine mögliche Erklärung für den Effekt von Kalium wäre, dass wie von Weidmann (1955a), Dominguez & Fozzard (1970), Baumgarten et al. (1984), Miyata et al. (2002) beschrieben, durch Erhöhung der extrazellulären Kalium-Ionen-Konzentration die Leitfähigkeit von Kalium-Kanälen zunimmt und deshalb ein stärkerer Einwärtsstrom bzw. eine stärkere Depolarisation nötig ist, um diesen „Kurzschluss“-Strom zu überwinden. Dies würde aber bedeuten, dass die Zunahme eines Auswärtsstroms oder die Abnahme eines Einwärtsstroms während Ruhe nachweisbar sein müsste. Im Gegensatz dazu zeigte sich aber bei Kalium-Konzentrationserhöhungen während der Ruhephase eine leichte Zunahme eines Einwärtsstroms.

Alternativ könnte bei Kalium-Konzentrations-Erhöhung die resultierende Depolarisation bereits zur Aktivierung und anschließenden Inaktivierung einiger Natrium-Kanäle führen („Silent inactivation“) Weidmann (1955b). Da die Depolarisation durch einen erhöhten Haltestrom aufgehoben wird, sollte dieser Effekt kaum zum Fragen kommen. Möglich ist aber, dass bei der speziellen

Geometrie der Herzzelle Randbezirke nicht vollständig auf dem hohen Potential-Niveau gehalten werden können, so dass hier eine stärkere „silent inactivation“ der Natrium-Kanäle zu erwarten ist. Unter Bedingungen, bei denen das Potential nicht geklemmt ist, sondern sich frei einstellt, kann jedenfalls mit einem solchen Effekt gerechnet werden (Miyata et al. 2002).

Das Klasse-III-Antiarrhythmikum Sotalol zeigte erwartungsgemäß nur geringe Effekte auf die Schwelle des Natriumsstroms. Im Mittel wurde die Schwelle durch 10 $\mu\text{mol/l}$ Sotalol um weniger als 1 mV angehoben. Dies spricht dafür, dass die Blockade der Kalium-Kanäle nicht mit einer Schwellenänderung verknüpft ist. Aus diesem Grunde könnte es sinnvoll sein, bei der Behandlung von Arrhythmien zusätzlich zu Sotalol die Magnesium- und Kalium-Konzentrationen etwas anzuheben. Die Verlängerung der Refraktärzeit durch Sotalol und die Anhebung der Schwelle durch Magnesium und Kalium könnten sich dann sinnvoll ergänzen.

Das Ergebnis von Kontrollversuchen mit einer Erhöhung der extrazellulären Natrium-Konzentration von 140 auf 143 mmol/l widerspricht der Hypothese, dass alle positiven Ionen die Schwelle für die Auslösung des Natrium-Stroms anheben. Diese Schwelle wurde durch Erhöhung der $[\text{Na}^+]_o$ -Konzentration nicht beeinflusst.

Für weitere Kontrollversuche wurde Veratridin verwendet. Veratridin ist, ähnlich wie Aconitin, ein „Natrium-Kanal-Öffner“ (Ulbricht, 1972; Honerjäger, 1980; 1982; Honerjäger & Reiter, 1975; 1977) und hat dementsprechend arrhythmogene Wirkung. Es kann vermutet werden, dass Veratridin eine Senkung der Schwelle für die Natrium-Kanäle bewirkt, weil die Öffnung der Kanäle erleichtert wird. Interessanterweise konnte aber kein Effekt auf die Schwelle nachgewiesen werden, obwohl der Natrium-Strom stark verändert wurde. Nach einer schnellen, teilweisen Inaktivierung folgte eine sehr langsame zweite Phase der Inaktivierung, so dass während der gesamten Dauer der Depolarisation noch ein relativ starker Natrium-Strom vorhanden war. Dies

beweist, dass die Änderung der Schwelle durch besondere Effekte der Magnesium- bzw. Kalium-Ionen zustande kommt.

Um Hinweise zu erhalten, ob Extrakte von *V. cienkowskii* und *D. oliveri*, ähnlich wie Magnesium- oder Kalium-Erhöhungen durch Anhebung der Schwelle für die Auslösung des Natrium-Stroms einen hemmenden Einfluss auf die Erregbarkeit von Zellen besitzen, oder aber Wirkungen auf andere Ionenkanäle ausüben, wurden elektrophysiologische und mechanische Versuche am Herzen bzw. an der glatten Gefäßmuskulatur durchgeführt.

6.2 *Vitex cienkowskii*

Die Aktionspotentialdauer (APD) am Meerschweinchenherzen wurde durch die Extrakte von *V. cienkowskii* nicht verlängert, d.h. Kalium- und Calcium-Kanäle, die verantwortlich für die APD sind (Koller et al., 1998, Hille, 2001, Gilmour, 2003, Sensch et al., 2000), werden wahrscheinlich nicht beeinflusst. Weiter blieben die Amplitude sowie die maximale Depolarisations-Geschwindigkeit unverändert. Davon ausgehend schließen wir, dass die Natrium-Kanäle wie die anderen Kanäle von der Wirkung der Extrakte nicht betroffen sind.

Außerdem wurde kein Hinweis auf eine Änderung der Schwelle für die Auslösung des Aktionspotentials am Papillarmuskel durch die Extrakte von *V. cienkowskii* festgestellt.

An Noradrenalin-vorkontrahierten Aortenringen wurden stärkere Relaxationen durch die MeOH-Extrakte (um 85 %, $EC_{50} = 12$ mg/l) und die EtOAc-Extrakte (um 41 %, $EC_{50} = 43$ mg/l) von *V. cienkowskii* ausgelöst, sowie schwächere Relaxationen an KCl-vorkontrahierten Aortenringen (um 37 %, EC_{50} etwa 27 mg/l und um 17 %, EC_{50} etwa 32 mg/l). Diese Ergebnisse zeigen eine gewisse Übereinstimmung mit denen von Ajay et al. (2003), bei denen die Relaxation an Aortenringen durch Flavonoide viel stärker bei durch

Phenylephrin ausgelösten Kontraktionen war als bei Kontraktionen, die durch Erhöhung der Kalium-Konzentration induziert wurden.

Die glatte Muskulatur der Trachea wurde ebenfalls durch den MeOH-Extrakt von *V. cienkowskii* erschlafft (um 49 %).

Die relaxierende Wirkung der Extrakte an NA-vorkontrahierten Aortenringen könnte durch eine Abnahme der intrazellulären Calcium-Ionenkonzentration erklärt werden. Dafür gibt es zwei wichtige Möglichkeiten: Entweder wird der Ca^{2+} -Einstrom in die Zellen durch L-Typ Calcium-Kanäle blockiert oder die Erhöhung der intrazellulären Calcium-Konzentration durch den G-Proteinweg gehemmt (siehe Abb. 6.2). Aufgrund der Versuche mit Kalium-Vorkontraktionen an Aortenringen, bei denen es nur zu einer leichten Erschlaffung durch die Extrakte kam, konnte man eine hemmende Wirkung dieser Extrakte auf L-Typ Calcium-Kanäle weitgehend ausschließen, da bei K^{+} -Kontraktionen, die zur Depolarisation der Zellmembran führen, Calcium-Ionen hauptsächlich über diese Kanäle in die Zelle fließen.

Der Befund, dass diese Extrakte nicht an L-Typ-Calcium-Kanälen wirken, wurde durch die Ergebnisse von Kontraktionsversuchen an Papillarmuskeln bestätigt. Die Kontraktion des Papillarmuskels wird durch den Ca^{2+} -Einstrom durch L-Typ-Calcium-Kanäle bestimmt. Die Tatsache, dass die Extrakte keine oder nur eine geringe Wirkung auf die Kontraktionskraft des Herzmuskels besaßen, spricht stark gegen eine Beeinflussung dieser Kanäle. Der relaxierende Effekt der Extrakte von *V. cienkowskii* auf die Gefäßmuskulatur kann deshalb am wahrscheinlichsten durch eine Hemmung von Vorgängen des G-Proteinwegs erklärt werden.

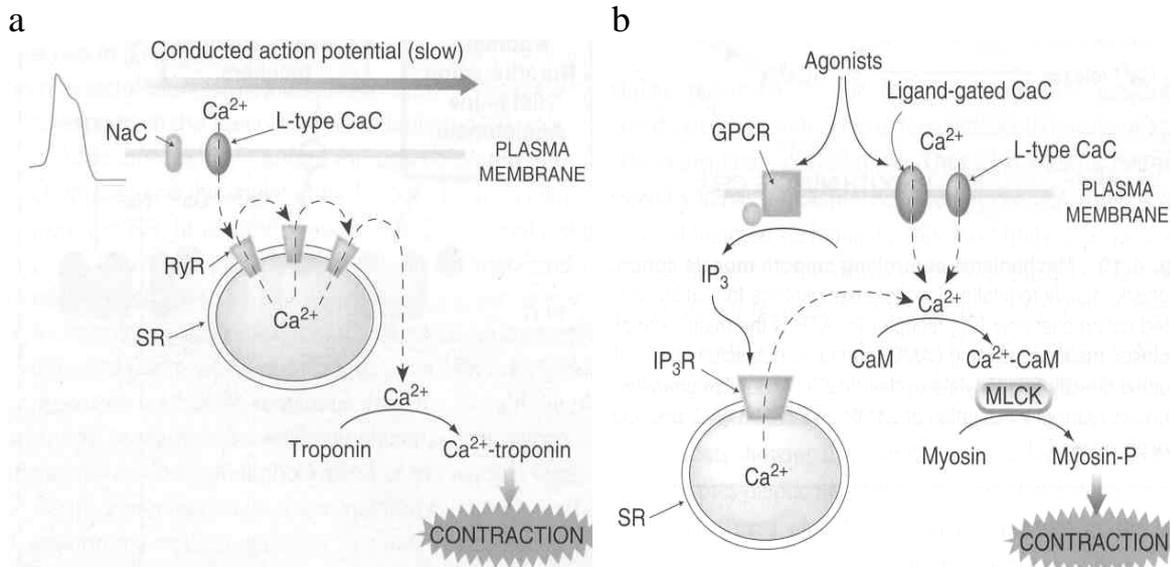


Abb. 6.2 Unterschiedliche Wege der Kontraktionsauslösung an Herzmuskeln und an der glatten Muskulatur :

(a) Ca^{2+} tritt in kardialen Myozyten während einer Depolarisation (Aktionspotential) durch spannungsabhängige L-Typ-Calcium-Kanäle ein und initiiert die Freisetzung von weiterem Calcium aus dem Sarkoplasmatischen Reticulum. Dadurch wird die intrazelluläre Calcium-Konzentration erhöht und der Muskel kontrahiert.

(b) Beim glatten Muskel kann die Kontraktionsauslösung entweder durch Aktivierung von G-Protein-gekoppelten-Rezeptoren (GPCR) oder durch Aktivierung von membranständigen Calcium-Kanälen erfolgen. Bei der G-Protein vermittelten Kontraktion wird Ca^{2+} intrazellular durch Aktivierung von IP₃-abhängigen Calcium-Kanälen aus dem SR freigesetzt. Die Aktivierung der membranständigen Calcium-Kanäle erfolgt entweder durch Depolarisation (z.B. experimentell durch Erhöhung der extrazellulären Kalium-Konzentration) oder durch Bindung eines Liganden. SR: Sarkoplasmatischen Reticulum, CaC: Spannungsabhängige Calcium-Kanäle, NaC: Spannungsabhängige Natrium-Kanäle, IP₃: Inositoltriphosphat, RyR: Ryanodin-Rezeptor, IP₃R: Inositoltriphosphat-Rezeptor, CaM: Calmodulin, MLCK: Myosin-Leichtenketten-Kinase (nach Rang et al., 2003).

Welche der gefundenen Inhaltsstoffe der *V. cienkowskii*-Extrakten (Tannine und Terpenoide) für die relaxierende Wirkung an der Gefäßmuskulatur verantwortlich sind, kann zum jetzige Zeitpunkt der Untersuchung noch nicht festgestellt werden. Dazu ist eine Wirkungs-orientierte weitere Fraktionierung der Extrakte und eine Strukturaufklärung der wirksamen Bestandteile notwendig.

6.3 *Daniella oliveri*

Die Untersuchung des Einflusses der Extrakte von *D. oliveri* auf Aktionspotentialparameter von Papillarmuskeln zeigte, dass die Extrakte bei 1 Hz Stimulationsfrequenz das AP nicht beeinflussen. Bei einer Frequenz von 0,2 Hz wurde dagegen die Aktionspotentialdauer durch den MeOH-Extrakt (10 mg/l) stark verlängert, jedoch blieben die Amplitude und die maximale Depolarisationsgeschwindigkeit (dv/dt) unverändert. Dieser Effekt ähnelt dem des Kalium-Kanal-Blockers Sotalol (Carmeliet, 1985; Sanguinetti & Jurkiewicz, 1990 und Malécot & Argibay, 1999), der ebenfalls bei 1 Hz keine und bei 0,2 Hz eine starke AP-verlängernde Wirkung aufwies. Dieses Phänomen ist auch mit anderen Kalium-Kanal-blockierenden Substanzen beobachtet worden und wird als „umgekehrte Aktionsabhängigkeit“ („reverse use dependence“) bezeichnet. Damit unterscheiden sich Kalium-Kanal-Blocker in der Frequenzabhängigkeit von den Natrium-Kanal-Blockern, deren Wirkung mit steigender Frequenz zunimmt („use dependence“). Sowohl die unter dem Einfluss der Extrakte als auch die von Sotalol verlängerte APD wurde durch eine Erhöhung der extrazellulären Kalium-Konzentration wieder leicht verkürzt. Die Verlängerung der APD durch den MeOH-Extrakt von *D. oliveri* kann am ehesten durch eine Blockierung von Kalium-Kanälen erklärt werden, da Natrium-Kanal-Öffner, die auch zu APD-Verlängerung führen (Honerjäger, 1980; 1982; Honerjäger & Reiter, 1975; 1977), wahrscheinlich nicht in Frage

kommen. Der charakteristische positiv inotrope Effekt dieser Substanzen am Herzmuskel wurde in unseren Experimenten nicht beobachtet. Ausgehend von diesen Ergebnissen, kann man postulieren, dass der MeOH-Extrakt von *D. oliveri* Kalium-Kanal-blockierende Effekte besitzt und an L-Typ Calcium- sowie an Natrium-Kanälen wahrscheinlich keine Wirkung zeigt. Eine Anhebung der Schwelle für die Auslösung des Aktionspotentials am Papillarmuskel wurde unter dem Einfluss der Extrakte nicht beobachtet.

Nachdem in ersten chemischen Analysen gezeigt wurde, dass die Extrakte von *D. oliveri* neben Tanninen und Terpenoiden auch Flavonoide enthalten, wurde untersucht, inwieweit Verbindungen aus dieser Substanzgruppe für eine antiarrhythmische bzw. antiepileptische Wirkung verantwortlich sein könnten. Deshalb wurden die Wirkungen von Referenz-Flavonoiden aus vier Gruppen, (Flavone: Orientin und Vitexin; Flavonole: Quercetin und Rutin; Flavonone: Naringin; Anthocyanidine: Cyanidin), auf die Schwelle für die Auslösung des Natriumsstroms mit Hilfe der Patch-Clamp-Technik geprüft. In orientierenden Versuchen wurde gezeigt, dass diese Flavonoide keine Änderung der Schwelle des Natriumsstroms bewirken. Weitere Versuche mit den Pflanzen-Extrakten sind notwendig, um deren Mechanismen zu verstehen. Dafür sollten die Wirkstoffe aus den Extrakten isoliert und identifiziert werden.

Der Wirkmechanismus von *D. oliveri* wurde ebenfalls mit Hilfe von Kontraktionsversuche an isolierten Organen untersucht. Sowohl die durch Noradrenalin als auch die durch Kalium vorkontrahierten Aortenringe wurden bereits durch sehr kleine Konzentrationen der CH₂Cl₂-MeOH- (EC₅₀ von 4,88 bzw. 9,44 mg/l) und der MeOH- (EC₅₀ von 0,77 bzw. 0,85 mg/l) Extrakte relaxiert. Der Erreichte-Maximal-Effekt (EME) des CH₂Cl₂-MeOH-Extraktes war bei beiden Versuchsbedingungen (NA- und Kalium-Vorkontraktion) fast gleich stark (Relaxation um 71 % und um 77 %). Der CH₂Cl₂-MeOH-Extrakt löste aber nur eine geringe Kraftminderung an Papillarmuskeln (um 23 %) aus. Dieser Extrakt könnte deshalb Substanzen enthalten, die den G-

Protein-Weg hemmen. Möglichweise sind aber zusätzliche Substanzen mit schwacher Calcium-Kanal-blockierender Wirkung vorhanden. Der CH₂Cl₂-MeOH-Extrakt zeigte keinen Einfluss auf die Aktionspotentialparameter des Meerscheinchensherzens. Das heißt, dass dieser Extrakt keinen hemmenden Effekt auf Kalium-Kanäle sowie auf Natrium-Kanäle ausübt.

Die Wirkung des MeOH-Extraktes von *D. oliveri* war stärker an NAVK-contrahierten Aortenringen (EME = 61 %, EC₅₀ = 0,77 mg/l) als an Kalium-contrahierten Aortenringen (EME = 44 %, EC₅₀ = 0,85 mg/l). Im Vergleich zu *Crataegus*, einer bekannten herzwirksamen Heilpflanze, dessen Extrakt ebenfalls eine vasodilatierende Wirkung mit einer EC₅₀ von 4-20 mg/l aufweist (Vierling et al., 2000; 2003), sind die Extrakte von *D. oliveri* deutlich stärker wirksam. Weiter zeigte der Versuch mit Papillarmuskeln, dass die Zugabe von 10 mg/l MeOH-Extrakt nur zu einer geringen Minderung der Kontraktionskraft (um 15 %) dieser Muskeln führte. Ein hemmender Effekt dieses Extraktes auf L-Typ-Calcium-Kanäle kann deshalb weitgehend ausgeschlossen werden. Auch eine Wirkung auf das Endothel, wodurch ebenfalls eine Erschlaffung der Gefäßmuskulatur erzeugt werden kann, ist unwahrscheinlich, da Müller (1997) gezeigt hat, dass das Endothel keine wichtige Rolle bei Erschlaffung von Aortenringen des Meerschweinchens spielt. Die starke Wirkung des MeOH-Extraktes wie die des CH₂Cl₂-MeOH-Extraktes kann sehr wahrscheinlich durch eine Hemmung im Bereich des G-Protein-Signalwegs erklärt werden (siehe Abb. 6.2). Sowohl die relaxierende als auch die APD-verlängernde Wirkung wurden auch mit anderen methanolischen Extrakten erzielt, die mit einem abweichenden Extraktionsverfahren (im Labor von Prof. Wagner) aus der pulverisierten Rinde hergestellt wurden.

Die leichte Erschlaffung der glatten Muskulatur der Trachea (um 37 %) durch 10 mg/l MeOH-Extrakt von *D. oliveri* zeigte, dass die relaxierende Wirkung dieses Extraktes an verschiedenen glattmuskulären Organen vorhanden aber unterschiedlich stark ausgeprägt ist.

Da Flavonoide in den Extrakten von *D. oliveri* vermutet wurden, könnten diese für die relaxierende Wirkung am glatten Muskel verantwortlich sein. Chan et al. (2000), Raj Narayana et al. (2001), Zebene & Pechanova (2002) und Ajay et al. (2003) zeigten, dass Flavonoide zur Relaxation von Aorten-Präparaten führen können. Ähnlich wie in der vorliegenden Untersuchung, in der eine starke relaxierende Wirkung der Referenzsubstanz Quercetin gefunden wurde (um 74 %, $EC_{50} = 8 \text{ mg/l}$), wurde von Chan et al. (2000) und Ajay et al. (2003) eine vollständige Relaxation der Aorta bei Applikation dieser Substanz beobachtet. Rutin, das wie Quercetin ein Flavonol ist, löste in den von uns durchgeführten Versuchen keine Änderung der Kontraktionskraft der Aortenringe aus. Allerdings wurden in den Versuchen von Ajay et al. (2003) die Aortenringe auch durch das Flavon Chrysin stark relaxiert, was wir mit Orientin und Vitexin, die ebenfalls zur Gruppe der Flavone gehören, nicht zeigen konnten. Das Anthocyanidin Cyanidin führte ebenfalls zu einer Relaxation der Aortenringe. Procyanidin, dem von mehreren Autoren (Müller, 1997; Aldini et al., 2003) vasodilatierende Eigenschaften zugeschrieben wurden, blieb hier unwirksam. Es scheint, dass die Wirkung der Flavonoide auf den glatten Muskel von der Verteilung der Hydroxyl-Gruppen abhängig ist. Die OH-Substitution an Position C3 des C-Rings könnte eine entscheidende Rolle in der Effektivität der Flavonoide spielen (Ferrell et al., 1979; Wang & Joseph, 1999; Chan et al., 2000).

Im Gegensatz zu Quercetin und Cyanidin, die zur dieser Klasse (OH an Position C3 des C-Rings) gehören und die in der vorliegenden Arbeit wie bei anderen Autoren (Ferrell et al., 1979; Wang & Joseph, 1999; Chan et al. 2000; Fusi et al., 2003) relaxierende Effekte zeigten, lösten Vitexin, Orientin und Naringin ohne OH an Position C3 und Rutin mit einem Zucker (Rutinosid) an C3 keine Relaxation der Aortenringe aus. Die beiden Extrakte (MeOH- und CH_2Cl_2 -MeOH) von *D. oliveri*, die zur Relaxation führten, enthielten möglicherweise Catechin, die ebenfalls eine OH-Gruppe an C3 besitzen. Catechin könnte

deshalb, wie schon von Sanae et al. (2002) vermutet, der für die Relaxation verantwortliche Wirkstoffe sein.

Für eine endgültige Klärung, ob und welche Flavonoide für die vasorelaxierenden Wirkungen der Extrakte verantwortlich sind, müssen weitere chemische Analysen in Kombination mit pharmakologischen Versuchen durchgeführt werden.

Zusätzliche Versuche mit bekannten Kalium-Kanal-Blockern (Amiodaron, Sotalol, Clofilium) zeigten im Gegensatz zu *D. oliveri* keine relaxierende Wirkung auf die Gefäße. Clofilium löste erst in hohen Konzentrationen (EC_{50} etwa 43 $\mu\text{mol/l}$) eine Relaxation aus. Daraus kann man schließen, dass eine Kalium-Kanal-Blockade nicht zwingend mit einer vasodilatierenden Wirkung verknüpft ist. Die relaxierenden und die Aktionspotential-verlängernden Wirkungen von *D. oliveri* sind deshalb wahrscheinlich auf unterschiedliche Inhaltsstoffe zurückzuführen.

6.4 Schlussfolgerungen

In dieser Arbeit wurde festgestellt, dass eine Relaxation des glatten Muskels der Aortenringe sowohl durch sehr kleine Konzentrationen von MeOH- und EtOAc-Extrakte aus *V. cienkowskii* als auch durch MeOH- und CH_2Cl_2 -MeOH-Extrakten aus *D. oliveri* ausgelöst wurde. Diese Effekte sind vereinbar mit der Anwendung der Pflanzen durch kamerunische traditionelle Mediziner u.a. bei Dysmenorrhoe, Migräne und Kopfschmerzen, da eine Relaxation der Blutgefäße eine positive Wirkung auf diese Krankheiten haben könnte. Als mögliches neues Indikationsgebiet für diese Pflanzen könnte wegen der vasorelaxierenden Wirkung Hochdruck in Frage kommen.

Der MeOH-Extrakt von *D. oliveri* zeigte weiterhin eine drastische Aktionspotential-verlängernde Wirkung, die wahrscheinlich durch die

Blockierung von Kalium-Kanälen ausgelöst wird. Diese Wirkung passt sehr gut zu der traditionellen Anwendung von *D. oliveri* bei Herzrhythmusstörungen. Wenn man bedenkt, dass Kalium-Kanal-Blocker wie Amiodaron neben Betablockern die am häufigsten angewandten Antiarrhythmika sind, könnten die Inhaltsstoffe von *D. oliveri* bei der Behandlung von Herzrhythmusstörungen von Bedeutung sein.

Als Grundlage für weitere Untersuchungen kann man die Hypothese aufstellen, dass ein Zusammenhang zwischen der beobachteten vasodilatierenden Wirkung der Extrakte und den von den Heilern angenommenen antiarrhythmischen und antiepileptischen Wirkungen besteht. Wenn durch die Extrakte die intrazelluläre Calcium-Konzentration nicht nur im glatten Muskeln, sondern auch in Neuronen abgesenkt würde, könnte eine Verminderung der Freisetzung von Transmittersubstanzen (z.B. Noradrenalin in der Peripherie oder Glutamat im Gehirn) resultieren. Dadurch könnten sowohl antiarrhythmische als auch antiepileptische Wirkungen zustande kommen.

Zur Zeit werden weitere chemische Untersuchungen unternommen um die reinen Inhaltsstoffe der wirksamen Extrakte von *D. oliveri* und *V. cienkowskii* zu gewinnen. Mit Hilfe der Patch-Clamp-Technik und der Messung der intrazellulären Ca^{2+} -Konzentration sollte es dann möglich sein die postulierten Wirkmechanismen (Einflüsse auf Ionenkanäle und Calcium-Bewegungen der Zelle) zu überprüfen.

Zusammenfassung

1. In der vorliegenden Arbeit sollte geklärt werden, ob Pflanzenextrakte von *Daniella oliveri* und *Vitex cienkowskii* aus Kamerun, denen u.a. von traditionellen Heilern nachgesagt wird, dass sie antiarrhythmische und antiepileptische Wirkungen aufweisen, tatsächlich Effekte besitzen, die mit einer Wirksamkeit bei Herzrhythmusstörungen und Epilepsien vereinbar sind. Von den beiden ausgewählten Heilpflanzen wurden durch Verwendung verschiedener Extraktionsmittel unterschiedliche Extrakte hergestellt, die sich in erster Linie durch die Lipophilie bzw. Hydrophilie ihrer Inhaltsstoffe unterscheiden. Erste chemisch-analytische Untersuchungen erbrachten Hinweise auf das Vorkommen von Tanninen, Terpenoiden und Flavonoiden in beiden Arzneipflanzen.
2. Primär wurde von der einfachsten Arbeitshypothese ausgegangen, dass diese Extrakte eine Minderung der Erregbarkeit sowohl am Herzen als auch am Gehirn verursachen. Da bekannt ist, dass Magnesium als 2-wertiges Kation solche Wirkungen besitzt, wurden zunächst grundlegende Untersuchungen durchgeführt, durch die diese Wirkungen genauer beschrieben werden und mit der Wirkung anderer Ionen bzw. Substanzen verglichen werden sollten .
3. Es wurde mit Hilfe der Patch-Clamp-Technik erstmalig nachgewiesen, dass eine Erhöhung der extrazellulären Magnesium-Konzentration zu einer Anhebung der Schwelle für die Auslösung des Natrium-Einwärtsstroms an Herzmuskelzellen führt. Aus der Konzentrations-Wirkungs-Beziehung (im Bereich von 0,5 bis 5 mmol/l) ergab sich, dass eine Erhöhung der extrazellulären Magnesium-Konzentration um 1 mmol/l eine Anhebung der Schwelle für die Auslösung des Natrium-Stroms um etwa 1 mV bewirkte. Diese Wirkung von Magnesium kann man durch eine Änderung des Oberflächenpotentials erklären.

4. Beim Vergleich mit anderen Kationen ergab sich überraschenderweise, dass auch eine Erhöhung der extrazellulären Kalium-Konzentration zu einer Schwellenerhöhung führte, die sogar etwa doppelt so stark ausfiel wie die von Magnesium. Im Gegensatz dazu führte eine Erhöhung der extrazellulären Natrium-Konzentration nicht zu einer Erhöhung der Schwelle. Auch das bekannte Antiarrhythmikum Sotalol mit Kalium-Kanal-blockierenden Eigenschaften und der Natrium-Kanal-Öffner Veratridin führten nicht zu einer Änderung der Schwelle, was darauf hinweist, dass die Effekte von Magnesium und Kalium nicht unspezifisch sind (z.B. auf Grund einer Änderung der Osmolarität).
5. Orientierende Versuche bzgl. der Beeinflussung elektrophysiologischer Phänomene am isolierten Papillarmuskel erbrachten keine Hinweise, dass durch die Extrakte die Schwelle für die Auslösung von Aktionspotentialen verändert wird. Da in den Extrakten u.a. als Inhaltsstoffe Flavonoide gefunden wurden, erfolgte zusätzlich in orientierenden Untersuchungen eine Testung der Wirkung verschiedener Flavonoide auf die Schwelle des Natrium-Stroms. Auch hier fanden sich keine Hinweise, dass diese Schwelle verändert wird. Ausgehend von diesen Versuchen erscheint es unwahrscheinlich, dass die untersuchten Extrakte über eine Anhebung der Erregungsschwelle wirken.
6. Bei der weiteren Untersuchung des Einflusses der Extrakte auf Aktionspotential-Parameter zeigte sich kein wesentlicher Effekt bei 1 Hz. Bei einer Frequenz von 0,2 Hz wurde aber die Aktionspotentialdauer durch den MeOH-Extrakt von *D. oliveri* drastisch verlängert, jedoch blieben die Amplitude und die maximale Depolarisationsgeschwindigkeit unverändert. Andere Extrakte wie der Hexan-Extrakt und der Dichlormethan-Methanol-Extrakt von *D. oliveri* und alle getesteten Extrakte von *V. cienkowskii* zeigten keine wesentlichen Wirkungen auf das Aktionspotential. Die Verlängerung der Aktionspotentialdauer durch

den MeOH-Extrakt ist vergleichbar mit der von Sotalol. Es ist anzunehmen, dass sie durch eine Blockierung von Kalium-Kanälen zustande kommt. Weitere Untersuchungen sind notwendig, um zu klären, welche speziell im Methanol-Extrakt vorkommenden Substanzen auf Kalium-Kanäle wirken und welche Kalium-Kanäle betroffen sind. Für den Methanol-Extrakt von *D. oliveri* könnte es demnach zutreffen, dass er tatsächlich antiarrhythmische (und evtl. auch antiepileptische) Wirkungen besitzt.

7. Zusätzlich wurde getestet, ob die Extrakte auch einen Effekt auf die glatte Muskulatur der Gefäße ausüben. *Daniella oliveri*-Extrakte zeigten eine starke relaxierende Wirkung. Sowohl die durch Noradrenalin als auch die durch Kalium vorkontrahierten Aortenringe wurden durch sehr kleine Konzentrationen des MeOH- (EC_{50} von 0,77 mg/l bzw. 0,85 mg/l) und des CH_2Cl_2 -MeOH- (4,9 mg/l bzw. 9,4 mg/l) Extraktes relaxiert. Auch bestimmte Extrakte von *V. cienkowskii* zeigten eine erschlaffende Wirkung auf die Gefäßmuskulatur, die aber schwächer war als die von den *D. oliveri*-Extrakten. An Noradrenalin-vorkontrahierten Aortenringen wurden bei den MeOH- ($EC_{50} = 11,8$ mg/l) und EtOAc- ($EC_{50} = 40,7$ mg/l) Extrakten relaxierende Wirkungen festgestellt. Beide Extrakte lösten nur eine geringe Relaxation an KCl-vorkontrahierten Aortenringen aus.

Diese Vasorelaxation ist wahrscheinlich nicht auf eine Kalium-Kanal-Blockade zurückzuführen, da verschiedene Kalium-Kanal-Blocker (Sotalol, Clofilium und Amiodaron) im üblichen Konzentrationsbereich keine relaxierende Wirkung zeigten. Auch eine Blockade von Calcium-Kanälen als Ursache für die vasorelaxierende Wirkung ist unwahrscheinlich, da die Extrakte nicht wie die klassischen Calcium-Kanalblocker am Herzmuskel negativ inotrop wirken. Am ehesten kann die relaxierende Wirkung der Extrakte durch eine Hemmung des G-

Proteinwegs und eines dadurch verminderten G-Protein-Receptor-induzierten Calcium-Anstiegs erklärt werden. Als mögliche wirksame Inhaltsstoffe kommen vor allem bestimmte Flavonoide in Frage. Es wurde eine Reihe verschiedener Flavonoide eingesetzt wobei sich Hinweise auf eine Struktur-Wirkungs-Beziehung bzgl. der vasorelaxierenden Wirkung ergaben. So zeigte z.B. Quercetin eine relativ starke relaxierende Wirkung während z.B. das strukturverwandte Rutin keine erschlaffende Wirkung aufwies.

8. Die Ergebnisse zeigen, dass Extrakte von *D. oliveri* und *V. cienkowskii* , die von traditionellen Heilern in Kamerun u.a. für die Therapie von kardialen Arrhythmien und von epileptischen Anfällen eingesetzt werden, durchaus nachweisbare kardiovaskuläre Wirkungen aufweisen. Speziell der Methanol-Extrakt von *Daniella oliveri* hat einen Einfluss auf das Aktionspotential, der wahrscheinlich auf eine Kalium-Kanal-blockierende Wirkung zurückzuführen ist und der mit der Wirkung klassischer Antiarrhythmika vergleichbar ist. Weitere Untersuchungen sind notwendig, um die Strukturen der wirksamen Inhaltsstoffe und den genauen Wirkungsmechanismus aufzuklären. Auf Grund der vasorelaxierenden Wirkungen ergeben sich möglicherweise neue Indikationsgebiete wie z.B. die Hypertonie. Als weiteres Ergebnis der vorliegenden Untersuchung konnten Wirkungen von Magnesium und Kalium auf die Schwelle des Natrium-Stroms gezeigt werden, die möglicherweise erklären, dass beide Ionen antiarrhythmische Effekte aufweisen und sich dabei sinnvoll ergänzen.

Abstract

Theme: Influence of plant extracts (*Vitex cienkowskii* and *Daniella oliveri*) and physiological ions on vascular smooth muscles and electrophysiological properties of the heart muscle.

1. The aim of the present work was to verify whether the plant extract of *Daniella oliveri* and *Vitex cienkowskii* from Cameroon, which are considered by traditional healers to possess antiarrhythmic and antiepileptic effects, really have effects which are compatible with their therapeutic use in heart rhythm dysfunctions and epilepsies. Different extracts were obtained from the two plants using different solvents for the extraction and taking into consideration the lipophilic and hydrophilic properties of the compounds present in different extracts. Preliminary phytochemical analysis revealed the presence of tannins, terpenoids and flavonoids in the two plants.
2. Experiments were started based on the working hypothesis that the extracts could reduce the excitability of the cells in the heart as well as in the brain. Considering the fact that magnesium, a divalent cation, has the ability to reduce the excitability of the cells, preliminary experiments were done to describe this effect more differentiated and to compare it with that of other ions and substances.
3. For the first time, it was possible using the patch-clamp technique to show that an increase in the extracellular magnesium concentration ($[Mg^{2+}]_o$) leads to an increase in the threshold of induction of the inward sodium current (I_{Na}) in cardiac myocytes. The resulting concentration-effect-curve (from 0.5 to 5 mmol/l) indicates that an increase in $[Mg^{2+}]_o$ by 1 mmol/l induces an increase in the threshold of sodium current by about 1 mV. This effect can be explained by a change of the membrane surface potential.

4. Comparing this effect with that of other cations, we were surprised to find that also an increase in the extracellular potassium concentration ($[K^+]_o$) led to an increase in the threshold of the sodium current and that this effect was almost twice that observed for magnesium. Contrary to these two ions, an increase in the extracellular concentration of sodium did not modify the threshold of induction of sodium current. Also the well-known antiarrhythmic drug sotalol which possesses potassium-channel blocking properties and the sodium channel “opener” veratridine did not change the threshold, showing that the effects of magnesium and potassium are not unspecific (for example by changing of the osmolarity).
5. Experiments on the possible influence of the extracts on electrophysiological phenomena of isolated papillary muscles did not indicate a modulating influence on the threshold for the elicitation of the action potential. Because of the presence of flavonoids in the extracts, our experiments were also oriented towards investigating the effects of different flavonoids on the threshold of induction of I_{Na} . No evidence for the modulation of the threshold was seen. From the results of these trials, it was suggested that the effects of the plant extracts might not be due to an increase in the threshold of excitation.
6. At 1 Hz, the extracts showed no effect on the action potential parameters. In contrast, at a frequency of 0.2 Hz, the MeOH-extract of *D. oliveri* drastically prolonged the duration of action potential (APD), but the amplitude as well as the maximal depolarisation velocity (dv/dt) were not modified. The hexane and the dichloromethan-methanol extracts of *D. oliveri* and all the other tested extracts from *V. cienkowskii* did not show any modification of the action potential. The prolongation of the APD observed with the MeOH-extract of *D. oliveri* was comparable with that of sotalol. The effect could be linked to a

blockade of potassium channels. Further experiments are necessary to explain which specific substances in the MeOH extract could be affecting potassium channels and which kind of potassium channels are involved. From our results, it can be concluded that the MeOH extract from *D. oliveri* may possess antiarrhythmic (and eventually antiepileptic) effects.

7. Additionally, investigations were carried out on possible effects of the plant extracts on vascular smooth muscles. The extracts from *D. oliveri* showed potent relaxing effects. Aorta rings pre-contracted with noradrenaline as well as with potassium were relaxed by very small concentrations (EC_{50}) of MeOH extract (0.77 mg/l and 0.85 mg/l, respectively) and CH_2Cl_2 -MeOH extract (4.9 mg/l and 9.4 mg/l, respectively). Also some extracts from *V. cienkowskii* produced relaxation of smooth muscles of blood vessels. Using noradrenaline-pre-contracted aorta rings, relaxation was obtained with MeOH and EtAOc extracts with EC_{50} values of 11.8 mg/l and 40.7 mg/l, respectively. The two extracts caused only small relaxations on potassium pre-contracted aorta rings.

The observed vasorelaxation cannot be attributed to the inhibition of potassium channels. Different potassium channel blockers (sotalol, clofilium, amiodaron) which were tested in usual concentrations showed no effect on the force of contraction of blood vessels. Also an inhibition of calcium channels seems not to be responsible for the relaxation since the extracts did not produce a negative inotropic effect in heart muscle like the classical calcium channel blockers. The relaxing effect of the extracts most likely can be related to an inhibition of the G-protein signalling pathway resulting in a reduction of G-protein-induced calcium increase. Possible constituents of the extracts which may induce smooth muscle relaxation are flavonoids.

Therefore different flavonoids were tested for their vasorelaxing effects on aorta contraction and a structure-effect relationship was established. For example, quercetin showed a strong relaxing effect while rutin with a similar chemical structure was not effective.

8. The results show that extracts of *D. oliveri* and *V. cienkowskii* which are used by traditional healers in Cameroon for the treatment of heart arrhythmia and of epilepsy, in fact exert cardiovascular effects. Especially the MeOH-extract of *D. oliveri* had an influence on action potential, which could be related to a potassium channel blockade comparable with that of classical antiarrhythmic drugs. Further experiments are necessary to identify the active compounds and to describe the exact mechanisms involved in their action. Because of the vasorelaxing effect, the results suggest new indications for the use of these extracts, e.g., hypertension. Other results of this research project showed effects of magnesium and potassium on the threshold of the induction of sodium current which may explain antiarrhythmic effects of these two ions thereby supporting their combined therapeutic application.

Literaturverzeichnis

ADJANOHOUN, J. E., ABOUBAKAR, N., DRAMANE, K., EBOT, M. E., EKPERE, J. A., ENOW-OROCK, E.G., FOCHO, D., GBILE, Z.O., KAMANYI, A., KAMSU KOM,J., KEITA, A., MBENKUM, T., MBI, C.N., MBILE, A.L., MBOME,L.L., MUBIRU, N.K, NANCY, W.L., NKONGMENECK, B., SATABIE, B., SOFOWORA, A., TAMZE, V., & WIRMUM, C.K. (1996). Traditional medicine and pharmacopoeia. Contribution to ethnobotanical and floristic studies in Cameroon, CNPMS, Porto-Novo, Benin.

AJAY, M., GILANI, A. U. & MUSTAFA, M. R. (2003). Effects of flavonoids on vascular smooth muscle of the isolated rat thoracic aorta. *Life Sci* 74, 603-612.

ALDINI, G., CARINI, M., PICCOLI, A., ROSSONI, G. & FACINO, R. M. (2003). Procyanidins from grape seeds protect endothelial cells from peroxynitrite damage and enhance endothelium-dependent relaxation in human artery: new evidences for cardio-protection. *Life Sci* 73, 2883-2898.

ARBONNIER, M. (2002). Arbres, arbustes et lianes des zones sèches d’Afrique de l’Ouest. 2. ed., Artec, Pont-sur-Yonne.

BALOGUN, A. M. & FETUGA, B. L. (1985). Fatty acid composition of seed oils of some members of the leguminosae family. *Food Chem* 17, 175-182.

BARANY, K. & BARANY, M. (1996). Myosin light chains. In: Biochemistry of smooth muscle contraction. Barany, M. (ed.) Academic Press, Inc., San Diego, California, S. 21-35.

BAUMGARTEN, C. M., SINGER, D. H., FOZZARD, H. A. (1984). Intra- and extracellular potassium activities, acetylcholine and resting potential in guinea pig atria. *Circ Res* 54, 65-73.

BERS, D. M. (2000). Calcium fluxes involved in control of cardiac myocyte contraction. *Circ Res* 87, 275-281.

BERS, D. M. (2002). Calcium and cardiac rhythms: physiological and pathophysiological. *Circ Res* 90, 14-17.

BERS, D. M. (2002). Cardiac excitation-contraction coupling. *Nature* 415, 198-205.

BHATTACHARYYA, M. L., SARKER, S., MULL, K. P. & DEBNAM, Q. (1997). Clofilium-induced block of delayed rectifier type K⁺ current in atrial tumor cells (AT-1 cells). *J Mol Cell Cardiol* 29, 301-307.

BORLAK, J. & THUM, T. (2003). Hallmarks of ion channel gene expression in end-stage heart failure. *Faseb J* 17, 1592-1608.

BRANDT, W. (1988). Spasmolytische Wirkung ätherischer Öle. *Zeitschrift für Phytotherapie* 9, 33-39.

CANNELL, M. B. & SOELLER, C. (1998). Sparks of interest in cardiac excitation-contraction coupling. *Trends Pharmacol Sci* 19, 16-20.

CARBONE, E., & SWANDULA, D. (1991). Calcium Channel inactivation. In: Calcium Channels: Their properties, functions, regulation and clinical relevance. Eds.: Hurwitz, L. Partridge, L.D., Leach, J.K. (eds.), CRC Press, Boca Raton: S. 35-60.

CARMELIET, E. (1985). Electrophysiologic and voltage clamp analysis of the effect of sotalol on isolated cardiac muscle and Purkinje fibers. *J Pharm Exp Ther* 232, 817-825.

CATTERALL, W. A. (1992). Cellular and molecular biology of voltage gated sodium channels. *Physiol Rev* 72, 15-48.

CHAN, E. C., PANNANGPETCH, P. & WOODMAN, O. L. (2000). Relaxation to flavones and flavonols in rat isolated thoracic aorta: mechanism of action and structure-activity relationships. *J Cardiovasc Pharmacol* 35, 326-333.

CHEEK, M. & CABLE, S. (1997). Plant inventory for conservation management: The Kew-earthwacht Programme in Western Cameroon.

DICHTL, A. & VIERLING, W. (1991). Inhibition by magnesium of calcium inward current in heart ventricular muscle. *Eur J Pharmacol* 204, 243-248.

DOGGRELL, S. A. & BISHOP, B. E. (1996). Effects of potassium channel blockers on the action potentials and contractility of the rat right ventricle. *Gen Pharmacol* 27, 379-85.

DOMINGUEZ, G. & FOZZARD, H. A. (1970). Influence of extracellular K⁺ concentration on cable properties and excitability of sheep cardiac Purkinje fibers. *Circ Res* 26, 565-74.

DOS SANTOS, T. C., DELLE MONACHE, F. & LEITAO, S. G. (2001). Ecdysteroids from two Brazilian *Vitex* species. *Fitoterapia* 72, 215-220.

ECHERT, R. & CHAD, J. E. (1984). Inactivation of calcium channels. *Progr Biophys Molec Biol.* 44, 215-267.

ELUJOBA, A. A. (1998). Pharmacognostical standardization of Herbal medicines. 1st International Workshop on Herbal Medicinal Products. University of Ibadan, Nigeria.

FABIATO, A. (1985). Time and calcium dependence of activation and inactivation of calcium-induced release of calcium from the sarcoplasmic reticulum of a skinned canine cardiac purkinje cell. *J Gen Physiol* 85, 247-290.

FABIATO, A. & FABIATO, F. (1977). Calcium release from the sarcoplasmic reticulum. *Circ Res* 40, 119-129.

FEHLINGER, R. (1991). Magnesium in neurology. *Nervenarzt* 62: 321-322.

FERRELL, J. E., CHANG SING, P. D., LOEW, G., KING, R., MANSOUR, J. M. & MANSOUR, T. E. (1979). Structure/activity studies of flavonoids as inhibitors of cyclic AMP phosphodiesterase and relationship to quantum chemical indices. *Mol Pharmacol* 16, 556-568.

FRANKENHAEUSER, B. & HODGKIN, A.L. (1957). The action of calcium on the electrical activity of squid axons. *J Physiol* 137, 218-244.

FRICKER, D., VERHEUGEN, J. A., MILES, R. (1999). Cell-attached measurements of the firing threshold of rat hippocampal neurones. *J Physiol* 517, 791-804.

FUSI, F., SAPONARA, S., PESSINA, F., GORELLI, B. & SGARAGLI, G. (2003). Effects of quercetin and rutin on vascular preparations: a comparison between mechanical and electrophysiological phenomena. *Eur J Nutr* 42, 10-17.

GARDINIER, P. (2000). Chasteberry (*Vitex agnus castus*). Langwood Herbal Task Force.

GHANI, M. F. & RABAH, M. (1977). Effect of magnesium chloride on electrical stability of the heart. *Am Heart J* 94, 600-602.

GILBERT, D. L. & EHRENSTEIN, G. (1969). Effect of divalent cations on potassium conductance of squid axons: determination of surface charge. *Biophys J* 9, 447-63.

GINSBURG, K. S. & BERS, D. M. (2004). Modulation of excitation-contraction coupling by isoproterenol in cardiomyocytes with controlled SR Ca^{2+} load and Ca^{2+} current trigger. *J Physiol* 556, 463-480.

HAEUSER, J., HALL, S. F., OEHLISCHLAGER, A. C. & OURISSON, G. (1970). The structure and stereochemistry of oliveric acid. *Tetrahedron* 26, 3461-3465.

HAEUSER, J., LOMBARD, R., LEDERER, F. & OURISSON, G. (1961). Isolement et structure d'un nouveau diterpène: L'acide daniellique: Stéréochimie de l'acide daniellique. *Tetrahedron*, 12, 205-214.

HAGIWARA, S., MITSUI, M. & KARAKI, H. (1993). Effects of felodipine, nifedipine and verapamil on cytosolic Ca^{2+} and contraction in vascular smooth muscle. *Europ J Pharmacol*. 234, 1-7.

HALL, S. K. & FRY, C. H. (1992). Magnesium affects excitation, conduction, and contraction of isolated mammalian cardiac muscle. *Am J Physiol* 263, H622-633.

HERNÁNDEZ, M. M., HERASO, C., VILLARREAL, M. L., VARGAS-ARISPURO, I. & ARANDA, E. (1999). Biological activities of crude plant extracts from *Vitex trifolia* L. (Verbenaceae). *J Ethnopharmacol* 67, 37-44.

HILLE, B. (1968). Charges and potentials at the nerve surface. Divalent ions and pH. *J Gen Physiol* 51, 221-36.

HILLE, B. (1992). *Ionic Channels of Excitable Membranes*. 2 ed. Sinauer Associates, INC. Publishers, Massachusetts, U.S.A.

HILLE, B. (2001). *Ionic Channels of Excitable Membranes*. 3 ed. Sinauer Associates, INC. Publishers, Massachusetts, U.S.A.

HONERJÄGER, P. (1980). A neurally mediated inotropic effect of veratridine and cevadine on isolated guinea-pig papillary muscle. *Naunyn Schmiedeberg's Arch Pharmacol* 314, 157-160.

- HONERJÄGER, P. (1982). Cardioactive substances that prolong the open state of sodium channels. *Rev Physiol Biochem Pharmacol* 92, 1-74.
- HONERJÄGER, P. & REITER M. (1975). The relation between the effects of veratridine on action potential and contraction in mammalian ventricular myocardium. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* 289, 1-28.
- HONERJÄGER, P. & REITER, M. (1977). Sarcolemmal sodium permeability and contractile force of guinea pig papillary muscle: effects of germitrine. *Circ Res* 40, 90-98.
- HOOKE, C.S., CALKINS, P.J., FLEISCH, J.H. (1997). On the measurement of vascular and respiratory smooth muscle response in vitro. *Blood vessels* 14, 1-11.
- KLUGBAUER, N. (1999). Molekulare Grundlagen der Wirkung von Kalziumkanalblockern. *Med. Welt*, 50, 506-511.
- KOCH, S. (2000). Die Einwärtsstrom-Induzierte Calcium-Freisetzung in der Herzmuskelzelle (CICR). Dissertation, Fakultät für Chemie und Pharmazie, Ludwig-Maximilians-Universität, München.
- KOCH-WESER, J. (1963). Effect of rate changes on strength and time course of contraction of papillary muscle. *Am J Physiol* 204, 451-457.
- KOLLER, M. L. RICCIO, M. L. & GILMOUR, R. F., JR. (1998). Dynamic restitution of action potential duration during electrical alternans and ventricular fibrillation. *Am J Physiol* 275, H1635-1642.
- LACINOVA, L. & HOFMANN, F. (2001). Voltage-Dependent Calcium Channels. In: *Heart Physiology and Pathophysiology*, 4th ed. Sperelakis, N.; Kurachi, Y.; Terzic, A.; Cohen, M. V. (eds). Academic Press. S.247-257.
- LAMB, G. D. (2000). Excitation-contraction coupling in skeletal muscle: comparisons with cardiac muscle. *Clin. Exp. Pharmacol. Physiol.* 27, 216-224.
- LAMB, G. D. & CELLINI, M. A. (1999). High intracellular $[Ca^{2+}]$ alters sarcoplasmic reticulum function in skinned skeletal muscle fibres of the rat. *J Physiol* 519, 815-827.

LEE, K. S., MARBAN, E. & TSIEN, R. W. (1985). Initiation of calcium channels in mammalian heart cells: Joint dependence on membrane potential and intracellular calcium. *J Physiol* 364, 395-411.

LOSSNITZER, K., PFENNINGS DORF, G., BRÄUER, H. (1983). Myocard, Gefäße, Calcium. Knoll AG, Ludwigshafen.

MACLEAN, D. R. & CHOCKALINGAM, A. (1999). The global burden of cardiovascular diseases. *Can J Cardiol* 15 Suppl G, 17G-19G.

MALÉCOT, C. O. & ARGIBAY, J. A. (1999). Block of gating currents related to K^+ channels as a mechanism of action of clofilium and D-sotalol in isolated guinea-pig ventricular heart cells. *Br J Pharmacol* 128, 301-312.

MBI, C.N. & BILIKHA, J.B. (1998). Conventional drug production from medicinal plants: Contributions from the Cameroon pharmacopoeia. 1st International Workshop on Herbal Medicinal Products. University of Ibadan, Nigeria.

MCLAUGHLIN, S. (1989). The electrostatic properties of membranes. *Annu Rev Biophys Biophys Chem* 18, 113-36.

MCLAUGHLIN, S., MULRINE, N., GRESALFI, T., VAIO, G., & MCLAUGHLIN, A. (1981). Adsorption of Divalent Cations to bilayer membranes containing phosphatidylserine. *J Gen Physiol* 77, 445-73.

MILLS, J. & NATL, S. (1973). Identity of daniellic acid with illurinic acid. *Phytochem* 12, 2479-2480.

MIYATA, A., DOWELL, J. D., ZIPES, D. P., RUBART, M. (2002). Rate-dependent $[K^+]_{(o)}$ accumulation in canine right atria in vivo: electrophysiological consequences. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 283, H506-517.

MÜLLER, B. (1997). Untersuchungen zur Wirkung von Pflanzenextrakten und Pflanzeninhaltsstoffen auf das kardiovaskuläre System durch Kontraktionskraftmessung an isolierten Aortenringen und Papillarmuskeln. Dissertation, Fakultät für Chemie und Pharmazie, Ludwig-Maximilians-Universität, München.

MULLER, R.U. & FINKELSTEIN, A. (1974). The electrostatic basis of magnesium inhibition of transmitter release. *Proc Nat Acad Sci* 71, 923-926.

MUTSCHLER, E. (1996). Arzneimittelwirkungen. Lehrbuch der Pharmakologie und Toxikologie. 7. Auflage. Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft mbH, Stuttgart.

NÄBAUER, M. & KAAB, S. (1998). Potassium channel down-regulation in heart failure. *Cardiovasc Res* 37, 324-334.

NAKAKI, T., ROTH, B. L., CHUANG, D. M. & COSTA, E. (1985). Phasic and tonic components in 5-HT₂ receptor-mediated rat aorta contraction: participation of Ca⁺⁺ channels and phospholipase C. *J Pharmacol Exp Ther* 234, 442-446.

NAND, V. & DOGGRELL, S. A. (2000). Effects of clofilium on cardiovascular tissues from normo- and hypertensive rats. *J Auton Pharmacol* 20, 185-192.

NELSON, L., SCARBOROUGH, L., CARRIER, G. O. (1984). Nifedipine and alpha-adrenoceptors in rat aorta. I. Role of extra cellular calcium in alpha-1 and alpha-2 adrenoreceptor-mediated contraction. *J Pharmacol Exp Ther* 231, 597-602.

NKENG-EFOUET-ALANGO, P. (1987). Contribution à l'étude des plantes médicinales du Cameroun: Les ecdysones et les irodoides des *Vitex* (verbenaceae) et des *Podocarpus* (Podocarpaceae). Thèse de doctorat 3^{ème} cycle en chimie organique, Faculté des Sciences, Université de Yaoundé, Cameroun.

OLATUNJI, G. (2001). Diterpene lactone from the heartwood of *Daniella oliveri*. *Cellul Chem Technol* 34, 505-507.

OLATUNJI, G. & ONAMUSI, G. (1993). Phloroglucinol derivatives of nigerian pulp woods and their biotransformation on fermentino system. *Cellul Chem Technol* 27, 307-309.

ONWUKAEME, N. D., LOT, T. Y. & UDOH, F. V. (1999). Effects of *Daniella oliveri* bark on isolated rat bladder. *Phytother Res* 13, 416-418.

ONWUKAEME, N. D., LOT, T. Y. & UDOH, F. V. (1999). Effects of *Daniella oliveri* stem bark and leaf extracts on rat skeletal muscle. *Phytother Res* 13, 419-421.

RAJ NARAYANA, K., SRIPAL REDDY, M., CHALUVADI, M.R., KRISHNA, D.R. (2001). Bioflavonoids classification, pharmacological, biochemical effects and therapeutic potential. *Ind J Pharmacol* 33, 2-16.

RANG, H. P., DALE, M. M., RITTER, J. M., MOORE, P. K. (2003). Pharmacology. 5 ed. Churchill Livingstone, London, Toronto.

REITER, M. (1967). Die Wertbestimmung inotrop wirkender Arzneimittel am isolierten Papillarmuskel. *Arzneim. -Forsch. (Drug Res.)* 17,1249-1253.

REITER, M. & BRANDT, W. (1985). Relaxant effects on tracheal and ileal smooth muscles of the guinea pig. *Arzneim. -Forsch. (Drug Res.)* 35, 408-414.

ROBERT. F. & GILMOUR J. R. (2003). A novel approach to identifying antiarrhythmic drug targets. *Drug Discov Today* 8, 162-167.

SANAE, F., MIYAICHI, Y., KIZU, H. & HAYASHI, H. (2002). Effects of catechins on vascular tone in rat thoracic aorta with endothelium. *Life Sci* 71, 2553-2562.

SCHMIDT, F.R., THEWS, G. (1990). Physiologie des Menschen. 4 Auflage. Springer-Verlag, Berlin, Paris, Barcelona.

SCHRAM, G., POURRIER, M., MELNYK, P. & NATTEL, S. (2002). Differential distribution of cardiac ion channel expression as a basis for regional specialization in electrical function. *Circ Res* 90, 939-950.

SENSCH, O., VIERLING, W., BRANDT, W. & REITER, M. (2000). Effects of inhibition of calcium and potassium currents in guinea-pig cardiac contraction: comparison of β -caryophyllene oxide, eugenol, and nifedipine. *Br J Pharmacol* 131, 1089-1096.

SHILS, M.E. (1969). Experimental human magnesium depletion. *Medicine (Baltimore)*, 48, 61-85.

SMITH, T. G., JR., BARKER, J. L., SMITH, B. M. & COLBURN, T. R. (1980). Voltage clamping with microelectrodes. *J Neurosci Methods* 3, 105-128.

THUY, T.T., PORZEL, A., RIPPERGER, H., VAN SUNG, T. & ADAM, G. (1998). Chalcones and ecdysteroids from *Vitex leptobotrys* *Phytochem* 49, 2603-2605.

ULBRICHT, W. (1972a). Rate of veratridine action on the nodal membrane. I. Fast phase determined during sustained depolarization in the voltage clamp. *Pflügers Arch* 336, 187-199.

ULBRICHT, W. (1972b). Rate of veratridine action on the nodal membrane. II. Fast and slow phase determined with periodic impulses in the voltage clamp. *Pflugers Arch* 336, 201-212.

VIERLING, W. (1987). Elektrophysiologische Grundlagen für die antiarrhythmische Wirkung von Magnesium. *Magnesium Bulletin* 9, 208.

VIERLING, W. (1988). Ryanodine in mammalian heart ventricular muscle: indication for the induction of calcium leakage from the sarcoplasmic reticulum. *Eur J Pharmacol* 145, 329-334.

VIERLING, W. (1997). Bemerkung zur Kinetik und zu extrazellulären Wirkung von Kalium und Magnesium. *Herz* 22, 3-10

VIERLING, W., BRAND, N., GAEDCKE, F., SENSCH, K. H., SCHNEIDER, E. & SCHOLZ, M. (2003). Crataegus-Extrakte. *Deutsche Apotheker Zeitung* 140, 59-64.

VIERLING, W., BRAND, N., GAEDCKE, F., SENSCH, K. H., SCHNEIDER, E. & SCHOLZ, M. (2003). Investigation of the pharmaceutical and pharmacological equivalence of different Hawthorn extracts. *Phytomedicine* 10, 8-16.

VIERLING, W., SEIBEL, K. & REITER, M. (1987). Voltage-dependent calcium release in guinea-pig cardiac ventricular muscle as antagonized by magnesium and calcium. *Basic Res Cardiol* 82, 415-427.

WAGNER, H. (1993). Drogen und ihre Inhaltstoffe. In: Pharmazeutische Biologie. 5. Auflage. Gustav Fischer Verlag, Stuttgart, New York.

WAGNER, H., WIESENNAUER, M. (1995). Phytopharmaka und pflanzliche Homöopathika. Gustav Fischer Verlag, Stuttgart, Jena, New-York.

WANG, H. & JOSEPH, J. A. (1999). Structure-activity relationships of quercetin in antagonizing hydrogen peroxide-induced calcium dysregulation in PC12 cells. *Free Radic Biol Med* 27, 683-694.

WEIDMANN, S. (1955a). The effect of the cardiac membrane potential on the rapid availability of the sodium-carrying system. *J Physiol* 127, 213-224.

WEIDMANN, S. (1955b). Effects of calcium ions and local anaesthetics on electrical properties of purkinje fibres. *J Physiol* 129, 568-582.

WEISS, R. F. (1991). Lehrbuch der Phytotherapie. 7. Auflage. Hippokrates Verlag, Stuttgart.

WIECKHORST, A. (2002). Die Verwendung von Pflanzen in der Traditionellen Medizin bei drei Baka Gruppen in Südost-Kamerun. Kölner Ethnologische Beiträge, Köln.

ZENEBE, W. & PECHANOVA, O. (2002). Effects of red wine polyphenolic compounds on the cardiovascular system. *Bratisl Lek Listy* 103, 159-165.

Danksagung

Die vorliegende Arbeit wurde in der Zeit von 1999 bis 2004 am Institut für Pharmakologie und Toxikologie der Technischen Universität München und im Walther-Straub-Institut für Pharmakologie und Toxikologie der Ludwig-Maximilians-Universität München durchgeführt.

Meinem Doktorvater, Herrn Prof. Dr. B. Fichtl danke ich sehr herzlich für die großzügige Unterstützung und die wissenschaftliche Förderung dieser Arbeit sowie das mir entgegengebrachte Vertrauen.

Ganz besonders danke ich Herrn Prof. Dr. W. Vierling vom Institut für Pharmakologie und Toxikologie der TU München für tatkräftige Betreuung und für die stets entgegengebrachte Bereitschaft alle Probleme zu diskutieren und die Arbeit tatkräftig zu fordern.

Herrn Prof. Dr. F. Hofmann am Institut für Pharmakologie und Toxikologie der TU München danke ich sehr für vielfältige Anregungen in Diskussionen während der Entstehung dieser Arbeit sowie für die großzügige Bereitstellung von technischen Hilfsmitteln und Forschungsmaterial.

Mein besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr. H. Wagner für die außerordentlich intensive wissenschaftliche Anleitung und hilfreiche Unterstützung.

Herrn Prof. Dr. A. Kamanyi von der University of Dschang, Kamerun danke ich für die große Hilfsbereitschaft und engagierte Unterstützung.

Frau Prof. Dr. M. A. Lacaille-Dubois von der Faculté de Pharmacie, Université de Bourgogne, Dijon, Frankreich gilt mein Dank für wissenschaftliche Unterstützung besonders bei den chemischen Untersuchungen.

Weiterhin danke ich,

Herrn Prof. Dr. Mpoame Mbida von der University of Dschang, Kamerun für wissenschaftlich Ratschläge.

Herrn Dr. P. Nkeng-Efouet-Alango, Département de chimie, Faculté des sciences, Université de Dschang, Kamerun, für die Wahl der Pflanzen, die Extraktion und freundliche wissenschaftliche Beratung.

Frau Dr. R. Seitz und deren Familie für ihre Freundschaft, Ermutigung und Unterstützung in allen Lebenslagen.

Frau P. Apostolopoulos und Frau S. Herzog für die technisch qualifizierte Hilfe bei den Präparationen und die Unterstützung bei den Kontraktionsversuchen.

Dr. A. B. Dongmo, Dr. T. B. Nguenefack, Frau C. Vierling, Frau S. Vignali und Frau S. Jost für die freundliche wissenschaftliche Beratung und Unterstützung.

Herrn N. Ertl, P. Kerner und R. Kliegl, für ihre umsichtige und schnelle Hilfe bei technischen Problemen.

Herrn Sahiner, Frau Günther und Frau E. Roller, für ihre Unterstützung bei der Durchführung der Tierversuche und die Erstellung der Abbildungen.

Gladice-Pauline Sontia für seelischen Beistand.

Meiner ganzen Familie und meinen Freunden die in Kamerun geblieben sind.

Lebenslauf

von **Bruno SONTIA**

Geboren am 10. 06. 1972 in Fossong-Wentcheng (Kamerun)

Angaben über bisheriges Studium

Grundschule (1978-1984)

In der Ecole publique francophone de Buea.
Zeugnis: CEPE

Gymnasium (1984-1992)

Teil eins (1984-1989):
Bilingual Grammar High School Moliko-Buea
Zeugnis: BEPC

Teil zwei (1989-1992):
Bilingual Grammar High School Moliko-Buea
Zeugnis: Baccalaureat-D

Hochschule (1993-1998)

University of Dschang (Kamerun)
Faculty of Science

Grundstudium (1993-1996)
Diplom: Licence of Zoology

Hauptstudium (1996-1998)
Diplom: Maîtrise of Animal Biology and Physiology

Seit Juni 2000 eingeschrieben an der medizinischen Fakultät der LMU,
Promotionsstudiengang Humanbiologie

Berufliche Erfahrungen:

Graduate Assistant an der Faculty of Science der University of Dschang
(Kamerun)

Sprachen:

Ausbildung in Französisch, Englisch und Deutsch