

Aus dem Institut für Experimentelle Onkologie und Therapieforschung
der Technischen Universität München
Direktor Prof. Dr. med. B. Gänsbacher
und aus dem
Institut für Pharmakologie und Toxikologie
der Technischen Universität München
Direktor Prof. Dr. med. F. Hofmann

Angefertigt unter der Leitung von
Dr. med. vet. Christine Baumgartner
Prof. Dr. med. vet. Dr. med. habil W. Erhardt

Vorgelegt über
Prof. Dr. med. vet. M. Stangassinger
Institut für Physiologie, Physiologische Chemie und Tierernährung
der Ludwig-Maximilians-Universität München

**Zum vasodilatierenden Effekt des antidiabetisch wirkenden
Hintonia-latiflora-Extraktes:
In-vitro- und In-vivo-Messungen**

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung der tiermedizinischen Doktorwürde
der Tierärztlichen Fakultät
der Ludwig-Maximilians-Universität München

von
Christina Vierling
aus
München

München, 2005

Gedruckt mit der Genehmigung der Tierärztlichen Fakultät der
Ludwig-Maximilians-Universität München

Dekan: Univ.-Prof. Dr. A. Stolle
Referent: Univ.-Prof. Dr. M. Stangassinger
Koreferent: Univ.-Prof. Dr. B. Aigner

Tag der Promotion: 15. Juli 2005

für:

alex

meine Eltern

Martina

Frau Bilian

Inhaltsverzeichnis

| | | |
|---------|---|----|
| 1 | Einleitung | 1 |
| 2 | Schrifttum | 3 |
| 2.1 | Diabetes mellitus | 3 |
| 2.1.1 | Diabetes mellitus-Typen..... | 3 |
| 2.1.2 | Entstehung und Ursachen des Diabetes mellitus..... | 5 |
| 2.2 | Therapie des Diabetes mellitus..... | 6 |
| 2.2.1 | Insulin..... | 6 |
| 2.2.2 | Orale Antidiabetika | 9 |
| 2.2.2.1 | Sulfonylharnstoff-Derivate..... | 9 |
| 2.2.2.2 | Biguanide..... | 11 |
| 2.2.2.3 | Glucosidase-Hemmer | 11 |
| 2.2.2.4 | Thiazolidine..... | 12 |
| 2.3 | Sekundärerkrankungen des Diabetes mellitus..... | 12 |
| 2.3.1 | Diabetische Angiopathien | 14 |
| 2.3.1.1 | Diabetische Mikroangiopathie | 14 |
| 2.3.1.2 | Diabetische Makroangiopathie..... | 21 |
| 2.4 | Diabetes mellitus beim Tier | 23 |
| 2.5 | Hintonia-latiflora-Extrakt als Phytotherapeutikum..... | 24 |
| 2.5.1 | Hintonia latiflora | 25 |
| 2.5.1.1 | Botanik | 25 |
| 2.5.1.2 | Botanische Beschreibung | 25 |
| 2.5.1.3 | Hintonia-latiflora-Rinde | 26 |
| 2.5.1.4 | Inhaltsstoffe | 27 |
| 2.5.1.5 | Anwendung | 28 |
| 2.6 | Aufbau und Funktion der glatten Gefäßmuskulatur..... | 29 |
| 2.6.1 | Physiologie der arteriellen Blutgefäße | 29 |
| 2.6.1.1 | Mechanismus der Kontraktion glatter Muskelzellen..... | 29 |
| 2.6.1.2 | Mechanismus der Erregungsübertragung..... | 31 |
| 2.6.1.3 | Spannungsgesteuerte Calcium-Kanäle | 31 |
| 2.6.1.4 | Ligandengesteuerte Calcium-Kanäle | 32 |
| 2.6.1.5 | Calcium-Freisetzung aus intrazellulären Speichern..... | 32 |
| 2.6.1.6 | Regulation der Gefäße..... | 33 |
| 2.6.2 | Gefäßspannungs-verändernde Substanzen | 33 |
| 2.6.2.1 | Der Einfluss von Noradrenalin auf die Gefäßmuskulatur | 33 |
| 2.6.2.2 | Der Einfluss von Milrinon auf den glatten Muskel..... | 34 |
| 2.6.2.3 | Der Einfluss von Kalium auf den glatten Muskel | 35 |
| 2.6.2.4 | Synthese und Wirkmechanismus des NO | 35 |
| 2.6.2.5 | Endothelin | 36 |
| 2.6.3 | In-vitro- und In-vivo-Untersuchungen zur Bestimmung von Gefäßtonus und Kontraktilität des Herzens | 37 |
| 2.6.3.1 | Kontraktionsmessungen an isolierten Aortenringen | 37 |
| 2.6.3.2 | Papillarmuskel..... | 37 |
| 2.6.3.3 | Kontraktionsmessungen am isolierten Papillarmuskel..... | 38 |
| 2.6.3.4 | Fluoreszenzmikroskopische Bestimmung der intrazellulären Calcium-Ionenkonzentration..... | 38 |

| | | |
|---------|---|----|
| 2.6.3.5 | Der Einfluss von Vasopressin auf den glatten Muskel..... | 39 |
| 2.6.3.6 | Ultraschallverfahren zur vaskulären Diagnostik | 39 |
| 2.6.3.7 | Dopplereffekt..... | 40 |
| 3 | Eigene Untersuchungen..... | 45 |
| 3.1 | Zielsetzung der Studie | 45 |
| 3.2 | Material und Methoden | 47 |
| 3.2.1 | In-vitro-Messungen an isolierten Aortenringen | 47 |
| 3.2.1.1 | Versuchstiere für die In-vitro-Versuche..... | 47 |
| 3.2.1.2 | Verwendete Substanzen | 47 |
| 3.2.1.3 | Testsubstanzen..... | 48 |
| 3.2.1.4 | Versuchsapparatur | 49 |
| 3.2.1.5 | Versuchsvorbereitung..... | 51 |
| 3.2.1.6 | Versuchsdurchführung | 52 |
| 3.2.1.7 | Kalibrierung..... | 54 |
| 3.2.1.8 | Auswertung | 54 |
| 3.2.2 | In-vitro-Messungen am isolierten Papillarmuskel | 55 |
| 3.2.2.1 | Geräte und Versuchsaufbau..... | 55 |
| 3.2.2.2 | Versuchsdurchführung | 56 |
| 3.2.3 | In-vitro-Calcium-Ionenbestimmung..... | 57 |
| 3.2.3.1 | A10-Zellen..... | 57 |
| 3.2.3.2 | Zellkultur | 57 |
| 3.2.3.3 | Verwendete Substanzen | 59 |
| 3.2.3.4 | Versuchsaufbau | 59 |
| 3.2.3.5 | Versuchsvorbereitung..... | 61 |
| 3.2.3.6 | Versuchsdurchführung | 62 |
| 3.2.3.7 | Auswertung | 63 |
| 3.2.3.8 | Medium und Lösungen..... | 63 |
| 3.2.4 | In-vivo-Versuche am Kaninchen..... | 65 |
| 3.2.4.1 | Versuchstiere | 65 |
| 3.2.4.2 | Haltungsbedingungen..... | 66 |
| 3.2.4.3 | Verwendete Substanzen | 66 |
| 3.2.4.4 | Allgemeiner Versuchsplan | 67 |
| 3.2.4.5 | Versuchsgruppe | 68 |
| 3.2.4.6 | Versuchsverlauf..... | 69 |
| 3.2.4.7 | Versuchsvorbereitung..... | 69 |
| 3.2.4.8 | Versuchsdurchführung | 70 |
| 3.2.4.9 | Auswertung | 77 |
| 3.3 | Ergebnisse | 80 |
| 3.3.1 | Kontraktionskraftmessungen an isolierten Aortenringen..... | 80 |
| 3.3.1.1 | Wirkung des Hintonia-latiflora-Extraktes an Noradrenalin-vorkontrahierten Präparaten..... | 80 |
| 3.3.1.2 | Wirkung von Coutareagenin an Noradrenalin-vorkontrahierten Präparaten | 81 |
| 3.3.1.3 | Milrinon an Noradrenalin-vorkontrahierten Präparaten..... | 82 |
| 3.3.1.4 | Zusammenfassung der Wirkungen von Hintonia-latiflora-Extrakt, Coutareagenin und Milrinon auf die Noradrenalin-vorkontrahierten Aortenringe | 83 |
| 3.3.1.5 | Wirkung des Hintonia-latiflora-Extraktes an Kalium-vorkontrahierten Präparaten..... | 84 |
| 3.3.1.6 | Wirkung von Coutareagenin an Kalium-vorkontrahierten Präparaten..... | 86 |
| 3.3.2 | Kontraktionen des Papillarmuskels..... | 87 |

| | | |
|---------|--|-----|
| 3.3.3 | Fluoreszenzmikroskopische Calcium-Messungen | 89 |
| 3.3.4 | Sonographische Untersuchungen am Kaninchen | 92 |
| 3.3.4.1 | B-Mode Sonographie an der Aorta abdominalis | 92 |
| 3.3.4.2 | B-Mode Sonographie an der A. carotis communis | 98 |
| 4 | Diskussion | 109 |
| 4.1 | Diskussion der In-vitro-Versuchsmodelle | 110 |
| 4.1.1 | Kontraktionsmessungen an isolierten Aortenringen und am isolierten Papillarmuskel des Herzens | 110 |
| 4.1.2 | Fluoreszenzmikroskopische Calcium-Ionenbestimmung | 111 |
| 4.2 | Aortenkontraktionsergebnisse | 112 |
| 4.3 | Ergebnisse der Papillarmuskelkontraktionen | 114 |
| 4.4 | Ergebnisse der fluoreszenzmikroskopischen Calcium-Ionenbestimmung | 115 |
| 4.5 | Diskussion des In-vivo-Versuchsmodells | 116 |
| 4.6 | Ergebnisse der Gefäßsonographie | 118 |
| 4.6.1 | Gefäßsonographie an Aorta abdominalis und A. carotis communis | 118 |
| 4.6.2 | Herz-Kreislauf-Parameter | 119 |
| 4.6.2.1 | Herzfrequenz | 119 |
| 4.6.2.2 | Mittlerer arterieller Blutdruck | 120 |
| 4.6.3 | Blutzucker | 121 |
| 4.7 | Schlussfolgerung und Ausblick | 122 |
| 5 | Zusammenfassung | 124 |
| 6 | Summary | 126 |
| 7 | Literaturverzeichnis | 128 |
| 8 | Tabellenverzeichnis | 147 |
| 9 | Abbildungsverzeichnis | 149 |
| 10 | Abkürzungsverzeichnis | 152 |
| 11 | Danksagung | 154 |

1 EINLEITUNG

Diabetes mellitus ist eine weltweit verbreitete Erkrankung, von der in Zukunft immer mehr Menschen betroffen sein werden. Die Problematik der Krankheit hat sich insofern verlagert, als die Hauptschwierigkeit bei der Behandlung nicht mehr so sehr in der Beherrschung der akuten Komplikationen wie hyperglykämisches Koma liegt, sondern vielmehr in der Vermeidung von Spätfolgen, die durch diese Krankheit verursacht werden. Als Spätfolgen oder Sekundärerkrankungen des Diabetes mellitus gelten vor allen Dingen Mikro- und Makroangiopathien, die wiederum für die Entstehung von diabetischer Retinopathie, Nephropathie und Polyneuropathie verantwortlich gemacht werden. Kardiovaskuläre Erkrankungen, wie Hypertonie, Herzinsuffizienz und Angina pectoris stellen die Haupttodesursachen bei Diabetikern dar. Der Schwerpunkt in der Therapie von diabetischen Patienten muss deshalb auch auf die Linderung bzw. Vermeidung dieser Sekundärerkrankungen gelegt werden.

In der modernen Therapie des Diabetes mellitus wird dementsprechend das Augenmerk nicht nur auf die möglichst genaue Einstellung des Blutzuckers (ohne gravierende Hyper- oder Hypoglykämien), sondern auch auf die Verminderung von Spätschäden gelegt. Während beim Typ 1 Diabetiker durch den Einsatz der intensivierten Insulintherapie große therapeutische Fortschritte erzielt werden konnten, stellt sich gerade bei mildereren Formen des Typ 2 Diabetes, bei denen vor allem orale Antidiabetika zum Einsatz kommen, die Frage, ob insbesondere die Spätfolgen mit der Therapie günstig beeinflusst werden.

In der traditionellen Volksmedizin Südamerikas wird seit langer Zeit ein Pflanzenpräparat zur Senkung des Blutzuckers eingesetzt. Seit den 50-iger Jahren wird dieses Phyto-Antidiabetikum auch in Europa bzw. in Deutschland angewandt. *Hintonia latiflora*, zur Familie der Rubiaceae gehörend, ist eine buschartig wachsende Pflanze, die in Mittel- und Südamerika weit verbreitet ist. Der in Deutschland als Arzneimittel verwendete Extrakt wird aus der Rinde dieser Pflanze gewonnen. Der Extrakt enthält zahlreiche Inhaltsstoffe, wobei die Blutzucker-senkende Wirkung hauptsächlich auf die vorhandenen Neoflavonoide zurückgeführt wird. Von diesen ist vor allem das Coutareagenin von Bedeutung, das deshalb als Leitsubstanz für die Standardisierung des Extraktes herangezogen wird.

Die folgende Arbeit beschäftigt sich nicht primär mit dem Blutzucker-senkenden Effekt dieses Extraktes, da dieser schon hinreichend untersucht wurde, sondern vielmehr mit der Wirkung des *Hintonia-latiflora*-Extraktes auf das Kreislaufsystem.

Um den vasodynamische Effekt des *Hintonia-latiflora*-Extraktes zu untersuchen, werden verschiedene In-vitro-, und In-vivo–Untersuchungen durchgeführt. Mit Hilfe von Kontraktionskraftmessungen an isolierten Aortenringen wird die Vasoaktivität im In-vitro-Modell

EINLEITUNG

überprüft. Kontraktionskraftmessungen am isolierten Papillarmuskel des Herzens erlauben einen Rückschluss auf die Beeinflussung der Pumpfunktion des Herzens. Um Hinweise zum Wirkungsmechanismus zu gewinnen, werden fluoreszenzmikroskopische Calcium-Ionenbestimmungen an glatten Muskelzellen der Aorta durchgeführt. Im In-vivo-Teil der Studie wird der Einfluss einer einmaligen oralen Gabe des *Hintonia latiflora*-Extraktes auf große arterielle Gefäße, wie Aorta abdominalis und Arteria carotis communis am wachen Kaninchen mit Hilfe von Gefäßsonographie ermittelt. Zusätzlich wird die Auswirkung einer solchen Verabreichung auf den Blutzucker der Versuchstiere überprüft.

2 SCHRIFTTUM

2.1 Diabetes mellitus

Unter Diabetes mellitus versteht man eine Stoffwechselerkrankung, bei der durch einen absoluten oder relativen Insulinmangel bzw. durch verminderte Insulinsensitivität des Gewebes eine chronische Hyperglykämie entsteht. Zusätzlich zum gestörten Kohlenhydratstoffwechsel können auch der Protein- und Fettstoffwechsel entgleisen.

Diabetes mellitus ist eine Volkskrankheit mit steigenden Patienten-Zahlen. In Deutschland sind davon 6 bis 8 % der Bevölkerung betroffen. Diabetes mellitus ist die häufigste und zugleich bedeutsamste chronische Stoffwechselstörung, bei der die Patienten ein Leben lang ärztliche Betreuung benötigen (STALLMACH et al. 2004).

In den USA wird die Zahl der diagnostizierten Diabetiker und der Patienten mit verminderter Glucosetoleranz auf etwa 30 Millionen geschätzt. Darüber hinaus gibt es noch eine weitaus größere Anzahl von Menschen, die einen erhöhten Blutzuckerspiegel zeigen, der aber noch unterhalb der Grenze für Diabetes liegt (HARRIS et al. 1997, VUKSAN et al. 2000)

2.1.1 Diabetes mellitus-Typen

Unter ätiologischen, pathogenetischen und klinischen Gesichtspunkten werden verschiedene Diabetes-Typen unterschieden. So gibt es zum Typ 1 und zum Typ 2 Diabetes zusätzlich noch weitere Diabetesformen unterschiedlicher Ätiologie (siehe Tabelle 1).

Der Typ 1 Diabetes, früher als insulinabhängiger, IDDM (insulin dependent diabetes mellitus), Insulin-Mangel-Diabetes oder juveniler Diabetes bezeichnet, tritt bei etwa 10 % der Diabetiker auf. Eine Autoimmunreaktion führt zur Zerstörung der β -Zellen des Pankreas was für gewöhnlich zum absoluten Insulinmangel führt. Da der Patient kein eigenes Insulin mehr produziert, ist er auf eine lebenslange Substitution von exogenem Insulin angewiesen. Die β -Zellerstörung kann vor allem bei Jugendlichen sehr rasch voranschreiten. Es besteht aber auch die Möglichkeit einer langsamen Zerstörung. Besonders häufig beginnt die Krankheit zwischen dem 15. und 25. Lebensjahr. Äußerst selten tritt diese Erkrankung im hohen Alter auf. Erst wenn 80 bis 90 % der β -Zellen zugrunde gegangen sind, manifestiert sich der Typ 1 Diabetes. Als klassische Symptome zeigen die Patienten Polydipsie, Polyurie, Gewichtsverlust und Leistungsschwäche. Darüber hinaus sind die Patienten häufig abgemagert und exsikkotisch. Die Erstmanifestation des Typ 1 Diabetes tritt häufig nach Stress-Situationen auf (z.B. nach schweren Infektionen, Operationen) (FOSTER 1998).

Der Typ 2 Diabetes wurde früher auch als NIDDM (non insulin dependent diabetes mellitus) oder Altersdiabetes bezeichnet. Diese Form kommt wesentlich häufiger vor als der Typ 1 Diabetes. Sie ist in ihrer Progredienz langsamer und es besteht meist nur ein relatives Insulindefizit. Etwa 85 bis 90 % der an Diabetes mellitus erkrankten Patienten sind Typ 2 Diabetiker (HANEFELD 1996, THEWS et al. 1999b, FRERCKS und RENZ-POLSTER 2001, STALLMACH et al. 2004). Charakteristisch ist eine Resistenz der peripheren Gewebe gegenüber der Insulinwirkung und eine, relativ zum Blutzuckerspiegel, ungenügende Insulinsekretion. Meist entwickelt sich die Erkrankung schleichend. Vor dem Zeitpunkt der Diagnose des Typ 2 Diabetes besteht meist bereits eine langjährige Insulinresistenz. Diese Stoffwechselerkrankung manifestiert sich in der Regel erst jenseits des 40. Lebensjahres.

Die Patienten leiden beinahe immer gleichzeitig an Adipositas, androider (stammbetonter) Fettverteilung, Hypertonus und Hypertriglyzeridämie, wobei die Diagnose des Typ 2 Diabetes häufig zufällig bei einer Routineuntersuchung des Blutzuckers erfolgt. Da die Patienten meist noch eine relativ ausreichende Menge Insulin produzieren, entsteht eher selten die klassische Symptomatik des Typ 1 Diabetes. Nur gelegentlich treten akute Symptome wie Pruritus, Balanitis und nachlassende Libido auf. Häufiger stehen chronische Folgeerkrankungen wie Polyneuropathie und periphere arterielle Verschlusskrankheiten (pAVK) im klinischen Vordergrund (FRERCKS und RENZ-POLSTER 2001).

Tabelle 1: Einteilung des Diabetes mellitus nach Richtlinien der WHO 1997 aus THEWS et al. 1999

| Diabetestyp | ältere Bezeichnung |
|---|---|
| I. Typ-I-Diabetes A: immunologisch bedingt B: idiopathisch | juveniler Diabetes; insulinabhängiger Diabetes mellitus (IDDM); |
| II. Typ-II-Diabetes Typ IIa ohne Adipositas Typ IIb mit Adipositas | Altersdiabetes; nicht-insulinabhängiger Diabetes mellitus (NIDDM) |
| III. Andere spezifische Typen u.a. infolge von – genetischen Defekten, – Erkrankungen des exokrinen Pankreas, – Endokrinopathien, – Chemikalien- oder Arzneimittelwirkungen | |
| IV. Gestationsdiabetes (GDM) | Schwangerschaftsdiabetes |

2.1.2 Entstehung und Ursachen des Diabetes mellitus

Der Typ 1 und der Typ 2 Diabetes entwickeln sich in der Regel auf der Grundlage einer Disposition. Dennoch ist der Typ 1 Diabetes nur zum Teil genetisch bedingt und benötigt noch zusätzliche exogene Faktoren, um eine Autoimmunerkrankung auszulösen. Als mögliche Initiatoren des Prozesses werden Viren wie z.B. Cocksackie B4, Mumps, Röteln und Mononukleose vermutet (MÜLLER-WIELAND und KRONE 2000, LENNECKE 2003, STALLMACH et al. 2004).

Bei Typ 2 Diabetikern ist der genetische Anteil wesentlich ausgeprägter. Auch hier führen zusätzliche exogene Auslöser zur Manifestation der Erkrankung. Bisher ist der genaue pathogenetische Weg nicht bekannt. Es wird angenommen, dass eine Kombination von genetischen Faktoren bei gleichzeitigem Übergewicht, Fehlernährung und Bewegungsmangel zur Ausbildung des Typ 2 Diabetes führen. Charakteristisch sind Hyperglykämie, Hyperinsulinämie und Insulinresistenz von Fett-, Muskel- und Leberzellen. Zusätzlich ist die Glucosefreisetzung aus der Leber gesteigert (SETTER et al. 2003). Man geht davon aus, dass durch chronische Überernährung und Bewegungsmangel über lange Zeit vermehrt Insulin ausgeschüttet wird. Daraus resultiert schließlich eine Verminderung der peripheren Insulinrezeptoren (Insulinresistenz). Dieser Mechanismus wird besonders durch kalorienreiche Nahrung gefördert. Durch Bewegungsmangel kommt es zudem zu einer verminderten Insulin-unabhängigen Glucoseaufnahme in die Muskelzelle, was wiederum den Blutzucker erhöht. Lange Zeit können Hyperglykämie und Hyperinsulinämie nebeneinander vorliegen. Solange die β -Zellen die Mehrproduktion zu leisten imstande sind, bleibt die Stoffwechsellage normal. Nach Jahren kann sich schließlich eine Erschöpfung der β -Zellen und damit der Insulinsekretion einstellen und ein relativer Insulinmangel entstehen (FRERCKS und RENZ-POLSTER 2001). Die Insulinresistenz führt zu diversen metabolischen Störungen wie gesteigerte Lipolyse mit Triglyzerid-erhöhung, Stammfettsucht usw. Die Folge von chronischer Hyperglykämie, Hyperinsulinämie sind Arteriosklerose und Hypertonie und damit auch kardiovaskuläre Erkrankungen (ARODA und HENRY 2003). Dementsprechend bestehen häufig schon zum Zeitpunkt der Diagnose des Typ 2 Diabetes arteriosklerotische Gefäßveränderungen und Hypertonie.

Als Ursache für die Insulinresistenz werden auch ein Kinasedefekt der Insulinrezeptoren und eine Verminderung der sogenannten Glucosetransporter diskutiert (BROZINICK et al. 2003). Darüber hinaus können auch verschiedene Arzneimittel wie z.B. Glucocorticoide, Ovulationshemmer, Thyroxin usw. eine diabetogen Wirkung ausüben (LENNECKE 2003).

2.2 Therapie des Diabetes mellitus

2.2.1 Insulin

Aufgrund der nicht mehr vorhandenen β -Zellfunktion beim Typ 1 Diabetes ist eine Therapie mit Insulin notwendig. Beim Typ 2 Diabetiker können je nach Progredienz der Erkrankung orale Antidiabetika oder in fortgeschrittenen Fällen Insulin eingesetzt werden (LENNEKE et al. 2003). Insulin wird in den β -Zellen des Pankreas gebildet und gilt als das wichtigste Blutzucker-senkende Hormon im Körper. Als Peptidhormon besteht es aus einer A-Kette, die von 21 Aminosäuren gebildet wird und aus einer B-Kette mit 30 Aminosäuren. Beide Ketten sind über Disulfidbrücken miteinander verbunden (FRERCKS und RENZ-POLSTER 2001).

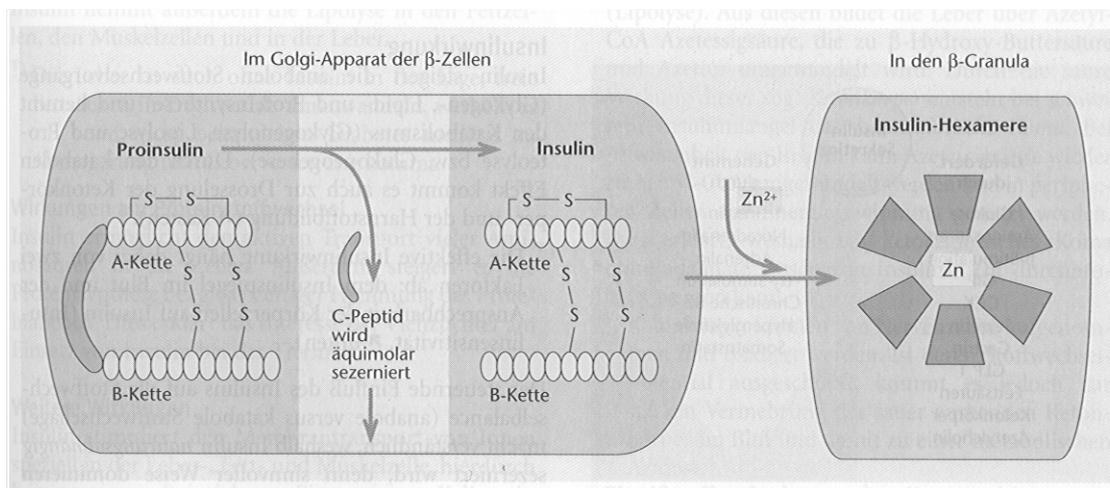


Abbildung 1: Biosynthese und Sekretion von Insulin. Gespeichertes Insulin bildet in den β -Granula Hexamere, die durch Zink stabilisiert werden. Erst bei der Exocytose gelangen die Insulinmoleküle einzeln in die Blutbahn (nach FRERCKS und RENZ-POLSTER 2001)

Die Insulinsekretion unterliegt einem direkten Rückkopplungsmechanismus über den Blutzuckerspiegel. Durch Anstieg der Glucose-Konzentration im Blut (Schwellenreiz ca. 90 mg/dl bzw. 5 mmol/l Glucose) erfolgt eine erste rasche Phase der Insulin-Freisetzung und anschließend eine zweite längeranhaltende Insulin-Freisetzung. Die Blutglucose ist das wichtigste Ziel für die Insulin-Regulation. Die Inselzellen unterscheiden sich von anderen Zellen dadurch, dass sie bei normalen Glucosekonzentrationen nur wenig ATP bilden, bei Hyperglykämie hingegen nutzen sie ihr Phosphorylierungspotential voll aus (HASSELBLATT und PANTEN 2001). Zusätzlich bewirken Erhöhungen der Plasmakonzentrationen verschiedener Aminosäuren (z. B. Arginin, Lysin), freier Fettsäuren und einiger gastrointestinaler Hormone (z.B. Gastrin, Sekretin, Cholecystokinin, usw.) eine Insulinausschüttung. Über das vegetative Nervensystem erfolgt eine Modulation der

Freisetzung. Durch parasympathischen Einfluss, bzw. Acetylcholin und Erregung sympathischer β_2 -Rezeptoren wird die Freisetzung gesteigert, durch Erregung sympathischer α_2 -Rezeptoren dagegen gehemmt (FRERCKS und RENZ-POLSTER 2001)

Mechanismus der Insulin-Freisetzung

Das Ausmaß der Insulin-Freisetzung hängt von verschiedenen Faktoren ab. Der Reiz für die Insulin-Freisetzung ist das Ansteigen der Glucose im Blut. Über ein Insulin-unabhängiges Glucosetransportprotein gelangt vermehrt Glucose in die Zelle. Infolge einer gesteigerten Glucoseoxidation in der β -Zelle kommt es zu vermehrter ATP-Bildung. Der Anstieg des ATP in der Zelle führt zum Schließen ATP-abhängiger K^+ -Kanäle und damit zur Hemmung des K^+ -Effluxes. Durch die verminderte Kaliumpermeabilität kommt es zur Depolarisation der Zellmembran. Letztere führt zur Öffnung Spannungs-abhängiger Ca^{2+} -Kanäle. Damit können Ca^{2+} -Ionen einströmen und den Exozytosevorgang von Insulin aus den Granula der Zellen auslösen. Über das cAMP-System und über Stoffwechselprodukte der Phospholipase C kann das Ausmaß der Freisetzung moduliert werden. Da Insulin die Lipidmembran der Zellen schlecht durchdringen kann, benötigen die Zellen, die auf Insulin reagieren, besondere Erkennungsstrukturen, sogenannte Insulinrezeptoren. Als Insulin-Rezeptor-Komplex wird Insulin in die Zelle aufgenommen, zum Teil abgebaut und beeinflusst aber auch die Glucoseaufnahme vor allem über den vermehrten Einbau von intrazellulären Glucosetransportern (Glut-4) in die Zellmembran insbesondere von Muskel- und Fettzellen. Der Insulin-abhängige Glucosetransport in die Zelle erfolgt über diese speziellen Glucose-Transporter (Glut-4) (KLIP und LEITER 1990, AMMON 1995, RANG et al. 2003b).

Außer Glut-4 besitzen Zellen noch mindestens vier weitere Glucosetransporter, aber diese funktionieren Insulin-unabhängig. Die Stoffwechselwirkungen des Insulin sind sehr vielfältig. Generell besitzt Insulin eine anabole Wirkung und fördert das Zellwachstum (LÖFFLER und PETRIDES 1998).

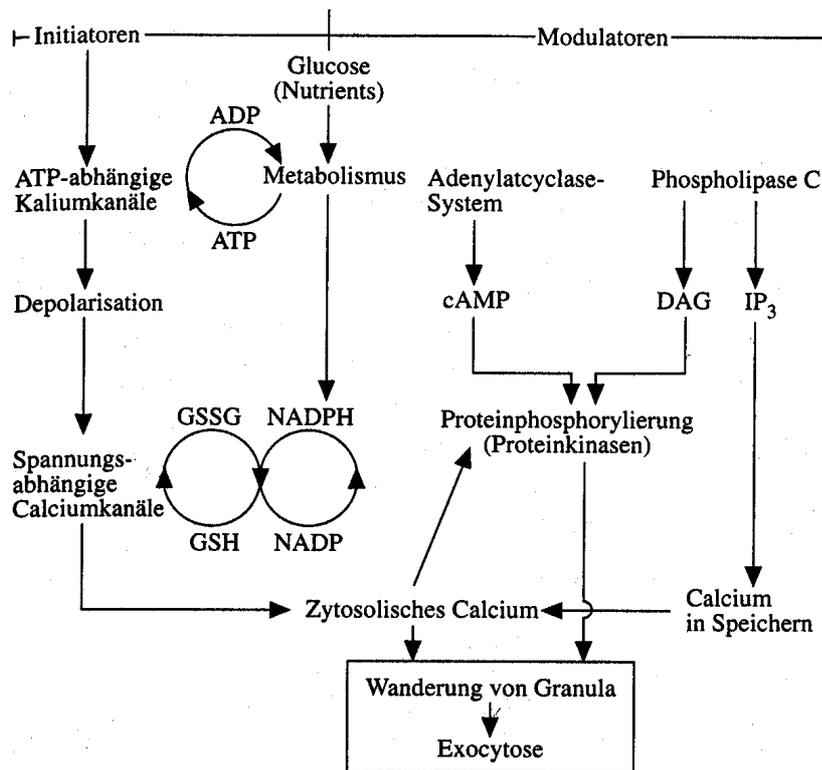


Abbildung 2: Darstellung der Insulin-Freisetzung aus den β -Zellen der Langerhansschen Inseln des Pankreas. Durch die Verstoffwechslung von Glucose und Aminosäuren steigen der intrazelluläre ATP/ADP-, NADPH/NADP- und GSH/GSSG-Quotient. Der Anstieg des ATP/ADP-Quotienten führt zu einer Hemmung des K^+ -Effluxes durch ATP-abhängige Kaliumkanäle. Diese Hemmung löst eine Depolarisation der Zellmembran aus, die zur Öffnung spannungsgeladener Calcium-Kanäle führt. Dadurch erfolgt ein starker Calcium-Einstrom in die Zelle, der als Voraussetzung für die Insulin-Freisetzung gesehen wird. Diese Calcium-Aufnahme wird durch reduziertes GSH erleichtert, für dessen Bildung NADPH notwendig ist. Neben diesem auslösenden Weg wird die Stärke der Insulin-Freisetzung über das cAMP-System und über Stoffwechselprodukte der Phospholipase C moduliert. GSH = Glutathion (reduziert), GSSG = Glutathion (oxidiert), DAG = Diacylglycerin, IP₃ = Inositoltriphosphat (nach AMMON 1995).

Einstellung eines funktionell optimalen Insulinspiegels

Beim diabetischen Patienten können durch optimale Einstellung des Blutzuckerwertes z.B. mit Hilfe von Insulin Spätschäden vermieden werden. Eine strenge Kontrolle der Blutzuckerwerte mit entsprechenden therapeutischen Maßnahmen wirkt sich auf die Manifestation diabetischer Spätschäden aus. Eine intensiviertere Insulinbehandlung (drei oder mehr Insulin-Injektionen täglich), gestützt auf häufige Blutzuckerbestimmungen erwies sich dabei als günstiger als die konventionelle Behandlung (1-2 Insulininjektionen täglich) (JÖRGENS und GRÜBER 1996). Durch diese intensive Behandlung konnten Häufigkeit und Schweregrad der diabetischen Retinopathien, Nephropathien, und Neuropathien um 76, 54 und 60 % gesenkt werden. Eine Insulineinstellung ist dann als ideal zu bezeichnen, wenn sich

die Glucose-Konzentration zwischen 70 und 160 mg/100 ml bewegt und gleichzeitig keine Glucosurie auftritt. Diese optimale Einstellung beinhaltet jedoch die Gefahr der Auslösung einer Hypoglykämie (JOOST 2001).

2.2.2 Orale Antidiabetika

Da beim Typ 2 Diabetes als wichtigste exogene Auslöser Überernährung und Bewegungsmangel zu nennen sind, stehen die Änderung der Lebens- und Essgewohnheiten an erster Stelle der Therapiemaßnahmen. Wenn aber eine diätetische Behandlung und konsequente Gewichtsreduktion allein nicht zum Erfolg führen, kann eine Therapie mit oralen Antidiabetika in Erwägung gezogen werden, die aber den Organismus nur dann unterstützen, wenn Insulin noch in ausreichenden Mengen produziert wird. Man unterscheidet folgende Gruppen von oralen Antidiabetika, eingeteilt nach ihren unterschiedlichen Wirkmechanismen (FRERCKS und RENZ-POLSTER 2001, LENNEKE 2003, RANG et al. 2003):

- Sulfonylharnstoff-Derivate
- Biguanide
- Glucosidase-Hemmer
- Thiazolidine

2.2.2.1 Sulfonylharnstoff-Derivate

Sulfonylharnstoffe bewirken über die Stimulation der Freisetzung von Insulin aus den β -Zellen eine Blutzuckersenkung. Diese Stoffgruppe beeinflusst die Insulin-Freisetzung aus β -Zellen ähnlich wie Glucose. Sie blockieren die ATP-abhängigen Kalium-Kanäle, die Zellmembran depolarisiert und dadurch werden Spannungs-abhängige Calcium-Kanäle aktiviert. Es erfolgt so eine Insulin-Freisetzung aus den Speichergranula. Der Mechanismus der Sulfonylharnstoffe wird durch Anwesenheit von hohen Glucosekonzentrationen begünstigt, läuft aber auch bei niedriger Glucosekonzentration ab. Ein Nachteil dieser Stoffgruppe kann sich aus der vermehrten Freisetzung von Insulin ergeben, die relativ unkontrolliert abläuft und deshalb zu schweren, langanhaltenden Hypoglykämien führen kann. Besonders häufig tritt dies bei älteren Menschen auf, die unregelmäßig essen. Da sich die Sulfonylharnstoff-induzierten Hypoglykämien sehr langsam entwickeln, können sie leicht übersehen werden. Zusätzlich begünstigend für die Entstehung einer Hypoglykämie wirkt sich die lange Verweildauer von bestimmten Sulfonylharnstoffen im Organismus aus. Wenn

Sulfonylharnstoffe Hypoglykämien erzeugen, wirken sie wiederum appetitanregend und fördern so die Gewichtszunahme der häufig schon übergewichtigen Patienten (FOSTER 1998).

Aus einer großangelegten Studie, Universal Group Diabetes Program UGDP, (SALSBURG 1971) in den USA liegen Ergebnisse vor, denen zufolge Patienten unter dem Sulfonylharnstoff Tolbutamid stärker infarktgefährdet sind als solche, die nur diätetisch behandelt werden. Auch in anderen Studien wird der Einfluss von Sulfonylharnstoffen auf das Herz-Kreislaufsystem nach wie vor kontrovers diskutiert (ENGLER und YELLON 1996, JOHNSON et al. 2002, RIVELINE et al. 2003).

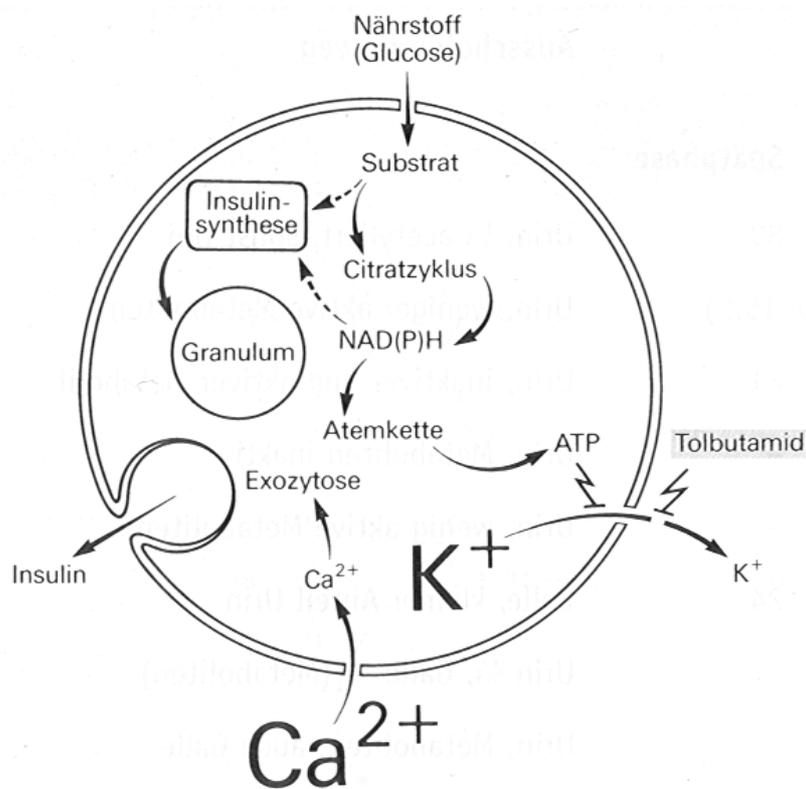


Abbildung 3: Stoffwechselweg der Insulinfreisetzung und der Wirkmechanismus von Sulfonylharnstoffen. Aus dem Stoffwechsel von Glucose oder bestimmten Aminosäuren wird Wasserstoff für die mitochondriale Atmungskette bereitgestellt. Dadurch kommt es zu einem ATP-Anstieg, der wiederum den K⁺-Ausstrom hemmt. Auf diese Weise wird das Membranpotential vermindert, bis die Spannungs-abhängigen Calcium-Kanäle aktiviert werden. Der Einstrom von Ca²⁺ löst die Insulinsekretion aus. Sulfonylharnstoffe blockieren den K⁺-Kanal ohne Umweg über den Energiestoffwechsel der Zelle (nach HASSELBLATT und PANTEN 2001)

2.2.2.2 Biguanide

Biguanide (Metformin) sind schon sehr lange als Blutzucker-senkende Medikamente im Einsatz. Im Gegensatz zu den Sulfonylharnstoffen fördern sie nicht die Insulinfreisetzung, sondern verzögern die Glucose-Aufnahme im Darm, reduzieren die hepatische Glucose-Abgabe, bzw. verbessern die Glucoseaufnahme in die Leber (JACKSON et al. 1986) und erhöhen die Glucose-Verwertung in Muskel- und Fettgewebe (DAVIDSON und PETERS 1997). Durch diese metabolischen Wirkungen wird der Insulinbedarf vermindert. Der genaue Mechanismus ist noch nicht vollständig bekannt. Durch Hemmung von Transportvorgängen der Atmungskette in der Mitochondrienmembran des Darmepithels beeinträchtigen sie den sekundär aktiven Transport von Glucose. In der Leber greifen sie in den Citratzyklus ein. Der anaerobe Glucoseabbau wird gesteigert und das bei der Glycolyse entstehende Pyruvat tritt nicht in den Citratzyklus ein, sondern wird zu Lactat reduziert. Da dieser Stoffwechselweg weniger Energie liefert, muss zwangsläufig mehr Glucose aus dem Blut in die Zelle aufgenommen werden (HASSELBLATT und PANTEN 2001). Zusätzlich beeinflussen Biguanide die freien Fettsäuren, deren erhöhte Konzentration mit einer Steigerung des kardiovaskulären Risikos verbunden ist. Für diesen Effekt und den Einfluss auf den Glucosestoffwechsel wird die Wirkung der Biguanide auf die AMP-aktivierte Proteinkinase verantwortlich gemacht (ZHOU et al. 2001).

Zu den häufigsten Nebenwirkungen der Biguanide gehören milde gastrointestinale Störungen wie Appetitlosigkeit, Erbrechen, und Diarrhoe (BAILEY 1992), die ihrerseits beim übergewichtigen Patienten zur Gewichtsreduktion beitragen können (LÜLLMANN und MOHR 1999). Die gefährlichste Nebenwirkung ist die Lactatacidose, die zu lebensbedrohlichen pH-Veränderungen in Gewebe und Blut führen kann. Allerdings kann durch genaues Einhalten der Verschreibungsvorschriften eine Lactatacidose in der Regel vermieden werden (KRENTZ et al. 1994).

2.2.2.3 Glucosidase-Hemmer

Das Enzym α -Glucosidase befindet sich im Bürstensaum des Darmepithels und spaltet die aus der Verdauung von Kohlenhydraten entstehende Disaccharide in Hexose-Moleküle auf. Glucosidase-Hemmer verhindern diesen Abbauschritt, verzögern bzw. vermindern so die Glucoseresorption und können als unterstützende Therapie des Typ 2 Diabetes verwendet werden. Acarbose ist der wohl bekannteste Glucosidase-Hemmer. Damit können postprandiale Blutzuckerspitzen abgeschwächt und indirekt der Insulinbedarf verringert

werden. Zusätzlich wurde ein positiver Einfluss auf die Entwicklung einer Hypertonie und die Insulinproduktion nachgewiesen (ROSENBAUM et al. 2002, HANEFELD et al. 2003). Allerdings können durch bakterielle Dickdarm-Fermentation von nicht vollständig abgebauten bzw. nicht resorbierten Kohlenhydraten Nebenwirkungen wie Blähungen, Flatulenzen, und Durchfall verursacht werden (RANG et al 2003).

2.2.2.4 Thiazolidine

Diese Stoffgruppe wurde 1997 aufgrund ihres Einflusses auf den Fettstoffwechsel entwickelt und zeigte überraschenderweise auch Blutzucker-senkende Wirkung.

Thiazolidine bewirken eine Aufhebung der Insulinresistenz durch Beeinflussung der Genexpression (sog. Insulin-Sensitizer), können aber wegen mangelnder Erfahrungen noch nicht endgültig bewertet werden. Durch Bindung an den Kern-Hormonrezeptor „peroxisome-proliferator-activated receptor γ “ (PPAR γ), der vor allem im Fettgewebe, aber auch im Muskel und in der Leber vorkommt, erhöhen sie die Insulin-Empfindlichkeit dieser Gewebe (PHILLIPS et al. 2001, RANG et al. 2003) durch Unterdrückung der Resistin Genexpression (WOLF 2004). Resistin, ein Fettgewebeshormon wirkt als Glucosehomöostase-Regulator und als physiologischer Insulin-Antagonist. Thiazolidine reduzieren wie Metformin (Biguanide) die Glucoseabgabe aus der Leber, erhöhen die Aufnahme von Glucose in die Muskelzelle und verbessern die Wirkung von Insulin (Insulinsensitivität). Die Triglyceridkonzentration kann vermindert werden, bei gleichbleibendem „low density lipoprotein“ (LDL) und „high density lipoprotein“ (HDL). Die auffälligsten Nebenwirkungen der Thiazolidine sind Ödeme, Gewichtszunahme, teilweise bedingt durch Flüssigkeitsansammlungen, Kopfschmerzen, Übelkeit und gastrointestinale Störungen. Troglitazon, eines der ersten Thiazolidine wurde aufgrund seiner Lebertoxizität wieder vom Markt genommen. Die neueren Medikamente wie Pioglitazon und Rosiglitazon sollen diese Nebenwirkung nicht aufweisen (LEBOVITZ et al. 2001, NESTO 2004).

2.3 Sekundärerkrankungen des Diabetes mellitus

Heutzutage sind Diagnose und Therapie des Diabetes mellitus so weit fortgeschritten, dass Patienten selten an lebensbedrohlichen, metabolischen Komplikationen wie Hyper- und Hypoglykämie leiden. Ein großes Problem stellen jedoch die vaskulären Veränderungen dar, die sich im Laufe der Erkrankung entwickeln (STEHOUWER et al. 1997, PUTTEMANS und NEMRY 1998, CALLES-ESCANDON und CIPOLLA 2001, TSILIBARY 2003). Verände-

rungen an den Blutgefäßen treten sowohl bei Diabetes Typ 1 als auch bei Typ 2 auf. Sie können sich individuell in sehr unterschiedlichem Ausmaß entwickeln und verursachen eine verminderte Lebensqualität, erhöhte Morbidität und Mortalität. Die Wahrscheinlichkeit Symptome zu entwickeln ist für Patienten, die seit 15 bis 20 Jahren an dieser Krankheit leiden, stark erhöht (FOSTER 1998). Demzufolge stellt Glucose nicht nur einen Nährstoff für den Organismus dar, sondern kann, wenn sie über einen längeren Zeitraum in hoher Konzentration (Hyperglykämie) im Gefäß vorliegt, Schädigungen unterschiedlicher Art besonders an den Endothelzellen bewirken. Daraus wiederum resultieren dann Mikro- und Makroangiopathien (HASSELBLATT und PANTEN 2001).

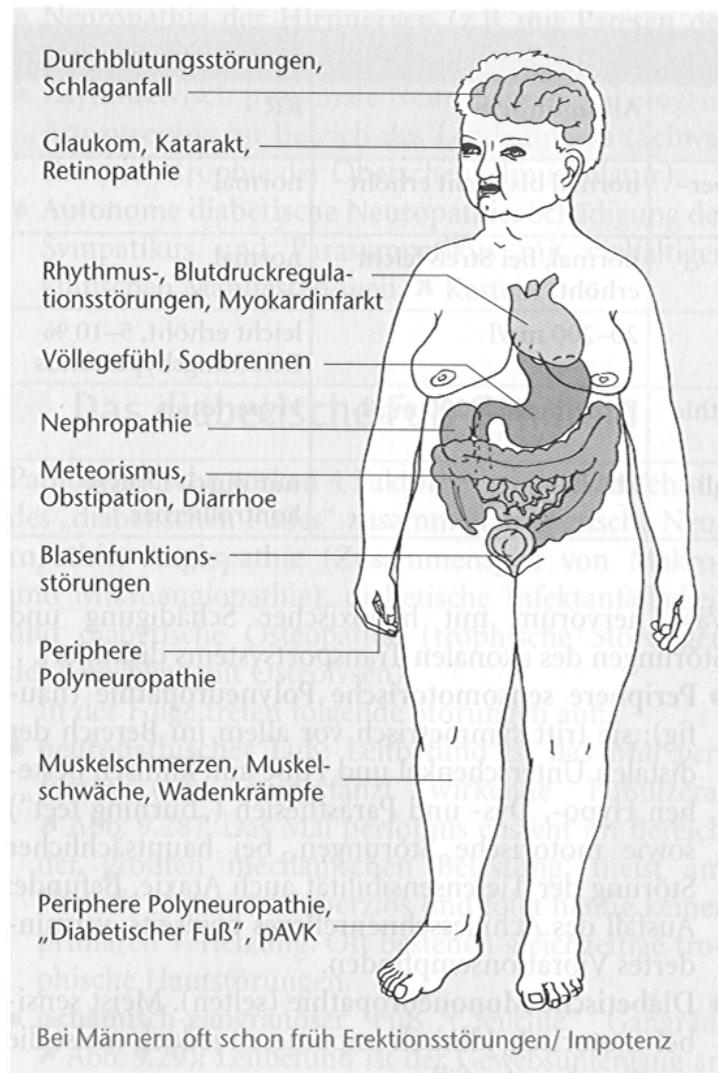


Abbildung 4: Überblick über die Sekundärerkrankungen, die im Laufe eines Diabetes mellitus entstehen können (nach FRERCKS und RENZ-POLSTER 2001)

2.3.1 Diabetische Angiopathien

Die Lebenserwartung und -qualität wird mittlerweile nicht mehr sehr häufig durch das diabetische Koma beeinträchtigt, sondern vor allem durch vaskuläre Veränderungen. Nur etwa 1 % der Diabetiker sterben im Koma, aber schätzungsweise 70 bis 80 % an vaskulären Komplikationen (WAHL 2001). Die diabetischen Angiopathien werden in **Mikro- und Makroangiopathien** unterteilt, wobei die Makroangiopathien häufiger zum Tod führen als Mikroangiopathien (UKPDS 1998).

2.3.1.1 Diabetische Mikroangiopathie

Glucose besitzt die Fähigkeit sich an Körperproteine zu binden. Es kommt dadurch zu einer nicht-enzymatischen Glycosylierung zahlreicher Proteine (Hämoglobin, Serumproteine, Lipoproteine usw.) und Erythrozyten. Durch diese Bindung entstehen sogenannte „advanced glycosylated end products“ (AGE-Produkte) mit entsprechend veränderter Funktion (BROWNLEE 1992, PEPPA et al. 2003). Die Folgen einer längerandauernden diabetischen Stoffwechsellage bzw. einer schlechten Glucoseeinstellung sind Verdickung und qualitative Veränderungen der Basalmembran der kleinen Gefäße und ein gestörter Sauerstofftransport der Erythrozyten. Zusätzlich bewirkt eine Hyperglykämie veränderte Fließeigenschaften des Blutes, eine übermäßige Sorbitbildung in verschiedenen Zellsystemen, Störungen der Hämostase und das vermehrte Auftreten von Wachstumsfaktoren. Die Sorbitbildung erfolgt über den Polyol-Weg, bei dem Glucose durch eine Aldol-Reduktase zu Sorbitol reduziert wird. Sorbitol wiederum wirkt gewebstoxisch und ist maßgeblich beteiligt an der Entstehung von Retinopathie, Neuropathie, Katarakt, Nephropathie und Erkrankungen der Aorta (WAHLBERG et al. 2000, PANNIRSELVAM et al. 2003).

Bei der diabetischen Mikroangiopathie sind grundsätzlich alle Kapillargebiete betroffen, zu Störungen kommt es aber in erster Linie im Bereich der Netzhaut und der Niere.

Mikroangiopathien in der Netzhaut können eine Netzhautablösung verursachen und schlimmstenfalls zum Erblinden führen (diabetische Retinopathie). An der Niere kommt es zu Funktionsstörungen, die sich bis zur Manifestation einer Niereninsuffizienz ausweiten können (diabetische Nephropathie). Eine weitere Spätfolge der Mikroangiopathie ist die diabetische Polyneuropathie, die Funktionsstörungen von sensiblen und vegetativen Nerven bewirkt und damit unter anderem für den sogenannten diabetischen Fuß verantwortlich ist (WAHL 2001).

Diabetische Retinopathie

Die diabetische Retinopathie und das diabetische Macula-Ödem gelten als Hauptursache für eine Erblindung in der westlichen Welt. Die Entwicklung der Retinopathie steht in engem Zusammenhang mit der Diabetesdauer und dem Alter des Erkrankten. Ab einer Diabetesdauer von über 20 Jahren sind statistisch 80 bis 90 % der Diabetiker von Retinopathie betroffen. Es kommt aber nicht zwangsläufig zu einer Erblindung (CIULLA et al. 2003).

Die Retinopathie wird in 3 Stadien eingeteilt (WAHL 2001):

Stadium I

Vasodilatation, kapilläre Schängelung und vereinzelte Mikroaneurysmen, Mikrogefäßverschlüsse und Permeabilitätsstörungen der Gefäße

Stadium II

Retinale Blutungen, harte und weiche Exsudate sowie degenerierte und nicht mehr perfundierte Areale in der Netzhaut.

Stadium III

Proliferative Retinopathie:

Präretinale Neovaskularisationen, die zu Glaskörperblutungen und zur Bildung fibrogliöser Narben führen können.

Blutungen, Narbenbildung und traktionsbedingte Netzhautablösung können schließlich eine Erblindung verursachen. Die proliferative schwere Form der diabetischen Retinopathie entwickelt sich bei ca. 20 % der Patienten (WAHL 2001).

Pathogenese der diabetischen Retinopathie

Studien am Menschen und im Tiermodell belegen, dass chronische Hyperglykämie und Hyperlipidämie zur Entstehung der Retinopathie beitragen. Charakteristisch für die diabetische Retinopathie sind Mikroaneurysmen, zerstörte Perizyten („ghost pericytes“) und Verdickungen der Basalmembran der Kapillaren, wahrscheinlich als Folge der andauernden Hyperglykämie (KERN und EGERMAN 2001, TANG et al. 2003).

In den meisten Fällen von Retinopathie liegen Verschlüsse der Kapillaren, minderdurchblutete und gefäßlose Anteile der Netzhaut vor (OHTA et al. 1999).

Über die genauen biochemischen Mechanismen, die zur Retinopathie führen, ist bisher nur wenig bekannt. Erstes Anzeichen für die Entwicklung einer Retinopathie stellen Veränderungen der Struktur und der Zellen der kleinen Gefäße dar. Endothelzellen, deren Aufgabe darin besteht, die retinale Blutschranke aufrechtzuerhalten, werden verletzt bzw. zerstört, was zum Ansteigen der Gefäßpermeabilität führt. Wenn die innere retinale Blutschranke zusammenbricht, kommt es zu einer Ansammlung von Flüssigkeit in der Macula (CIULLA et al. 2003). Auch die Zerstörung der Perizyten, die ebenfalls an der Regulation der Kapillarpermeabilität beteiligt sind, führt zu veränderten hämodynamischen Verhältnissen in der Retina.

Der Verlust dieser Zellen geht zumeist mit Mikroaneurysmen einher. Zusätzlich verdickt sich die Basalmembran der Kapillaren und sehr häufig können extrazelluläre Ablagerungen gefunden werden. Auch diese Veränderungen führen wiederum zu Permeabilitätsstörungen und abnormem Blutfluss. Eine weitere mögliche Ursache für die Entwicklung der Retinopathie ist die Leukostase. Leukozyten, neutrophile Granulozyten sowie Monozyten sind Zellen mit großem Zellvolumen. Sie besitzen eine natürliche Affinität zum Endothel und lagern sich bei Diabetikern vermehrt an. Zusätzlich erzeugen sie toxische Superoxid-Radikale und proteolytische Enzyme. Diese Radikale und Enzyme verursachen Verletzungen an der Endothelzellmembran (PÉCSVARÁDY et al. 1994, MIYAMOTO und OGURA 1999).

Auch tritt bei Diabetikern eine erhöhte retinale Leukostase auf, welche sowohl die Funktion des Endothels als auch die Durchlässigkeit der Retina, die Angiogenese und die Gefäßpermeabilität beeinträchtigt (CIULLA et al. 2003).

Darüber hinaus neigen Leukozyten bei Diabetikern dazu, weniger gute Verformbarkeit zu besitzen (PÉCSVARÁDY et al. 1994) und sich zu Konglomeraten zusammenzulagern, welche die Kapillaren verschließen. Als Folge dieser Verschlüsse und der daraus entstehenden Ischämie wird eine Neovaskularisation angeregt. Die neugebildeten Gefäße sind häufig weniger stabil und es kommt sehr viel schneller zu Verletzungen und zu Blutungen in den Glaskörper. So entsteht die proliferative diabetische Retinopathie. Zusätzlich zu den Schäden, die durch veränderte Leukozyten verursacht werden, kann meist auch eine vermehrte Anlagerung von Erythrozyten und Blutplättchen beobachtet werden, die bei der Entwicklung der Retinopathie von Bedeutung ist (CIULLA et al. 2003).

Diabetische Nephropathie

Nierenerkrankungen sind eine der Haupttodesursachen bei Diabetikern, und führen zu starken Einschränkungen der Lebensqualität der Patienten. Das Risiko für die Entstehung einer Nierenerkrankung steigt mit der Dauer der Krankheit. Nach 20 Jahren ist bei 20 bis 30 % der insulinpflichtigen Diabetiker eine Erkrankung der Niere diagnostizierbar (CHRYSANTHUS CHUKWUMA 1995). Die Manifestation einer Nephropathie scheint zusätzlich vom ethnischen Hintergrund abhängig zu sein. Beispielsweise zeigen Pima-Indianer in den USA die höchste Neigung zur Ausbildung einer Nephropathie, Europäer dagegen die niedrigste (FOSTER 1998). Zusätzlich können auch andere genetische Faktoren von Bedeutung sein (SEAQUIST et al. 1989).

Pathogenese der diabetischen Nephropathie

Wie schon bei der Retinopathie wird auch bei der diabetischen Nephropathie als mögliche Ursache eine langjährige Hyperglykämie bei schlechter Blutzuckereinstellung vermutet. Sie trägt zur Entstehung einer Mikroangiopathie bei, die in einer Glomerulosklerose der Nierenkapillaren endet. Zusätzlich gibt es verschiedene andere pathologische Mechanismen, die Schädigungen an den Glomerula verursachen können. Unter Glomerulosklerose versteht man eine Verdickung der glomerulären Extrazellulärschicht, vor allem bedingt durch Auflagerungen von Kollagen Typ IV, Laminin und Fibronectin, das die Mesangium-Zellen synthetisieren. Diese Zellen werden zum einen direkt durch eine hohe Glucosekonzentration zur Synthese aktiviert, zum anderen stimulieren sie auch die aus Makrophagen stammenden Cytokine und Wachstumsfaktoren (AYO et al. 1990, SASSY-PRIGENT et al. 2000). Man unterscheidet zwei pathologische Formen der Mikroangiopathie an den Nierenkapillaren, die diffuse und die noduläre Glomerulosklerose (Kimmelstiel-Wilson-Syndrom), die getrennt oder gemeinsam auftreten können. Die erste Form zeigt eine Verdickung der glomerulären Basalmembran in Verbindung mit einer Ausweitung des Mesangiums. Die noduläre Glomerulosklerose geht dagegen mit sich diffus ausbreitenden Schäden einher (CHRYSANTHUS CHUKWUMA 1995). Besonders charakteristisch sind hierbei die Hyalinisierung der aufsteigenden glomerulären Arteriolen und die Kimmelstiel-Wilson-Knötchen (FOSTER 1998). Klinisch entwickelt sich die diabetische Nephropathie meist schleichend ohne Symptome über 10 bis 15 Jahre hinweg. Zum Zeitpunkt der Diagnose stellen sich die Nieren häufig vergrößert dar und weisen eine erhöhte glomeruläre Filtrationsrate auf. Die Patienten sind in diesem Stadium noch symptomlos. Bei Fortschreiten entsteht eine beginnende Nephropathie mit Mikroalbuminurie. Eine Mikroalbuminurie ist oft das erste klinische Anzeichen einer diabetischen

Glomerulosklerose. Mit zunehmendem Fortschreiten der Krankheit kommt es zu einer Makroproteinurie, zu einer abnehmenden glomerulären Filtrationsrate sowie einem verminderten renalen Plasmafluss und dann zu einer klinisch manifesten Nephropathie. Diese kann dann im weiteren Verlauf in eine Niereninsuffizienz übergehen (WAHL 2001).

Tabelle 2: Verschiedene Stadien der diabetischen Nephropathie in Abhängigkeit von der Dauer der Erkrankung (nach WAHL 2001)

| Stadium | Diabetesdauer (Jahre) | Befunde |
|--|------------------------------|---|
| I Hypertrophie-Hyperfunktionsstadium | 0-2 | große Nieren, GFR und RPF erhöht |
| II histologische Veränderungen ohne klinische Symptome | 2-5 | Verdickung der kapillaren Basalmembran, Ausweitung des Mesangiums |
| III beginnende Nephropathie | 5-15 | Mikroalbuminurie (30-300 mg/d), Anstieg des Blutdrucks |
| IV klinisch manifeste Nephropathie | 10-25 | persistierende Proteinurie, GFR und RPF abnehmend, Hypertonie ca. 60% |
| V Niereninsuffizienz | 15-30 | Serumkreatinin erhöht, Hypertonie ca. 90% |

GFR = glomeruläre Filtrationsrate
RPF = renaler Plasmafluß

Diabetische Polyneuropathie

Die diabetische Polyneuropathie umfasst chronische Störungen an motorischen, sensiblen und autonomen Nerven. Je länger die Krankheit besteht, desto höher wird das Risiko für das Auftreten einer diabetischen Polyneuropathie (PARTANEN et al. 1995). Besonders weit verbreitet unter Diabetikern, die mehr als 10 Jahre erkrankt sind, ist die periphere sensomotorische Polyneuropathie. Diese tritt symmetrisch meist an den distalen Unterschenkeln und Füßen auf. Als Symptome werden brennende Schmerzen in den unteren Extremitäten, Wadenkrämpfe, Taubheitsgefühl, Kribbeln, Ameisenlaufen und Kältegefühl beschrieben. Es bestehen Hypo-, Dys- und Parästhesien. Zusätzlich kann ein vermindertes Vibrationsempfinden auftreten. Typischerweise nehmen die Beschwerden nachts zu (FOSTER 1998). Bei der

asymmetrischen, motorischen Neuropathie treten Schwäche, Atrophie und Schmerzen im Bereich der Oberschenkel und der Beckenmuskulatur auf (WAHL 2001, LENNEKE et al. 2003). Diabetische Mononeuropathien sind selten, sind aber durch ihre Ausfallserscheinungen gut erkennbar. Zum einen können einzelne Gehirnnerven (N. facialis, N. oculomotorius) oder periphere Nerven wie der N. medianus und der N. peroneus betroffen sein. Klinisch äußert sich die Mononeuropathie als Parese (FRERCKS und RENZ-POLSTER 2001).

Die autonome diabetische Neuropathie kann grundsätzlich das gesamte vegetative Nervensystem beeinträchtigen. Die einzelnen Organe können jedoch unterschiedlich stark betroffen sein. Meist zeigen sich Symptome erst lange Zeit nach dem Auftreten des Diabetes mellitus. Frühe Symptome sind beispielsweise trockene Haut, Verlust der Schweißbildung, Entwicklung von Fissuren, in denen sich Mikroorganismen ansiedeln (VINIK et al. 2003).

Tabelle 3: Folgen der diabetischen autonomen Neuropathie
(nach FRERCKS und RENZ-POLSTER 2001)

| Folgen der diabetischen autonomen Neuropathie | |
|---|--|
| <p><u>Herz:</u> (Vagusschädigung): Ruhetachykardie, fehlende Frequenzvariation bis hin zur „Frequenzstarre“</p> <p><u>Gefäßsystem:</u> Gefäßdilatation durch „Autosympathektomie“ besonders an den Füßen sowie asympathikotone orthostatische Hypotonie</p> <p><u>Gastrointestinaltrakt:</u> (diabetische Enteropathie): Motilitätsstörung durch Schädigung des Parasymphikus</p> <ul style="list-style-type: none"> • Ösophagus: Dysphagie • Magen: Entleerungsstörung (Gastroparese) mit sekundärem gastroösophagealem Reflux, Störung der Sekretion von Magensäure und Pankreasenzymen (Folge: Dyspepsie). • Darm: Veränderte Motilität (Obstipation/Diarrhöe im Wechsel) | <p><u>Urogenitaltrakt:</u> Miktionsbeschwerden, durch Parasympathikusschädigung atone Blase, eventuell mit Restharnbildung (Infektionsgefahr), erektile Impotenz</p> <p><u>Haut:</u> Sistieren der Schweißproduktion, Atrophie der Haut durch veränderte Gefäßversorgung</p> <p><u>Knochen:</u> Aseptische Osteolysen mit herabgesetzter Stabilität und „zusammengebrochenem“ Fußgewölbe (Charcot-Fuß).</p> |

Pathogenese der diabetischen Polyneuropathie

Für die Entstehung einer Neuropathie werden verschiedene Faktoren in Erwägung gezogen. Grundsätzlich geht man davon aus, dass in erster Linie metabolische Störungen eine Rolle spielen, die zu einer reduzierten Versorgung der Nervenscheiden und zu einer endoneuronalen Hypoxie führen (CAMERON et al. 2003). Zum einen kommt es, bedingt durch metabolische Veränderungen, zu einer Anhäufung von Sorbit in den Schwannschen Zellen zum anderen werden Myoinositolmangel und Glycosilierung von Myelinproteinen diskutiert. Außerdem können auch Mikroangiopathien der Vasa nervorum mit hypoxischer Schädigung und Störung des axonalen Transportes festgestellt werden. Eine Studie von THRAINSDOTTIR et al. (2003) zeigt, dass sowohl bei Patienten mit Typ 2 Diabetes als auch bei Patienten mit reduzierter Glucosetoleranz und peripherer Neuropathie eine Verminderung der myelinisierten Nervenfasern auftritt. Metabolische und vaskuläre Faktoren sind gleichermaßen für die Pathogenese verantwortlich. Da Diabetiker ohne klinische Symptome einer Neuropathie häufig endoneurale Mikroangiopathien zeigen, kann angenommen werden, dass die Mikroangiopathie der peripheren Neuropathie vorausgeht, bzw. diese einleitet (THRAINSDOTTIR et al. 2003).

Das Diabetische Fuß-Syndrom

Ein besonderes Problem bei diabetischen Patienten ist die Entwicklung von Geschwüren und Gangrän, die vor allem an den unteren Extremitäten entstehen.

Folgende Störungen können auftreten:

Neuropathischer Fuß

Es entsteht das sogenannte „Mal perforans“, darunter ist ein wie ausgestanzt wirkendes Fußulcus zu verstehen. Es tritt besonders an mechanisch stark belasteten Bereichen wie an Groß- und Kleinzehenballen auf und ist meist schmerzlos und trocken (WAHL 2001).

Ischämisch-gangränöser Fuß

Diese Form ist durch feuchte Gangrän gekennzeichnet, die sich meist an Druckstellen bzw. im Bereich starker Verhornung wie den Fersenballen und den Zehenspitzen manifestiert. Diese Verletzungen sind in der Regel schmerzhaft (WAHL 2001).

Pathogenese des diabetischen Fuß-Syndrom

An der Entstehung des diabetischen Fußes wirken verschiedene Faktoren zusammen. Stehen Mikro- und Makroangiopathie als Ursache im Vordergrund, kann der Fußpuls nicht mehr getastet werden. Man spricht dann von einem angiopathischen Fuß. Im Gegensatz dazu wird der sogenannte neuropathische Fuß vorwiegend durch eine vorangegangene Neuropathie ausgelöst. Typisch für diese Erscheinungsform (neuropathischer Fuß) ist die Schmerzlosigkeit der Läsionen und der gut tastbare Fußpuls. Geringe lokale Traumen bzw. Druckstellen oder Schwielen an den Extremitäten (verursacht z.B. durch drückendes Schuhwerk, Fußpilz, Fremdkörper usw.) werden aufgrund der Schmerzunempfindlichkeit der Patienten nicht bemerkt und können sich zu schwerwiegenden Läsionen entwickeln. Zusätzlich besteht immer die Gefahr einer Infektion mit verschiedensten Erregern. Die Verletzungen erreichen oftmals ein so starkes Ausmaß, dass nur noch eine Amputation des Fußes den Patienten retten kann (MÜLLER-WIELAND und KRONE 2000).

2.3.1.2 Diabetische Makroangiopathie

Veränderungen an großen und mittleren Gefäßen bezeichnet man als Makroangiopathien. Bei den Veränderungen handelt es sich vor allem um Arteriosklerose und Thrombembolien. Als die häufigste bei Diabetikern (besonders Typ 2) auftretende Komplikation gilt die Arteriosklerose (STEHOUSER 1997, UKPDS 1998, LAIGHT et al. 1999). Die pathologischen Veränderungen der Makroangiopathie sind nicht diabetesspezifisch aber diabetestypisch. Im Gegensatz zu Nicht-Diabetikern tritt jedoch die Arteriosklerose häufiger und schwerer auf. Durch die diabetische Stoffwechsellage werden bestimmte pro-atherogene Mediatoren freigesetzt, die den Prozess der Arteriosklerose zusätzlich beschleunigen. Daher werden auch die glycosilierten Endprodukte (vgl. Mikroangiopathie) für die Entstehung von Gefäßläsionen und einer damit verbundenen Entstehung von Arteriosklerose verantwortlich gemacht (PARK et al. 1998). Die Arteriosklerose beginnt meist in einem früheren Alter als beim Nicht-Diabetiker und betrifft die peripheren Arterien, besonders die Koronar-, Becken- und Zerebralarterien. Über 65 % aller Diabetiker sterben an koronarer Herzerkrankung und am Schlaganfall. Bei Typ 2 Diabetikern handelt es sich zumeist um ältere Menschen, die eventuell schon an Hypertension, Adipositas (bzw. Hyperlipidämie) und Hyperinsulinämie leiden und dadurch ein noch größeres Risiko tragen (LAIGHT et al. 1999, MÜLLER-WIELAND und KRONE 2000, WAHL 2001, SOWERS 2004).

Lebensqualität und -erwartung der Diabetiker sind heutzutage vor allem von den vaskulären Komplikationen abhängig. Als Todesursache wird nur bei 1 % der an Diabetes erkrankten

Patienten eine Stoffwechsellage genannt, wohingegen 70 bis 80 % der Diabetiker an den vaskulären Komplikationen sterben (WAHL 2001).

Je nach Typ des Diabetes stehen die verschiedenen Gefäßerkrankungen im Vordergrund.

Typ 1 Diabetiker sind häufiger von mikroangiopathischen Veränderungen wie Glomerulosklerose, Retinopathie, Neuropathie und Gangrän betroffen. Beim Typ 2 Diabetiker manifestieren sich eher makroangiopathische Komplikationen wie koronare Herzerkrankung und zerebrovaskuläre Schädigung (FRECKS und RENZ-POLSTER 2001).

Pathogenese der Makroangiopathien

Auch wenn die typischen Risikofaktoren wie Hypertension, Hyperlipidämie und Übergewicht reduziert werden, sind Diabetiker immer noch stark gefährdet, arteriosklerotische Gefäßerkrankungen zu entwickeln. Auch bei extrem häufiger Blutzuckerkontrolle und sehr guter Blutzuckereinstellung kann es zur Manifestation von Makroangiopathien kommen.

Wie schon bei der Mikroangiopathie beschrieben, führt die längerandauernde Hyperglykämie zu einer nichtenzymatischen Glykosilierung und Oxidation von Proteinen. Durch die vorherrschende Stoffwechsellage der Hyperlipidämie können vor allem Lipoproteine glykosiliert werden (PARK et al. 1998). Es entstehen glykosilierte Produkte (advanced glycosylated endproducts; AGE), die maßgeblich an den Verletzungen des Endothels beteiligt sind. Zusätzlich begünstigt auch oxidiertes „low density lipoprotein“ (LDL) die Arteriosklerose. Im Tierexperiment ist die Oxidation von LDL beschleunigt (FOSTER 1998). Entscheidend ist auch das Verhältnis von HDL zu LDL. Ein niedriges HDL/LDL Verhältnis unterstützt die Entwicklung der Arteriosklerose wahrscheinlich vor allem deshalb, weil der Rücktransport des Cholesterols aus den Arterien zur Leber vermindert stattfindet.

Andere Ursachen für eine Makroangiopathie sind das vermehrte Anhaften der Blutplättchen, die gesteigerte Endothelin-Sekretion bei gleichzeitig verminderter Stickoxid- (NO-) Bildung. Endothelin besitzt eine stark vasokonstriktorische Wirkung am glatten Muskel, wohingegen NO vasodilatierend wirkt und die Plättchen-Adhäsion verhindert (FOSTER 1998).

Im Vordergrund der pathologischen Auswirkungen der diabetischen Stoffwechsellage stehen eine proliferative Wirkung auf die glatten Muskelzellen in den Arterien und die zunehmende Entgleisungen des Fettstoffwechsels. Störungen in den Arterien treten als arteriosklerotische Stenosen und/oder ulceröse Plaques z.B. in den Karotiden auf. Zusätzlich können auch thrombembolische Vorgänge zum Gefäßverschluss führen. Dies führt schließlich zu chronischen Gefäßverengungen und zur Entstehung von Bluthochdruck. Des Weiteren kommt es zu koronaren Herzerkrankungen und zu zerebralen und anderen Durchblutungsstörungen. Aus

diesem Grund stellen Myokardinfarkte bei Diabetikern eine der häufigsten Todesursachen dar. Diese sind besonders gefährlich, weil sie oft stumm ablaufen, wobei die warnenden Anzeichen einer Angina pectoris fehlen (BELL 2003, TABIBIAZAR und EDELMAN 2003).

2.4 Diabetes mellitus beim Tier

Wie beim Menschen ist auch beim Tier der Diabetes mellitus eine verbreitete Krankheit. In den letzten Jahren stieg die Zahl der als Diabetiker diagnostizierten Hunde und Katzen an. Nach Schätzungen werden etwa 1 aus 500 bis 1 aus 100 Hunden und Katzen jährlich in der tierärztlichen Praxis mit Diabetes mellitus vorgestellt (NELSON 2000). Als mögliche Ursachen werden wie beim Menschen Überernährung und Bewegungsmangel vermutet. Weitere Risikofaktoren stellen Alter, männliches Geschlecht, Kastration und Adipositas dar. Ein möglicher Grund für ein erhöhtes Risiko mit zunehmendem Alter ist eventuell eine altersbedingte Abnahme der β -Zellfunktion, was dann zu erhöhter Empfindlichkeit gegenüber diabetogenen Faktoren führen kann. Beim Hund gelten auch einige Rassen, wie Keeshund, Alaskan Malamute, Zwergschnauzer, Zwergpudel und Englischer Springer Spaniel als prädisponiert für Diabetes mellitus (HOENIG 2002). In der Katzenpopulation besteht besonders für Burma-Rassekatzen ein erhöhtes Risiko an Diabetes mellitus zu erkranken (RAND et al. 2004).

Die Einteilung der Diabetes-Typen orientiert sich an der des Menschen. Typ 1 Diabetes geht häufig mit einer autoimmunvermittelten Zerstörung der β -Zellen einher und daraus resultiert eine starke Reduktion oder ein völliges Sistieren der Insulinproduktion. Diese Form tritt bei der Mehrzahl aller Hunde und nur bei 50 % der Katzen auf. Im Gegensatz dazu findet man den Typ 2 Diabetes bei 30 bis 50 % der vorgestellten Katzen (NELSON 2000). Typ 2 Diabetes zeichnet sich sowohl durch periphere Insulinresistenz als auch durch eine beeinträchtigte Insulinsekretion aus (APPELTON et al. 2001). Die typische diabetische Katze (Typ 2 Diabetes) ist adipös, in mittlerem Alter (9 bis 13 Jahre) und weist eine verminderte, aber noch vorhandene Insulinsekretion auf (APPELTON et al. 2001, BRIAN 2002).

Die typischen klinischen Symptome der an Diabetes mellitus erkrankten Tiere sind Polyurie, Polydipsie und Polyphagie, wobei Katzen, die an Typ 2 Diabetes erkrankt sind, oft Anorexie statt Polyphagie zeigen. Wie auch für den Menschen beschrieben, treten zusätzlich bzw. bedingt durch den chronischen Verlauf der Krankheit Spätfolgen bzw. Sekundärerkrankungen bei den Patienten auf. Beim Hund zeigt sich vermehrt Blindheit, bedingt durch Katarakt,

sowie chronische Pankreatitis. Außerdem kommt es zu rezidivierenden Infektionen des Harntraktes, des Atmungsapparates und der Haut. Die Katarakt stellt die häufigste Sekundärerkrankung dar und ist oft der Grund, warum die Tiere in der Praxis vorgestellt werden. Die Ursache wird in einem gestörten Glucosemetabolismus vermutet, durch den besonders viel Sorbitol entsteht, das sich in der Linse anlagert und Flüssigkeit nach sich zieht. Dadurch kommt es zum Anschwellen der Linse, zur Ruptur der Linsenfaser und der Entwicklung einer Katarakt. Der Vorgang ist irreversibel, die Entwicklung kann aber durch optimale Blutzuckereinstellung verlangsamt werden. Die diabetische Retinopathie tritt wesentlich weniger häufig als beim Menschen auf. Diabetische Neuropathien treten beim Hund nur sehr selten in Erscheinung, zeigen sich aber häufiger bei der Katze. Die Symptome manifestieren sich zumeist an den Hintergliedmaßen und gehen mit Schwäche, Muskelatrophie sowie plantigradem Gang einher. Bei der diabetisch bedingten Nephropathie, die vor allem bei der Katze auftritt, kommt es zu vergleichbaren Veränderungen an der Niere wie beim Menschen. Abhängig von der Dauer der Erkrankung und der Blutzuckereinstellung können Glomerulonephropathie, Verdickung der glomerulären und tubulären Basalmembran bzw. glomeruläre Fibrose und Sclerose auftreten (NELSON 2000).

Die Therapie des Diabetes erfolgt beim Hund fast ausschließlich mit Insulin. Bei der Katze wird im Fall eines Typ 2 Diabetes mit ausreichender Insulinsekretion auch mit oralen Antidiabetika behandelt, wobei v.a. Sulfonylharnstoff-Derivate zum Einsatz kommen (NELSON 2000).

2.5 Hintonia-latiflora-Extrakt als Phytotherapeutikum

Die moderne medikamentöse Therapie basiert vor allem auf den Grundlagen naturwissenschaftlicher Forschungsmethoden und –ergebnisse. Die eigentlichen Wurzeln der Therapie liegen aber Jahrtausende zurück. Arzneipflanzen wurden schon in der Volksmedizin der jeweiligen Ursprungsländer als Arzneien genutzt und werden heute sozusagen wiederentdeckt. Auf dem Gebiet der Phytotherapie begegnen sich rationale Medizin und traditionelle Erfahrungsheilkunde. Vor allem in den letzten Jahren wurden weltweit neuartige Substanzen in einer Reihe verschiedener Pflanzen entdeckt und dementsprechend überlieferte Arzneipflanzenanwendungen mit modernen Methoden überprüft. Mit Hilfe neuer technischer Methoden ist es heute möglich, bestimmte Wirkstoffe zu isolieren und exakte Bestimmungen von Inhaltsstoffen durchzuführen. Unter Phytopharmaka sind Arzneimittel zu verstehen, bei denen Pflanzen, Pflanzenteile bzw. -zubereitungen oder Pflanzeninhaltsstoffe therapeutisch ange-

wendet werden. Für den Wirksamkeitsnachweis werden die selben Methoden wie bei chemisch-synthetischen Arzneien verwendet (HÄNSEL 1991).

2.5.1 *Hintonia latiflora*

Hintonia latiflora ist ursprünglich auch unter der Bezeichnung *Coutarea latiflora* oder Copalchi bekannt. In den jeweiligen Ländern gibt es noch eine Reihe volkstümlicher Bezeichnungen. Die aus Mexiko stammende Copalchi-Rinde wurde zu Beginn des 19. Jahrhunderts in Mitteleuropa eingeführt. Etwa 1817 gelangte die sogenannte Copalchi-Rinde erstmals nach Deutschland (Hamburg). Zu dieser Zeit wurden vor allem einige Arten der Gattung *Croton* (Fam. Euphorbiaceae) unter dem Namen Copalchi-Rinde zusammengefasst. Ab 1868 wurden erstmals auch Rubiaceen der Gattung *Hintonia* und *Exostema* zu den Copalchi-Rinden-liefernden Stammpflanzen gezählt (REHER 1982, NOSTER 1992).

2.5.1.1 Botanik

Hintonia latiflora gehört zur Familie der Rubiaceae. Diese Familie umfasst annähernd 6000 Arten und über 600 Gattungen und ist die drittgrößte Familie der Dicotyledonen.

Hintonia latiflora BULLOCK

Familie: Rubiaceae

Unterfamilie: Cinchonoideae

Tribus: Cinchoneae

Neben *Hintonia latiflora* ist auch die Bezeichnung *Coutarea latiflora*

(SESSE et MOC ex D.C.) oder *Portlandia pteroxperma* S. WATSON gebräuchlich.

Neben dem Typus *Hintonia latiflora* ist als Varietät *Hintonia latiflora* var. *leiantha* BULLOCK beschrieben (HAGER'S HANDBUCH 1998).

2.5.1.2 Botanische Beschreibung

Die busch- oder baumartige Pflanze kann bis zu 5 m hoch werden. Die Blattstellung ist kreuzgegenständig. Die ovalen bis elliptischen Blätter sind etwa 4 bis 12 cm lang und 2,5 bis 5 cm breit. Sie verschmälern sich an der Basis und besitzen einen kurzen Stiel. Die Infloreszenz ist vielblütig und terminal. Die Blüten zeigen sich sechszählig, weiß, duftend und in einer auffallende Trichterform. Der Kelchsaum wird als sechsteilig mit lanzettähnlichen Zipfeln beschrieben. Die Pflanze besitzt einen zweifächerigen Fruchtknoten, eine kahle Kapsel mit

zahlreichen Samen in jedem Fach. Die Samen, die häutchenartige Flügel besitzen, sind etwa 2 bis 2,5 cm lang, gedrunen und liegen dachziegelartig aufeinander (HAGER'S HANDBUCH 1998).



Abbildung 5: Hintonia-latiflora-Busch in Blüte.

2.5.1.3 Hintonia-latiflora-Rinde

Hintonia latiflora ist in mittel- und südamerikanischen Staaten beheimatet, vor allem aber in Mexiko und Kolumbien. Die Rinde zur Herstellung des verwendeten Extraktes stammt zu meist aus Wildbeständen, wobei das Hauptlieferland Mexiko ist (GEHRLICHER 2003).

Zur Herstellung des Hintonia-latiflora-Extraktes wird nur die Rinde von dünnen Zweigen bzw. Ästen, selten von Stämmen verwendet. Als Synonym für den Ausdruck Hintonia-latiflora-Rinde existiert auch der Ausdruck Cortex Copalchi, Copalchi-Rinde, mexikanische Fieberrinde, Corky Copalche Bark (corky engl.: korkartig; bark engl.: Rinde).

Die Droge besteht aus Stücken der Stamm- und Astrinde, die luftgetrocknet werden. Die gewonnenen Rindenstücke sind verschieden groß, wobei sie teilweise vollkommen oder nur wenig eingerollt sind. Besonders die jungen Rindenstücke zeigen noch keine differenzierte Ausbildung der Schuppenborke. Die Rinde ist meist mittelbraun, eventuell mit leicht grünlicher Tönung und mit kleinen hellbraunen Flecken versehen. Zahlreiche Längsstreifen und -risse durchziehen die Rinde, wobei Querrisse selten vorkommen (KRAUS und NOSTER 1993). Ältere Rinde zeigt oft ausgesprochene Schuppenborkenbildung, mit tiefen (5 mm)

Längs- und Querrissen. Die Farbe variiert von graubraun bis dunkelbraun, mit ab und zu auftretender violetter Tönung. Der Bruch wird als sehr hart und kurz beschrieben, wobei er im unteren Teil auch faserig oder schuppig sein kann (KRAUS und NOSTER 1993).



Abbildung 6: Gewinnung der *Hintonia-latiflora*-Rinde.

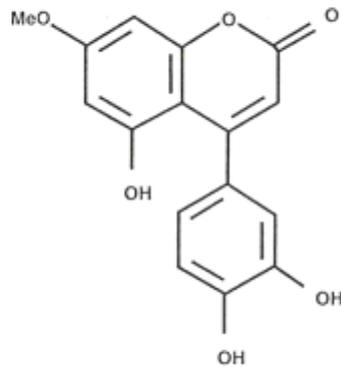
2.5.1.4 Inhaltsstoffe

Ursprünglich wurden Chinidin (Conchinin; β -Chinin) $C_{20}H_{24}N_2O_2$, und Chinin $C_{20}H_{24}N_2O_2$, als Inhaltsstoffe angegeben, nach neueren Untersuchungen kommen diese Substanzen aber nicht vor. Zusätzlich berichten GEYER (1955) von der Entdeckung eines Flavonglykon $C_{15}H_{12}O_6$ bzw. $C_{15}H_{10}O_5$ sowie von den Flavonglycosiden B und C.

In *Hintonia latiflora* wurden verschiedene polyphenolische Substanzen gefunden, die als Neoflavonoide (4-Phenylcumarine), 4, 5-Dihydroxy-7-methoxy-4-phenyl-5,2-oxidocumarin und 5,3,4-Trihydroxy-7-methoxy-4-phenylcumarin bezeichnet wurden. Neoflavonoide sind eine wenig verbreitete und noch sehr unerforschte Stoffgruppe (REHER 1982, MATA 1990).

Später wurde Coutareagenin, ebenfalls ein Neoflavonoid, als Leitwirkstoff des Rinden-Extraktes identifiziert. Coutareagenin wird auch für die Blutzucker-senkende Wirkung des *Hintonia-latiflora*-Extraktes verantwortlich gemacht. Allerdings ergibt sich die Wirkung eines Extraktes zumeist aus dem Zusammenspiel der Wirkungen seiner verschiedenen Inhaltsstoffe und kann häufig nicht ganz eindeutig auf eine Substanz festgelegt werden. Zusätzlich beinhaltet die *Hintonia-latiflora*-Rinde als Zuckerkomponenten Glucose, Arabinose und Rhamnose. Weitere Inhaltsstoffe sind Saponine, Harze, Gummi und Catechingerbstoffe (KRAUS und NOSTER 1993).

Coutareagenin in Sucontral®



(5-Hydroxy-7-methoxy-4-(3,4-dihydroxyphenyl)-2H-benzo-1-pyran-2-on)

Abbildung 7: Chemische Formel von Coutareagenin, eine der Leitsubstanzen des Phyto-Antidiabetikums Sucontral®

2.5.1.5 Anwendung

In der Volksmedizin wurde *Hintonia latiflora* ursprünglich als Tee bei Malaria und dyspeptischen Beschwerden angewendet. In der Veterinärmedizin wurde es bei Pferden und Rindern gegen Fieber und Geschwüre eingesetzt (HAGERS HANDBUCH 1998).

1913 wurde sowohl von TERRES als auch von LANDA zum ersten Mal eine antidiabetische Wirkung von *Hintonia latiflora* beschrieben, die von den Autoren im Instituto Medico Nacional in Mexiko bei klinischen Versuchen beobachtet wurde. *Hintonia latiflora* ging als wässrig-alkoholischer Extrakt unter dem Namen Sucontral® in die Diabetesbehandlung in Europa ein. Berichte von RITZMANN (1950), WINTER (1951), SCHMID (1951), VIDA (1951) und KUHR (1953) bestätigten die Blutzucker-senkende Wirkung. Später wurde dies zusätzlich tierexperimentell nachgewiesen (KAISER und GEYER 1955, BASTIEN 1961, SLIJEPČEVIĆ und KRAUS 1997, KOREC et al. 2000).

2.6 Aufbau und Funktion der glatten Gefäßmuskulatur

Da die Sekundärerkrankungen des Diabetes mellitus sehr eng mit den Blutgefäßen verbunden sind, werden Aufbau und die Funktion der glatten Muskulatur im folgenden Kapitel ausführlich beschrieben.

2.6.1 Physiologie der arteriellen Blutgefäße

Arterielle Blutgefäße bestehen prinzipiell aus drei Schichten: Einer Tunica interna (Intima), Tunica media (Media) und Tunica externa (Adventitia). Die Tunica interna bildet die innere Wandauskleidung, das Endothel, die Tunica media enthält mehrere Schichten glatter Muskulatur und die Tunica externa steht als lockere Verschiebeschicht mit dem angrenzenden Gewebe in Verbindung (LIEBICH 1999). Das glatte Muskelgewebe der Tunica media besteht aus länglichen, vorwiegend spindelförmigen Zellen mit einer Länge von 50 bis 200 µm und einer Dicke von 5-10 µm. Sie enthalten als kontraktile Elemente Myosin- und Aktinfilamente. Zellen dieses Gewebes zeigen im Gegensatz zur Skelett- und Herzmuskulatur keine Querstreifung, weil die typische parallele und regelmäßige Anordnung der Myofibrillen in Sarkomere fehlt. Man unterscheidet dicke Myosin- und dünne Aktinfilamente, die längsorientiert im Zytoplasma liegen, wobei diese beiden Elemente wie bei der quergestreiften Muskulatur ineinandergeschoben sind. Die Aktinfilamente sind eventuell an der Innenseite der Zellmembran angeheftet, bzw. haben vermutlich bipolare Verbindungen zu den Myosinfilamenten. Der eigentliche Kontraktionsmechanismus der glatten Muskelzellen ist weniger gut untersucht, als der der Skelettmuskulatur, ist aber im Ablauf ähnlich (EHRLEIN 2000). Da der Kontraktionsmechanismus 100- bis 1000mal langsamer abläuft als beim Skelettmuskel, eignet sich die glatte Muskulatur besonders für unermüdliche, energiesparende Halteleistungen (RÜEGG 1990)

2.6.1.1 Mechanismus der Kontraktion glatter Muskelzellen

Während der Kontraktion gleiten Myosin und Aktinfilamente ineinander, dadurch verkürzt sich die Zelle. Da die Aktinfilamente im Zellgerüst verankert sind, kommt es zu einer Verkürzung der Muskelzelle (HARTSHORNE und GORECKA 1980, HUXLEY 2004).

Dieses Ineinandergleiten kommt durch wiederholte Querbrückenbildung zwischen Myosinköpfchen und Aktinfilamenten zustande. Die Energie wird mit Hilfe einer Myosin-ATP-ase durch hydrolytische Spaltung von MgATP geliefert. Ein Myosinmolekül weist eine Hals- und eine Kopfregion auf. Diese bestehen aus je zwei schweren Ketten (220 kDa) und zwei leich-

ten Myosinkettenpaaren („myosin light chain“; MLC) mit 20 und 17 kDa am Ende der Kopfregion (ADELSTEIN und SELLERS, 1996). Die 20 kDa Myosin-Leichtkette, die bei Auslösung der Kontraktion phosphoryliert wird, übt eine regulatorische Funktion aus („regulatory myosin light chain“; RLC). Im Myosinkopf befindet sich eine MgATP- und eine Aktinbindungsstelle (BÁRÁNY und BÁRÁNY 1996).

Die Kontraktion bzw. Relaxation der glatten Muskelzellen wird, wie in der Skelett- und der Herzmuskulatur, durch Anstieg bzw. Absinken der freien intrazellulären Ca^{2+} -Konzentration ausgelöst. Das Ansteigen des intrazellulären Calciums kann zum einen durch Öffnen von Calcium-Kanälen in der Zellmembran, zum anderen über die Freisetzung von Calcium aus intrazellulären Speichern erfolgen (SOMLYO und SOMLYO 1994). Bei der intrazellulären Freisetzung spielt Inositoltriphosphat (IP_3) eine wesentliche Rolle. Calcium bindet an das Modulatorprotein Calmodulin (SOMLYO 1997), was eine Konformationsänderung dieses Moleküls bewirkt. Dadurch wird die Bindung dieses Komplexes an eine inaktive Myosin-Leichtketten-Kinase („myosin light chain kinase“; MLCK) möglich. Die Folge dieser Bindung ist die Umwandlung der MLCK in ihre aktive Form, wodurch wiederum die regulatorische Myosin-Leichtkette (RLC) phosphoryliert wird (GILBERT-MCCLAIN et al. 1998, SOMLYO und SOMLYO 2000). Diese Phosphorylierung der RLC steigert die Aktivität der MgATPase. Dies führt zur Kippbewegung des Myosinköpfchens und dadurch zur Kontraktion. Anschließend sinkt die Calcium-Konzentration in der Zelle, Calmodulin löst sich von der MLCK und dadurch konvertiert die Kinase wieder in ihre inaktive Form. Durch eine Myosin-Leichtketten-Phosphatase („myosin light chain phosphatase“; MLCP) kommt es zu einer Dephosphorylierung der RLC. Dies führt zur Relaxation des Muskels (STULL et al. 1996).

Wird die MLCP gehemmt, erfolgt keine Dephosphorylierung der RLC und der Muskel kann weiter in Kontraktion bleiben (KAMM und GRANGE 1996).

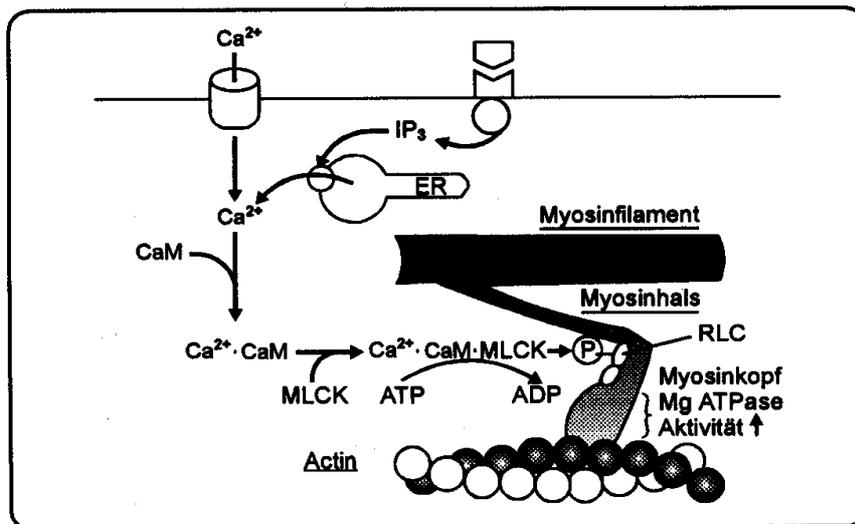


Abbildung 8: Schematische Darstellung der Kontraktion glatter Muskelzellen. Gezeigt wird der Ca²⁺-Einstrom über Ca²⁺-Kanäle und die Freisetzung von Ca²⁺ aus dem Endoplasmatischen Reticulum (ER), die Erhöhung der MgATPase-Aktivität des Myosins vermittelt über Calmodulin (CaM) und die Phosphorylierung der regulatorischen Myosin-Leichtkette (RLC) durch die Myosin-Leichtketten-Kinase (MLCK) und die Querbrückenbildung zwischen Actin und Myosin (modifiziert nach BÁRÁNY und BÁRÁNY 1996).

2.6.1.2 Mechanismus der Erregungsübertragung

Zwischen dem Stimulus und der kontraktile Antwort einer Gefäßmuskelzelle liegen zahlreiche Schritte. Der zentrale Trigger für die Kontraktion der glatten Muskelzelle ist das Ansteigen der intrazellulären Calcium-Konzentration. Diese erfolgt durch Öffnen der Calcium-Kanäle in der Zellmembran und die Freisetzung von Ca²⁺ aus intrazellulären Speichern. Der Calcium-Einstrom nach Öffnung der Kanäle beruht auf einem starken Konzentrationsgefälle zwischen extra- und intrazellulärem Raum. Am ruhenden Muskel kann von einer extrazellulären Konzentration von 1,2 mM und einer intrazellulären von nur 100 bis 300 nM ausgegangen werden (HUGHES 1995). Calcium-Kanäle werden entweder durch Veränderung des Membranpotentials (spannungsgesteuerte Kanäle „voltage-operated channels“ VOC) reguliert oder direkt durch Hormone, bzw. Neurotransmitter aktiviert (liganden- bzw. rezeptorgesteuerte Kanäle „receptor-operated channels“ ROC) (BOLTON et al. 1999).

2.6.1.3 Spannungsgesteuerte Calcium-Kanäle

In glatten Muskelzellen sind L- (long lasting) und T- (transient) Typ-Calcium-Kanäle von Bedeutung. L-Typ-Kanäle produzieren einen relativ langanhaltenden Ca²⁺-Einwärtsstrom,

T-Typ-Kanäle dagegen zeigen eine schnelle Inaktivierung des Ca^{2+} -Einwärtsstromes. An der Gefäßmuskelzelle spielen vor allem L-Typ-Kanäle eine wichtige Rolle (HUGHES 1995, WEGENER et al. 2004).

Zum Calcium-Einwärtsstrom kommt es durch eine Öffnung der spannungsgesteuerten Calcium-Kanäle, was durch eine Änderung des elektrischen Membranpotentials erreicht wird. Das Ruhemembranpotential einer glatten Muskelzelle liegt physiologischerweise bei etwa -60 mV. Durch Depolarisation wird dieses Ruhepotential abgesenkt, wodurch die Calcium-Kanäle öffnen und extrazelluläres Ca^{2+} in die Zelle einströmt (SOMLYO und SOMLYO 1994, HIMPENS et al. 1995). Zusätzlich kann die Depolarisation der Zelle auch durch eine von anderen Zellen kommende Erregung, durch Aktivierung ligandengesteuerter Kanäle oder durch intrazelluläre Vorgänge verursacht werden. L-Typ-Calcium-Kanäle können durch Kationen wie z.B. Magnesium blockiert werden, sie besitzen aber auch Bindungsstellen für 1,4-Dihydropyridine (z.B. Nifedipin), Phenylalkylamine (z.B. Verapamil) und Benzothiazepine (z. B. Diltiazem). Diese Substanzen wirken als Calcium-Kanal-Blocker, hemmen somit den Ca^{2+} -Einwärtsstrom und führen so zu einer Vasodilatation (FLECKENSTEIN und FLECKENSTEIN-GRÜN 1988, FLECKENSTEIN 1990, HAGIWARA et al. 1993).

2.6.1.4 Ligandengesteuerte Calcium-Kanäle

Im Gegensatz zu Spannungs-abhängigen Calcium-Kanälen sind ligandengesteuerte Calcium-Kanäle nicht vom Membranpotential abhängig, sondern werden direkt durch entsprechende Agonisten reguliert. Das Öffnen der Calcium-Kanäle führt auch zu einer Depolarisation der Zellmembran und das wiederum kann ein Öffnen der spannungsabhängigen Calcium-Kanäle zur Folge haben (SOMLYO und SOMLYO 1994). Bisher wurden in glatten Muskelzellen u.a. ATP-, Angiotensin II- und Serotonin-gesteuerte Calcium-Kanäle gefunden (RÜEGG et al. 1989).

2.6.1.5 Calcium-Freisetzung aus intrazellulären Speichern

Ein weiterer, sehr wichtiger Mechanismus der Erregungsübertragung ist die Freisetzung von Ca^{2+} aus intrazellulären Speichern nach Bindung eines Liganden an einen Membranrezeptor. Dies läuft unabhängig von einer Änderung des Membranpotentials ab. Eine sehr wichtige Stellung bei der Signaltransduktion nimmt dabei die Phosphatidylinositol-Kaskade ein (BERRIDGE und IRVINE 1984).

2.6.1.6 Regulation der Gefäße

An der Regulation des Gefäßtonus sind neben dem Sympathicus u.a. die Peptidhormone Angiotensin und Adiuretin sowie Faktoren des Endothels beteiligt. Der Tonus der Gefäße wird vor allem über α - und β -Adrenozeptoren gesteuert. Die Gefäße sind von einem Netz postganglionärer sympathischer Nerven umgeben. Noradrenalin, der Überträgerstoff des sympathischen Nervensystems wird vor allem in den Nervenzellen aus Dopamin durch Hydroxylierung gebildet. Anschließend wird es in Vesikeln gespeichert, die in bestimmten Bereichen (Varikositäten) der sympathischen Nervenfasern vorliegen. Noradrenalin wirkt hauptsächlich über α_1 -Adrenorezeptoren und löst über diese G-Protein-gekoppelten Rezeptoren eine Kontraktion der Gefäße aus (FÖRSTERMANN 2001). Adrenalin wird im Nebennierenmark und Paraganglien des Sympathicus gebildet. Als Hormon wirkt es sowohl an α_1 - als an β_2 -Adrenorezeptoren. Dabei überwiegt aber der Einfluss auf α_1 -Adrenorezeptoren und damit die vasokonstriktorische Wirkung. Eine weitere vasokonstriktorisch wirkende Substanz stellt das Angiotensin II (Vorstufe Angiotensinogen wird in der Leber gebildet) dar. Angiotensin II ist eine der am stärksten wirkenden vasokonstriktorischen Substanzen des Organismus und wirkt direkt an den Arteriolen. Gleichzeitig fördert es auch über das Kreislauf-Zentrum im ZNS eine Vasokonstriktion, wodurch der direkte Effekt an den Arterien verstärkt wird (FÖRSTERMANN 2001). Adiuretin (Vasopressin) wird im Hypophysenhinterlappen gebildet und direkt in den Blutkreislauf abgegeben. Es wirkt ebenfalls über G-Protein-gekoppelte Rezeptoren verengend auf die Gefäße.

Im Gegensatz zum sympathischen Anteil besitzt der parasympathische Anteil des vegetativen Nervensystems keinen wesentlichen Einfluss auf die Gefäße (RANG et al. 2003a).

2.6.2 Gefäßspannungs-verändernde Substanzen

2.6.2.1 Der Einfluss von Noradrenalin auf die Gefäßmuskulatur

Noradrenalin löst als vasokonstriktorisch wirksame Substanz über α_1 -Adrenozeptoren eine Kontraktion der glatten Muskulatur der Gefäße aus. Nachdem es an den Rezeptor gebunden hat, wird über G-Protein die Phospholipase C (PLC) aktiviert, die ein bestimmtes Phospholipid der Zellmembran, das Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat (PIP_2) abspaltet. Aus diesem Phospholipid entstehen diacyliertes Glycerin (Diacylglycerin, DAG) und Inositol-1,4,5-triphosphat (IP_3). DAG und IP_3 werden auch als sekundäre Botenstoffe (second messenger) bezeichnet. Dabei bleibt DAG in der Membran und stimuliert die Proteinkinase C (PKC). IP_3 bindet an den IP_3 -Rezeptor des Endoplasmatischen Reticulums (ER). Diese IP_3 -

Rezeptoren können auch als intrazelluläre Ca^{2+} -Kanäle bezeichnet werden (BERRIDGE und IRVINE 1984, SOMLYO und SOMLYO 1994). Nach Bindung des IP_3 erfolgt eine Konformationsänderung des Kanals, der Kanal wird geöffnet und Ca^{2+} aus dem ER freigesetzt. Die durch den zweiten Botenstoff DAG aktivierte Proteinkinase C bewirkt schließlich eine Phosphorylierung spezifischer Zielproteine, die über eine Sensibilisierung der kontraktile Proteine für Ca^{2+} an der Regulation der Kontraktion beteiligt sein können.

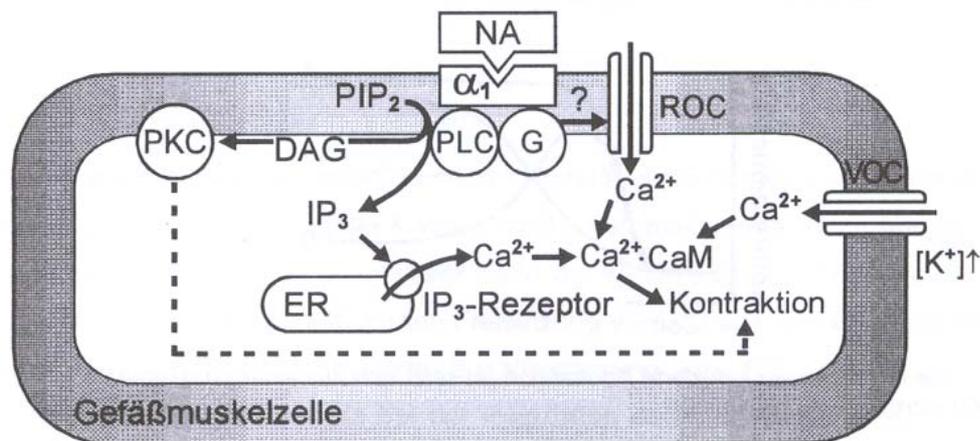


Abbildung 9: Schematische Darstellung der Signaltransduktion bei der Kontraktion der Gefäßmuskelzelle. Gezeigt werden spannungsgesteuerte (VOC) und rezeptorgesteuerte (ROC) Calcium-Kanäle in der Zellmembran. Nach Bindung von Noradrenalin (NA) an α_1 -Adrenozeptoren wird die Phosphatidylinositol-Kaskade aktiviert. IP_3 vermittelt als intrazellulärer second messenger die Freisetzung von Ca^{2+} aus intrazellulären Speichern (ER). DAG stimuliert die Proteinkinase C (PKC). Daneben ist wahrscheinlich der Einstrom von extrazellulärem Ca^{2+} durch spannungsgesteuerte Calcium-Kanäle der Zellmembran an der NA-induzierten Kontraktion beteiligt. Möglicherweise erfolgt zunächst G-Protein-vermittelt die Öffnung rezeptorgesteuerter Calcium-Kanäle (nach MÜLLER 1997).

2.6.2.2 Der Einfluss von Milrinon auf den glatten Muskel

Milrinon wirkt als Hemmstoff der Phosphodiesterase III (PDE III). Dadurch wird in der Zelle gebildetes cAMP weniger stark abgebaut. cAMP aktiviert eine Proteinkinase A, wodurch Proteine phosphoryliert werden. Mit großer Wahrscheinlichkeit kommt es durch Aktivierung der Magnesium-abhängigen Calcium-Pumpen (Mg-abhängige Ca-ATPasen) des Endoplasmatischen Reticulums und der Zellmembran zur Absenkung der intrazellulären Calcium-Konzentration und damit zur Relaxation der Muskelzelle (KOMAS et al. 1991, SEGARRA et al. 2002).

2.6.2.3 Der Einfluss von Kalium auf den glatten Muskel

Pysiologischerweise kommt es bei einer Depolarisation der glatten Muskelzelle zum Öffnen der L-Typ-Calcium-Kanäle und dadurch zum Einstrom von extrazellulärem Calcium. Experimentell kann man die Depolarisation durch Erhöhung der extrazellulären Kalium-Konzentration erzeugen, wodurch sich die Spannungs-abhängigen Calcium-Kanäle öffnen, Calcium in die Zelle fließt und eine Kontraktion ausgelöst wird. Entsprechend wirken Calcium-Kanal-Blocker besonders stark auf die Kalium-induzierte Kontraktion (MÜLLER 1997)

Das Endothel

Eine wichtige Rolle für die Regulation des Gefäßtonus spielt auch das Endothel. Das Endothel kleidet das Gefäß innen aus und bildet dadurch eine glatte Oberfläche. Gleichzeitig besitzt es aber auch steuernde Funktionen auf die Gefäßweite und dadurch auf die Durchblutung der Gewebe. Von entscheidender Bedeutung dafür sind die vasoaktiven Faktoren Stickstoffmonoxid (NO) und Endothelin (FURCHGOTT und ZAWADSKI 1980, YANAGISAWA et al. 1988).

2.6.2.4 Synthese und Wirkmechanismus des NO

Die Synthese von NO wird zum einem durch Acetylcholin und Serotonin zum anderen aber auch durch Mediatoren, die aus den Blutplättchen stammen, wie z.B. ADP und ATP angeregt. Diese Substanzen sind in der Lage über Rezeptoren die freie Ca^{2+} -Konzentration in den Endothelzellen zu erhöhen, wodurch die NO-Synthase aktiviert wird (SHIN und MORGAN 2003). NO wird aus L-Arginin in der Endothelzelle gebildet. Es wird anschließend freigesetzt, diffundiert aufgrund seiner hohen Lipophilie in die Gefäßmuskelzelle und bindet an die lösliche Isoform der Guanylatcyclyase. Diese geht in ihre aktive Form über und fördert die Synthese von cGMP aus GTP. cGMP löst als second messenger über die Proteinkinase G eine Relaxation der Gefäßmuskelzelle aus (FURCHGOTT 1983, PEARSON 1993).

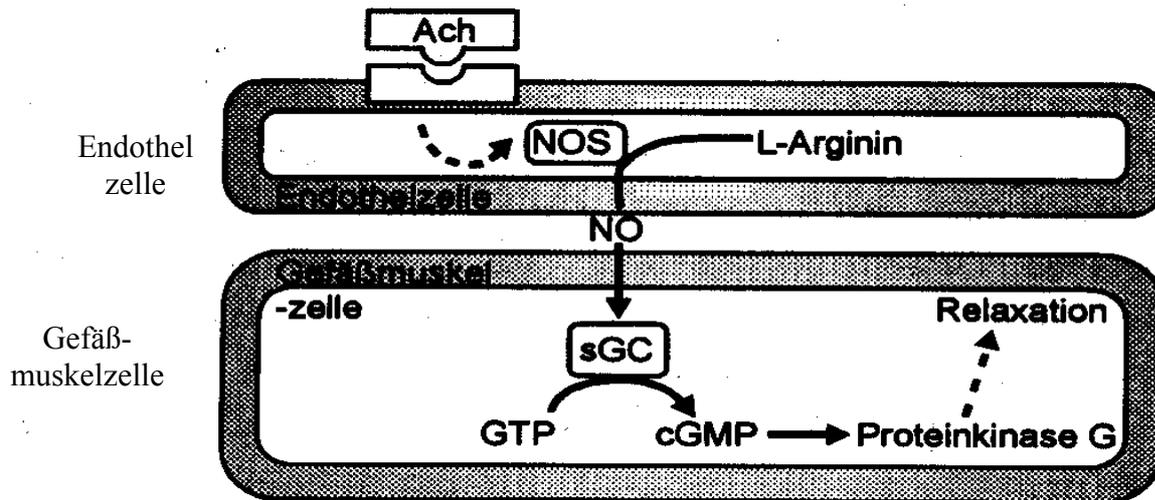


Abbildung 10: Synthese und Wirkmechanismus von NO. Acetylcholin- (Ach)-induzierte Bildung von NO in den Endothelzellen durch Stimulierung einer NO-Synthase (NOS). Aus L-Arginin gebildetes NO aktiviert in der Gefäßmuskulatur die lösliche Guanylatcyclase (sGC), wodurch cyclisches Guanosinmonophosphat (cGMP) gebildet wird, welches die Relaxation vermittelt (nach MÜLLER 1997).

2.6.2.5 Endothelin

Endothelin (ET) ist ein stark vasokonstriktorisch wirkendes Peptid. Es wurde erstmals 1988 aus dem Kulturmedium von Schweineaortenzellen isoliert (YANAGISAWA et al. 1988). Inzwischen unterscheidet man mehrere Isoformen wie ET-1, ET-2 und ET-3. Nur ET-1 kommt in Endothel- und Gefäßmuskulaturzellen vor. Es gibt mindestens zwei Typen von ET-Rezeptoren, ET_A und ET_B , wobei ET_B vor allem auf der Oberfläche von glatten Gefäßmuskulaturzellen zu finden ist und bevorzugt das ET-1 bindet (KWON et al. 2003). ET-1 wird über Exocytose aus der Endothelzelle freigesetzt und an die Rezeptoren gebunden. Ähnlich wie bei Noradrenalin kommt es zur Aktivierung der Phosphatidylinositol-Kaskade. Über IP_3 erfolgt eine Calcium-Freisetzung aus den intrazellulären Speichern des ER. Zusätzlich wird die Proteinkinase C aktiviert. Die durch Endothelin ausgelöste Kontraktion entwickelt sich im Verhältnis zu Noradrenalin sehr langsam, zeichnet sich aber durch eine lange Wirkdauer aus (KWON et al. 2003). Man nimmt an, dass das ständige Freisetzen von ET-1 aus den Endothelzellen für die Erhaltung des Basaltonus der Gefäße mitverantwortlich ist (GRAY und WEBB 1996).

2.6.3 In-vitro- und In-vivo-Untersuchungen zur Bestimmung von Gefäßtonus und Kontraktilität des Herzens

Zur Überprüfung des Einflusses des Hintonia-latiflora-Extraktes auf Gefäßtonus und Herzkontraktilität werden etablierte In-vitro-Methoden wie Kontraktionsmessungen an isolierten Aortenringen, Kontraktionsmessungen am isolierten Papillarmuskel und fluoreszenzmikroskopische Bestimmung der intrazellulären Calcium-Ionenkonzentration verwandt.

2.6.3.1 Kontraktionsmessungen an isolierten Aortenringen

Um einen generellen Einfluss des Hintonia-latiflora-Extraktes auf die Gefäße darzustellen sind In-vitro-Versuche an isolierten Aortenringen sehr gut geeignet. Die Aorta bietet als einfach zu präparierendes Gefäß die Möglichkeit gezielter Untersuchungen der Funktion des glatten Gefäßmuskels.

Messprinzip

Das Testsystem beruht auf der isometrischen Messung der Kontraktionskraft isolierter Aortenringe. Die Registrierung erfolgt über einen induktiven Kraftaufnehmer. Ziel ist es, den Einfluss von Testsubstanzen auf die durch Noradrenalin bzw. Kalium (als Beispiele für vaso-konstringierende Substanzen) induzierte Kontraktion der glatten Muskulatur zu ermitteln.

Die Methode zur Untersuchung der Noradrenalin-induzierten Kontraktion basiert auf Arbeiten von NELSON (1984), HAGIWARA et al. (1993) und MÜLLER (1997).

2.6.3.2 Papillarmuskel

Bedeutung und Lage des Papillarmuskels

Das Herz wird in Vorhöfe und Herzkammern unterteilt. Zwischen diesen beiden Kompartimenten liegen die Artrioventrikularklappen (AV-Klappen). Diese häutigen, trichterförmigen Segelklappen stehen über Sehnenfäden mit den Papillarmuskeln in Verbindung. Während der Kontraktion der Herzkammern verhindern die Papillarmuskeln ein Durchschlagen der AV-Klappen in die Vorhöfe. Sie ermöglichen somit in der Systole eine sichere Abdichtung der Ventrikel gegenüber den Vorhöfen (THEWS et al. 1999a).

2.6.3.3 Kontraktionsmessungen am isolierten Papillarmuskel

Das verwendete Testsystem basiert auf der Messung der Kontraktionskraft isolierter Papillarmuskeln des Meerschweinchens mit Hilfe induktiver Kraftaufnehmer. Anhand dieser Messungen kann eine Beurteilung der Wirkung der Testsubstanzen auf die Kontraktion des Herzens erfolgen. Die Papillarmuskeln, als ein Teil des Kammermyokards, können wegen ihrer Form und Struktur gut präpariert werden. Bei der Entnahme aus dem Herzen werden sie nur an der Basis verletzt. Aufgrund ihres sehnigen Fortsatzes lassen sie sich problemlos an einem Kraftaufnehmer fixieren. Die Papillarmuskeln des Meerschweinchens verhalten sich physiologisch ähnlich wie das Ventrikelmyokard des Menschen (REITER 1966, SENSCH 1995, MÜLLER 1997).

2.6.3.4 Fluoreszenzmikroskopische Bestimmung der intrazellulären Calcium-Ionenkonzentration

Mit bestimmten Fluoreszenzfarbstoffen lässt sich die intrazelluläre Calcium-Ionenkonzentration bestimmen. Der Fluoreszenzfarbstoff Fura-2 fungiert als Calcium-Indikator (GRYNKIEWICZ et al. 1985). Innerhalb der Zelle bildet er mit den Calcium-Ionen einen Chelatkomplex aus und ändert dabei seine Fluoreszenz. Dieser Vorgang läuft spezifisch ab und ist quantitativ bestimmbar. Lebende Zellen werden durch den Farbstoff nicht geschädigt. Das für die Messung benötigte Fura-2-Salz kann nur schwer die Zellmembran passieren, deshalb wird der Zellmembran-permeable Acetmethoxyester des Fura-2 verwendet. Nach Permeation in die Zelle wird dieser von zelleigenen Esterasen hydrolysiert und die Acetmethoxy-Gruppen abgespalten, so dass Fura-2 als Ion in der Zelle vorliegt (LODISH 1995). In dieser Konfiguration kann Fura-2 die Zelle nicht mehr verlassen. Fura-2 wird alternierend mit Licht der Wellenlänge 340 und 380 nm angeregt und die Fluoreszenz bei 510 nm gemessen. Bei Bindung der Calcium-Ionen wird das Emissionsspektrum modifiziert, so dass sich eine Änderung der Ca^{2+} -Konzentration bestimmen lässt. Bei steigender Ca^{2+} -Konzentration nimmt die Fluoreszenz bei einer Anregung von 340 nm zu, bei Anregung mit 380 nm dagegen ab. Das Verhältnis (Ratio) der Emissionsintensitäten bei 340 und 380 nm Anregung gilt als ein Maß für die Ca^{2+} -Konzentration. Die Bildung einer Ratio besitzt den Vorteil, dass diese die Calcium-Konzentration unabhängig vom Beladungszustand der Zelle mit Farbstoff und vom Ausbleichen des Farbstoffes (bleaching) während des Versuches wiedergibt. Ein Problem bei der Calcium-Ionenbestimmung ergibt sich durch das ebenfalls in der Zelle vorhandene Chelat-bildende Magnesium-Ion. Da die Affinität von Ca^{2+} zu Fura-2 wesentlich höher ist als

die von Mg^{2+} , ist aber eine Störung durch Magnesium-Ionen nicht zu erwarten (GRYNKIEWICZ et al. 1985).

2.6.3.5 Der Einfluss von Vasopressin auf den glatten Muskel

Vasopressin (Adiuretin) wirkt wie Angiotensin als stark vasokonstringierende Substanz auf den Gefäßmuskel. Es verursacht eine Konstriktion der Kapillaren und Arteriolen in der Haut, im Bindegewebe und in den inneren Organen, einschließlich der Koronargefäße. Dieser Effekt beruht auf einer direkten Wirkung über G-Protein-gekoppelte Rezeptoren auf den glatten Muskel. Die Wirkung kann auch durch Adrenozeptorenblocker nicht antagonisiert und durch Denervation nicht aufgehoben werden (GÄRTNER und HAEN 2001). An gezüchteten Zellen wie den A10-Zellen (Aortenzellen der Ratte) kann mit Vasopressin ein Calcium-Transient (vorübergehende Erhöhung der Calcium-Konzentration) ausgelöst werden (GRIER et al. 1989, DI SALVIO und RAATZ NELSON 1998).

2.6.3.6 Ultraschallverfahren zur vaskulären Diagnostik

Farbkodierte Duplexsonographie

Duplexsonographie (duplex lat.: doppelt, zweifach) bezeichnet eine Kombination aus Impuls-echoverfahren, dem sogenannten B-Bildverfahren und einem kontinuierlichen (CW) oder gepulsten (PW) Dopplerverfahren. Es ermöglicht die gleichzeitige Darstellung von makroskopischen Strukturen und Blutströmungen. Das B-Bildverfahren zeigt die Struktur bzw. Lokalisation des Gefäßes und das Dopplerspektrum gibt Auskunft über die Blutflussgeschwindigkeit an dieser Stelle (BARR 1992).

B-Mode

Im B-Mode (B = brightness, engl.: Helligkeit, mode engl.: Verfahren) oder B-Bildverfahren werden reflektierende Grenzflächen, die in einer Ebene liegen, als Punkte auf dem Monitor sichtbar gemacht. Diese Punkte weisen unterschiedliche Helligkeit auf und es entsteht ein ein- oder zweidimensionales Bild. Die unterschiedlichen Reflexionseigenschaften der verschiedenen Gewebe können in Grauwertabstufungen sichtbar gemacht werden (FRITSCH und GERWING 1993). Dieser Bildtyp zeigt das gesamte Gewebe, das vom Ultraschall durchquert wird. Im Gegensatz zu anderen Verfahren (A-Mode oder M-Mode) werden mehrere Ultraschallstrahlen verwendet und anschließend das Echo jedes einzelnen Strahles analysiert.

Wenn mehrere B-Mode-Bilder hintereinander geschaltet werden, spricht man von Real-time-Bildern (PALMER 1999).

Real-time-Mode

Der Real-time Mode zeigt Bewegungen, indem die Bilder des Körperteils unter dem Schallkopf so angezeigt werden, wie sie gerade abgetastet werden. Alle Bewegungen des Körpers bzw. der zu schallenden Struktur (z.B. Fetus, pulsierende Blutgefäße) verursachen auch eine Bewegung in der Abbildung. Auf dem Monitor erscheint die Bewegung in Echtzeit, so wie sie abläuft (PALMER 1999). Diese Methode erlaubt die Beurteilung anatomischer und pathologischer Strukturen und gibt teilweise auch Rückschlüsse auf die Funktion von Organen (POULSEN-NAUTRUP 2001).

Bei den meisten Real-time-Geräten ist es möglich, das angezeigte Bild als Standbild festzuhalten (einzufrieren). Dadurch ergibt sich die Möglichkeit einer detaillierten Betrachtung bzw. einer genauen Messung (PALMER 1999).

2.6.3.7 Dopplereffekt

Schon 1842 beschrieb der österreichische Physiker Christian J. Doppler (1803-1853) die nach ihm benannten optischen und akustischen Phänomene (BOLLINGER und PARTSCH 2003). Der Dopplereffekt ist die Veränderung der Schallwellenfrequenz als Ergebnis der Relativbewegung zwischen Schallsender und Empfänger. Die Frequenzveränderung ist proportional zur Geschwindigkeit der Bewegung (PALMER 1999). Wenn Schallwellen von einem unbewegten Objekt reflektiert werden, haben die reflektierten Schallwellen eine geringere Energie als die ausgesandten Wellen, besitzen aber die gleiche Frequenz und Wellenlänge wie diese. Anders verhält es sich bei bewegten Objekten. Bei ihnen unterliegen die reflektierten Schallwellen einer Frequenzverschiebung. Diese Verschiebung wird als Dopplershift (f_d) bezeichnet. Unter dieser Dopplerverschiebung (f_d) versteht man auch die Differenz aus der reflektierten Frequenz (f_1) und der ursprünglich ausgesandten Frequenz (f_0). Daraus ergibt sich: $f_d = f_1 - f_0$. Zusätzlich gilt es jedoch zu berücksichtigen, ob sich das Objekt auf den Schallkopf zu bewegt (z. B. Blutkörperchen), dann gilt: $f_1 > f_0$ und $f_d > 0$. Üblicherweise stellt man das auf den Schallkopf zufließende Blut im farbkodierten Dopplerverfahren rot dar und oberhalb der Null-Linie. Bewegt sich das Objekt hingegen vom Schallkopf weg, ergibt sich: $f_1 < f_0$ und damit $f_d < 0$. Es wird meist in blauer Farbe sichtbar gemacht und zeigt sich unterhalb der Null-Linie (POULSEN-NAUTRUP 2001). Die Farbuordnungen rot und blau sind willkürlich gewählt und unabhängig von dem jeweiligen Gefäßtyp (Arterie, Vene) und der Qualität des Blutes

(arteriell, venös). Die Größe der Dopplerverschiebung ist abhängig von der Strömungsgeschwindigkeit der reflektierenden Objekte (V), von der Bewegungsrichtung der Objekte im Verhältnis zur Ausbreitungsrichtung der Ultraschallwellen ($\cos \Theta$) und der Geschwindigkeit des Schalls im Gewebe (c).

Dadurch ergibt sich:

$$f_d = 2 \cdot f_0 \cdot \frac{V \cdot \cos \Theta}{c}$$

f_d = Dopplershift

f_0 = ursprünglich ausgesandte Frequenz

V = Strömungsgeschwindigkeit der reflektierenden Objekte

Θ = Winkel zwischen Schallstrahl und Blutströmungsrichtung

c = Geschwindigkeit des Schalls im Gewebe

Entspricht die Fließrichtung des Blutes genau dem Einfallswinkel der Schallwellen, so ist der Winkel Θ gleich 0° und der Kosinus von Θ gleich 1. Daraus ergibt sich, dass die gemessene Fließgeschwindigkeit mit der tatsächlichen übereinstimmt und der Messfehler bei 0 % liegt.

Bei allen Messungen muss deshalb der Einfallswinkel des Schalls mitberücksichtigt werden.

Ist das reflektierende Gewebe nicht parallel zum Schallstrahl, wird die angezeigte Frequenzänderung niedriger ausfallen als die eigentliche Geschwindigkeit. Die Winkelabweichung sollte nie 60° überschreiten, da sonst nicht vertretbare Messfehler auftreten. Bei einem Dopplereinfallswinkel von 90° (Kosinus von Θ gleich 0) lassen sich keine Blutströme mehr registrieren (KOPP und LUDWIG 2001). Für die Anwendung in der Diagnostik liegt der Dopplershift etwa im Bereich zwischen 100 Hz und 11 kHz, das entspricht einer Geschwindigkeit von 10-100 cm/s (BARR 1992), bzw. zwischen 0 und 20 kHz (POULSEN-NAUTRUP 2001). Durch den Vergleich zwischen reflektiertem Ultraschallsignal und ursprünglich ausgesandter Frequenz kann der Doppler-Shift akustisch wahrgenommen werden (FEHSKE 1988). Frequenzen in dem oben beschriebenen Bereich sind hörbar und manifestieren sich je nach Geschwindigkeit in unterschiedlich hohen Tönen. Schnelle Blutströmungen mit großem Dopplershift werden als hohe Töne wahrgenommen, langsame Fließgeschwindigkeiten mit geringem Dopplershift als tiefe Töne und Geräusche. Graphisch werden die Flusskurven als zweidimensionales Diagramm aufgetragen, indem die Höhe des Dopplershifts proportional zur Geschwindigkeit der zu untersuchenden Blutströmung in der Y-Achse gegen die Zeit in der X-Achse dargestellt wird. Durch klare Bezeichnung der Null-Linie ist es möglich, den Dopplershift zu jeder Zeit abzulesen (FEHSKE 1988). Über die Doppler-Formel

(siehe oben) kann unter Berücksichtigung des Winkels Θ die Flussgeschwindigkeit berechnet werden (vgl. FEHSKE 1988).

Dopplerfrequenzspektrum

Da sich die Blutkörperchen mit unterschiedlicher Geschwindigkeit in der Blutbahn bewegen, spricht man von einem Dopplerfrequenzspektrum. Über das Dopplerspektrum können Fluss-Signale akustisch und graphisch dargestellt werden. Von der Dopplersonde wird nicht nur eine einzige Frequenz registriert, sondern sehr viele Frequenzen erfasst. Für jede Frequenz bzw. Geschwindigkeit existiert daher eine eigene Dopplerkurve, die sich übereinandergestellt zu einem Spektrum vereinigen. Es entsteht ein Frequenzgemisch, das mit Hilfe der Fast-Fourier-Transformation aufgelöst werden kann (POULSEN-NAUTRP 2001).

Verschiedene Dopplerverfahren

Um die Bewegungen von Blutkörperchen zu messen, gibt es zwei unterschiedliche Grundtypen des Doppler-Ultraschalls: Das CW-Dopplerverfahren (C = continuous, engl., kontinuierlich; W = wave, engl., Welle) und das PW-Dopplerverfahren (P = pulsed, engl., gepulst; W = wave, engl., Welle). Beide Verfahren werden mit dem B-Bildverfahren kombiniert.

CW-Dopplerverfahren

Bei der Continuous-Wave-Doppler-Echographie werden über einen Sendekristall kontinuierlich Schallwellen ausgesandt. Ein weiterer Kristall (Empfänger) registriert die reflektierten Signale. Die Echos entstehen an bewegten Objekten über die gesamte Eindringtiefe. Aus diesem Grund ist eine genaue Tiefenzuordnung ausgeschlossen. Verschiedene sich überlagernde Flussereignisse können simultan analysiert werden (FEHSKE 1988). Die Vorteile dieses Verfahrens liegen in der Darstellung von hohen Blutflussgeschwindigkeiten. Eine zweidimensionale Darstellung ist nicht möglich. Deshalb wird diese Methode vor allem in der Kardiologie und zur Bestimmung von Gefäß-Stenosen angewendet (POULSEN-NAUTRP 2001). Der CW-Doppler kann also als eine kontinuierliche Messung über die gesamte eindimensionale Mess-Strecke bezeichnet werden (LUTZ 1989).

PW-Dopplerverfahren

Das gepulste Dopplerverfahren wurde entwickelt, um sich überlagernde Strömungsrichtungen und -geschwindigkeiten analysieren zu können. Bei dieser Methode ist nur ein Kristall vorhanden, der sowohl Impulse aussendet als auch empfängt. Es wird jeweils nur ein einzelner

sehr kurzer Impuls ausgesendet und die Laufzeit der Schallwelle bis zu einer bestimmten Tiefe (Reflexionsort) und die Zeit die der Schall von dieser Tiefe zurück zur Sonde braucht registriert. Die Häufigkeit, mit der die Impulse ausgesendet werden, bezeichnet man als Puls-wiederholungsfrequenz (PRF). Diese ist abhängig von der gewünschten Messtiefe. Mit Hilfe eines Analyse-Fensters, bzw. Dopplertores werden nur die Reflexionen aus einer bestimmten Tiefe analysiert. Das Dopplertor öffnet nur für einen bestimmten Zeitraum. Erst wenn der ausgesandte Schall ausgewertet worden ist, kann ein neuer Impuls losgeschickt werden. Dadurch ergibt sich eine eindeutige Tiefenzuordnung. Vorteile dieses Systems sind der genau festgelegte Messbereich und die Möglichkeit eine Winkelkorrektur durchführen zu können. Dadurch ist keine exakt parallele Anschallung der Gefäße notwendig. Ein Nachteil besteht darin, dass sehr hohe Geschwindigkeiten nicht mehr genau erfasst werden können und das sogenannte Messvolumen auf einen einzigen Bereich beschränkt ist (EVANS und MCDICKEN 2000).

Farbkodiertes Dopplerverfahren

Beim farbkodierten Dopplerverfahren wird das zweidimensionale Strömungsbild durch Farbkodierung dem zweidimensionalen statischen B-Bild aufgelagert. Die Geschwindigkeitsdaten werden auf dem gesamten Schnittbild erfasst und als farbige Punkte wiedergegeben (BARR 1992). Dieses Verfahren dient vor allem der qualitativen Darstellung von Blutströmung, das bedeutet, dass die Farbe und die Farbintensität wie auch die Richtung und die Geschwindigkeit der Strömung wiedergegeben werden. Mit diesem System ist es möglich, eine exakte Zuordnung des jeweiligen Gefäßes zu treffen. Im Gegensatz zu herkömmlichen Duplex-Systemen baut ein Farbduplexgerät nicht nur ein Messvolumen, sondern eine Vielzahl von Messvolumina auf. Eine mit mehreren Sample volumes ausgestattete Dopplerlinie wird über das B-Bild gefahren. Innerhalb des Farbdopplerfensters wird das Bild zum einem von Dopplerlinien und zum anderem von B-Bildlinien aufgebaut. Durch B-Bildlinien wird ein herkömmliches Grauwertbild hergestellt, durch die Dopplerlinien erfolgt die Darstellung der Blutflussgeschwindigkeit. Die Strömungsinformation kann flächenhaft dargestellt werden. Auf diese Weise gibt es einen raschen Überblick über die hämodynamischen Verhältnisse im Untersuchungsgebiet. Die Farbzuzuordnung alleine erlaubt jedoch keine genaue quantitative Bestimmung von Strömungsgeschwindigkeiten, ist aber zum Auffinden der Gefäße wichtig (KOPP und LUDWIG 2001).

Anwendung

Besonders in der Arterioskleroseforschung und in diesem Zusammenhang auch in der Diabetesforschung nimmt die Ultraschalldiagnostik einen wichtigen Platz ein, da Veränderungen an Gefäßwänden und dadurch bedingte Blutflussänderungen sehr genau dargestellt werden können (WICKLINE et al. 1993, ALLOT et al. 1999, CHIESA et al. 2001).

Das farbkodierte Dopplerverfahren wird vor allem zum Auffinden und zur Bestimmung einzelner Gefäße verwendet. Mit dem gepulsten Dopplerverfahren können anschließend der systolische und diastolische Blutfluss in den arteriellen Gefäßen gemessen und berechnet werden (POULSEN-NAUTRUP 2001). Wichtig ist es, den Messbereich exakt zu wählen. Bei korrekter Positionierung des Schallkopfes ist das Gefäßlumen vollständig mit Farbe ausgefüllt, die Gefäßumgebung jedoch frei von Farbsignalen. Auch sollte die farbkodierte Strömungsdarstellung nicht auf die Gefäßwand übergreifen (KOPP und LUDWIG 2001). In der Regel erscheint das auf den Schallkopf zufließende Blut rot, das von der Sonde wegströmendes Blut blau, während die Turbulenzen gelb bis grün auf dem Monitor dargestellt werden. Je schneller die Blutflussgeschwindigkeit ist, desto heller zeigt sie sich auf dem Bildschirm. Da aufgrund laminarer parabolischer Strömungsverhältnisse die Flussgeschwindigkeit in der Mitte des gesunden Gefäßes immer am höchsten ist, stellt sich dieser Gefäßbereich heller dar als die Randgebiete (POULSEN-NAUTRUP 2001). Wenn die Bestimmung der maximalen Blutflussgeschwindigkeit mit Hilfe der gepulsten Dopplersonographie erfolgt, muss das Messvolumen oder sample volume dabei zentral in das Gefäß gelegt werden und beträgt etwa $2/3$ des Gefäßdurchmessers (KOPP und LUDWIG 2001). Die Dopplersonographie nimmt als nicht invasive Technik eine wichtige Rolle in der Diagnostik ein. Sie wird vor allem zur Messung und Untersuchung von Blutflussgeschwindigkeiten und Strömungstypen (laminar oder turbulent) in den Gefäßen und den Herzkammern verwendet (BARR 1992). Die Ergebnisse können mit bekannten Flussprofilen der Gefäße verglichen werden (FEHSKE 1988).

3 EIGENE UNTERSUCHUNGEN

3.1 Zielsetzung der Studie

Die Sekundärerkrankungen des Diabetes mellitus stellen ein großes Problem dar. Besonders die im Verlauf der Erkrankung entstehenden Gefäßveränderungen tragen zu einer Verschlechterung des Allgemeinbefindens und einer verkürzten Lebenserwartung bei. Aufgrund der diabetischen Makroangiopathien kann Arteriosklerose mit der Folge von Angina pectoris, Herzinfarkt, Schlaganfall und peripheren Durchblutungsstörungen auftreten. Diabetische Mikroangiopathien führen dagegen zu Komplikationen wie diabetische Retinopathie, Nephropathie und Polyneuropathie. Aus diesem Grund erscheint es sinnvoll, ein Antidiabetikum mit zusätzlich vasodilatierendem Effekt einzusetzen. In den folgenden Untersuchungen soll überprüft werden, ob der antidiabetisch wirkende *Hintonia-latiflora*-Extrakt einen Einfluss auf das Gefäß-System ausübt. Für die pharmakologische Untersuchung Herz-Kreislauf-wirksamer Substanzen stehen im Prinzip drei Arten von Testmodellen zur Verfügung: In-vivo-Versuche am lebenden Tier, In-vitro-Versuche an isolierten Organen und In-vitro-Versuche an einzelnen Zellen bzw. Zellbestandteilen.

Mit Hilfe dieser Verfahren soll eine definitive Aussage über einen vasodynamischen Effekt dieses Extraktes sowohl am isolierten Organ, an einzelnen Zellen als auch am lebenden Tier gemacht werden. In-vitro-Versuche am isolierten Organ wie der Aorta sollen die Wirkung des Extraktes auf die mechanische Funktion des glatten Gefäßmuskels zeigen. Versuche an einzelnen Zellen helfen den Wirkungsmechanismus zu klären. In-vivo-Versuche am lebenden Tier beschreiben den Effekt der Testsubstanz auf das Gefäß-System des Organismus. Im Vordergrund stehen die Untersuchungen der Vasodynamik von Aorta abdominalis und A. carotis communis. Als Parameter zur Herzkreislauf-Überwachung werden die intraarterielle Messung des Blutdruckes und die Herzfrequenz gewählt. Zusätzlich dazu wird die antidiabetische Wirkung anhand der Blutzuckerwerte überprüft. Die Untersuchungen sollen dazu beitragen, antidiabetisch wirkende Arzneimittel zu finden, mit denen Sekundärerkrankungen des Diabetes mellitus erfolgreicher behandelt werden können.

In-vitro-Untersuchungen:

- Meerschweinaorten-Kontraktionsversuche:
 - Noradrenalin-induzierte Kontraktion
 - Kalium-induzierte Kontraktion

- Meerschweinchenpapillarmuskel-Kontraktionsversuche

- Fluoreszenzmikroskopische Untersuchungen der intrazellulären Ionenkonzentration

In-vivo-Untersuchungen

- Sonographische Untersuchungen von Kaninchen an:
 - Aorta abdominalis
(Gefäßdurchmesser, maximale systolische und enddiastolische Blutflussgeschwindigkeit)

 - Arteria carotis communis
(Gefäßdurchmesser, maximaler systolische und enddiastolische Blutflussgeschwindigkeit)

- Herz-Kreislauf-Parameter
 - intrarterieller mittlerer Blutdruck
 - Herzfrequenz

- Blutzuckerspiegel

3.2 Material und Methoden

3.2.1 In-vitro-Messungen an isolierten Aortenringen

3.2.1.1 Versuchstiere für die In-vitro-Versuche

Für die Versuche werden Meerschweinchen (Fa. Charles River, Kisslegg) beiderlei Geschlechts mit Körpergewichten zwischen 250 bis 300 g verwendet.

Die Tiere werden im Tierstall des Instituts für Pharmakologie und Toxikologie der TU München in Gruppen von jeweils 6 Tieren gehalten. Die Haltung erfolgt in Käfigen mit gelochtem Bodenbereich, wobei Papier als Versteck- und Rückzugsmöglichkeit zur Verfügung gestellt wird. Im Tierstall herrscht eine gleichmäßige Temperatur von 21°C, bei einer relativen Luftfeuchte zwischen 50 bis 60 %. Eine 12-stündige Hell-Dunkelphase mit einer Beleuchtungsintensität von 50 bis 100 Lux während der Tagphase und völlige Dunkelheit während der Nachtphase wird durch einen automatischen Beleuchtungswechsel gewährleistet. Es steht pelletiertes Alleinfutter und Wasser ad libitum zur Verfügung.

3.2.1.2 Verwendete Substanzen

Badlösungen

Für die Herstellung der Stammlösungen wird demineralisiertes Wasser verwendet.

Während des Versuches werden die Badlösungen auf 35°C temperiert und mit Carbogen (95 % CO₂/ 5 % O₂) begast.

Als Badlösung dient bei allen Aortenversuchen eine modifizierte Krebs-Henseleit-Lösung mit 2,0 mM Calcium

Tabelle 4: Modifizierte Krebs-Henseleit-Lösung (Konzentration in mM)

| | |
|---------------------------------|-------|
| NaCl | 115,0 |
| KCl | 2,8 |
| CaCl ₂ | 2,0 |
| NaHCO ₃ | 25,0 |
| KH ₂ PO ₄ | 1,2 |
| MgCl ₂ | 1,2 |
| Glucose | 10,0 |

Noradrenalin

Eine 10 mM Stammlösung Noradrenalin (\pm -Noradrenalin-Hydrochlorid, Fa. Sigma, Deisenhofen) wird durch Lösen von 20,56 mg Noradrenalin in 10 ml Wasser hergestellt.

Ascorbinsäure

Für die Herstellung der Stammlösung wird Ascorbinsäure (Fa. VWR, Merck, Darmstadt) in Wasser in einer Menge von 250 mg in 10 ml Wasser gelöst. Es liegt in einer Konzentration von 150 mM vor. Ascorbinsäure wird sowohl zur Noradrenalin-Lösung als auch zur Badlösung, kurz vor Beginn des Versuches zugegeben, um eine Oxidation von Noradrenalin zu verhindern.

Kalium-Chlorid-Lösung

Die Konzentration der KCl-Stammlösung beträgt 1,875 M.

3.2.1.3 Testsubstanzen

Hintonia latiflora Extrakt

Der für die Untersuchung eingesetzte Extrakt stammt aus *Hintonia latiflora* Rinde (zur Verfügung gestellt durch Fa. Gehrlicher GmbH & Co KG, Pharmazeutische Extrakte Eurasburg/Obb.). Es handelt sich um einen Spissum-Nativextrakt (Charge Nr. 7618), der eine dunkelbraune Farbe, zähflüssige Konsistenz, einen fruchtigen Geruch und einen bitteren Geschmack besitzt.

Zur Herstellung des Extraktes wird die Rinde der buschartig wild wachsenden *Hintonia latiflora* Pflanze benützt. Als Extraktionsmittel dient Ethanol 32 % V/V (Ethanol-Wassergemisch 32:68) und Aqua purificata für den wässrigen Auszug (2. Phase). Der angegebene Wassergehalt nach Karl Fischer (Europäische Pharmakopoe) liegt bei 26,7 % m/m. Der mit HPLC bestimmte Gehalt an Coutareagenin beläuft sich auf 12,9 % (m/m) (Analysen-Zertifikat der Fa. Gehrlicher GmbH & Co 2003). Die Konzentrationsangaben erfolgen in $\mu\text{g/ml}$ da das Molekulargewicht des Extraktes nicht zu bestimmen ist. Zur Herstellung der Stammlösung werden 10 mg Extrakt in 1 ml 50 %-igem Ethanol (Ethanol-Wasser Gemisch 50:50) gelöst. Anschließend wird ein Teil dieser Lösung für eine Stunde in ein Ultraschallbad verbracht und im Verhältnis 1:4 mit 50 %-igem Ethanol weiter verdünnt (Konzentration 2,5 mg/ml). Nach einem festgelegten Pipettierschema (siehe Tabelle 5 bis 7) werden die Lösungen dem Versuchsbad zugegeben.

Coutareagenin

Synthetisch hergestelltes Coutareagenin stammt von der Fa. Gehrlicher GmbH & Co, Eurasburg/Obb.. Die für die Versuche verwendete Coutareagenin-Stammlösung weist eine Konzentration von 5 mg/ml auf. Als Lösungsmittel eignet sich 50 %-iges Ethanol. Um eine vollständige Auflösung zu gewährleisten, wird das Coutareagenin-Alkohol-Gemisch in einem Reaktionsgefäß für eine Stunde mit Ultraschall behandelt.

Milrinon

Zur Beurteilung der Gefäßwirkung der beiden Testsubstanzen wird der Phosphodiesterase-Hemmer Milrinon (Fa. Sigma, Deisenhofen), der eine vasodilatative Wirkung besitzt, als Referenzsubstanz verwendet. Zur Herstellung der 10 mM Stammlösung werden 2,1 mg/ml Milrinon eingewogen.

3.2.1.4 Versuchsaapparatur

Die Versuchsaapparatur beinhaltet sechs identische Mess-Stationen mit sechs Organbädern, die jeweils ein Badvolumen von 5 ml aufweisen (Versuchsaufbau: Abbildung 11). Das Organbad, ein zylindrisches 1-Kammergefäß aus Borsilikatglas (Fa. TSE, Bad Homburg), besitzt im unteren Teil ein Häkchen aus Wolframdraht, das der Fixierung der Aortenringe dient. Im unteren Teil jedes Gefäßes befindet sich außerdem eine Glasfritte mit Schlauchanschluss, über den die Badlösung kontinuierlich begast werden kann. Zusätzlich ist ein weiterer Anschluss zum Absaugen der Badlösung vorhanden. Ein etwa 2 mm breiter Aortenring wird zwischen zwei S-förmige Stahlhäkchen vertikal eingespannt. Dabei erfolgt die Fixierung des unteren Häkchens an dem Wolframdrahthäkchen, während das obere Häkchen über einen Ring und ein 10 cm langes Goldkettchen mit einem induktiven Kraftaufnehmer (Q11, 10p, Fa. Hottiger Baldwin Messtechnik, Darmstadt) verbunden ist (HOOKER et al. 1977). Die mit Hilfe des induktiven Kraftaufnehmers gewonnenen Mess-Signale können auf dem Monitor eines Oszilloskopes (Fa. Tektronix, Typ 5111A, Beaverton, Oregon, USA) dargestellt werden. Die Übertragung der Signale auf einen Computer erfolgt über einen Analog-Digital-Wandler (Fa. Keithley, Typ DAS-1602, Germering) mit dem EDV-Programms ASYST-Software (Fa. Keithley, Germering). Mit diesem Programm wird auch die Auswertung der aufgezeichneten Signale durchgeführt.

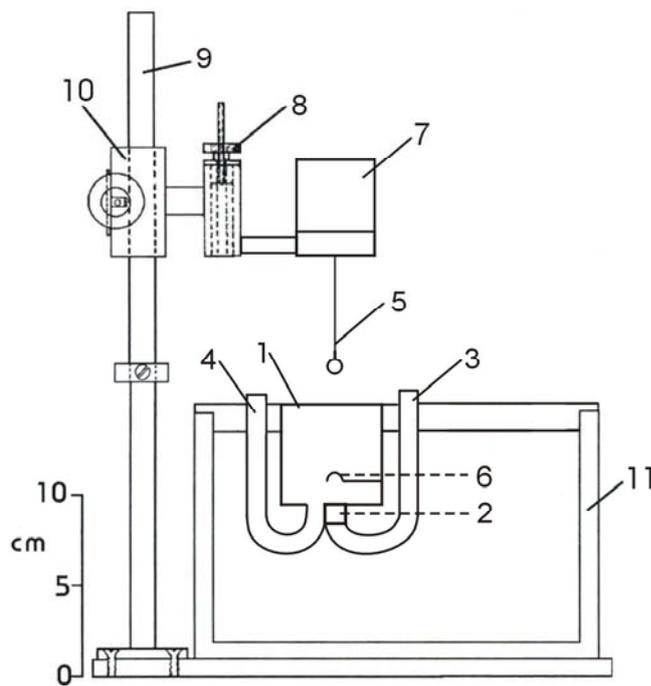


Abbildung 11: Versuchsanordnung zur Messung der Kontraktionskraft isolierter Aortenringe.

- | | |
|----|------------------------------------|
| 1 | Muskelkammer |
| 2 | Glasfritte |
| 3 | Gaszufuhr |
| 4 | Absaugvorrichtung |
| 5 | Kette mit Ring |
| 6 | Badhäkchen zur Präparatbefestigung |
| 7 | Induktiver Kraftaufnehmer |
| 8 | Feintrieb für Vorspannung |
| 9 | Stativ |
| 10 | Stativschlitten |
| 11 | Wasserbad |

3.2.1.5 Versuchsvorbereitung

Das Wasserbad mit den Organbädern wird mit einer Heizspirale auf 35°C erwärmt. Zur Befestigung der Organbäder im Wasserbad dienen Plexiglasplatten, die in das Wasserbad eingehängt sind. Die Organbäder werden mit jeweils 5 ml modifizierter Krebs-Henseleit-Lösung aufgefüllt. Die Wärmeabgabe des Wassers hat zur Folge, dass sich auch die Lösung in den Organbädern auf 35°C erwärmt. Gleichzeitig verfügt jedes Organbad über einen eigenen Schlauchanschluss, über den Carbogen (95 % CO₂/5 % O₂) einströmt, wodurch eine Sättigung der Badlösung mit Carbogen erreicht wird.

Präparation

Das Meerschweinchen wird durch Concussion getötet (CLOSE et al. 1997). Nach Eröffnung der Brusthöhle und Entfernen des Herzens und der Lunge wird der thorakale Anteil der Aorta entnommen und das Gefäß in einen runden Präparierbehälter mit kalter, sauerstoffgesättigter Krebs-Henseleit-Lösung (2,0 mM Ca²⁺) verbracht. Das Gefäß wird zunächst von Fett- und Bindegewebe befreit und anschließend in etwa 2 mm breite Ringe geschnitten.

Befestigung, Vorspannung und Einlaufzeit der Aortenringe

Nach der Präparation wird der Aortenring zwischen dem Wolframdraht am Boden des Organbades und dem Ring, der an der Goldkette befestigt ist, vertikal eingespannt.

Nachdem alle Aortenringe ordnungsgemäß befestigt sind, erfolgt durch Drehen am Feintrieb der Versuchsapparatur die exakte Einstellung der Vorspannung. Diese wird auf 9,8 mN eingestellt. Die Mess-Signale der verschiedenen Muskeln werden mit Hilfe eines Oszilloskopes beobachtet. Unter wiederholtem Wechsel der Badlösung (alle 20 min) wird über eine Stunde äquilibriert. Während dieser Zeit relaxieren die Muskeln etwas, werden aber durch Nachstellen der Vorspannung auf 9,8 mN gehalten.

Funktionsprüfung mit Kalium-Chlorid-Lösung

Nach ausreichender Äquilibrierung werden die Aortenringe einer Funktionsprüfung unterzogen. Durch Zugabe von 80 µl KCl-Lösung aus einer 1,875 M Lösung wird die Konzentration in der Badlösung auf 30 mM KCl erhöht, um so die Kontraktibilität der Muskeln zu überprüfen. Für die nachfolgenden Untersuchungen werden nur solche Muskeln verwendet, die nach Zugabe der KCl-Lösung einen Anstieg der Kontraktionskraft um mehr als 4 mN aufweisen. Anschließend wird die KCl-Lösung durch Wechseln der Badlösung wieder aus-

gewaschen. Weitere 30 Minuten lang werden die Aortenringe unter wiederholtem Wechseln der Badlösung (alle 15 min) und Nachstellen der Vorspannung reäquilibriert.

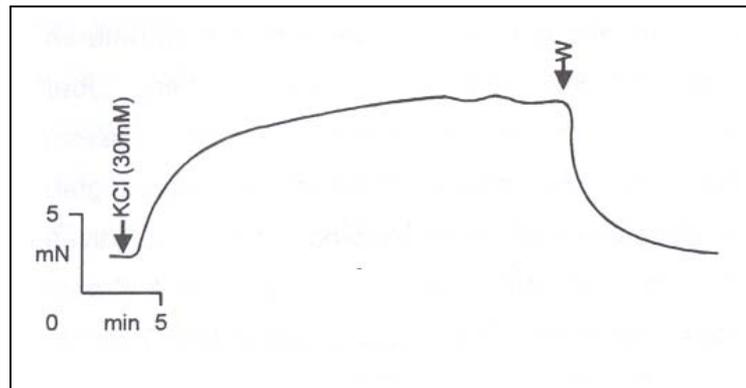


Abbildung 12: Typischer zeitlicher Verlauf einer durch Kalium (30 mM) induzierten Kontraktion am Aortenring des Meerschweinchens; W = Auswaschen.

3.2.1.6 Versuchsdurchführung

Noradrenalin-vorkontrahierte Präparate

Durch Zupipettieren von 5 μl einer 10 mM Noradrenalin-Lösung zu 5 ml Badlösung erreicht man eine Endkonzentration von 10 μM Noradrenalin. Der Noradrenalin-Lösung wird zuvor Ascorbinsäure in einer Endkonzentration von 30 μM zugesetzt, um eine oxidative Umwandlung von Noradrenalin zu vermeiden. Nach einer Inkubationszeit von 20 Minuten sind die Muskeln konstant vorkontrahiert (steady state) und die Zugabe der Testsubstanzen kann beginnen.

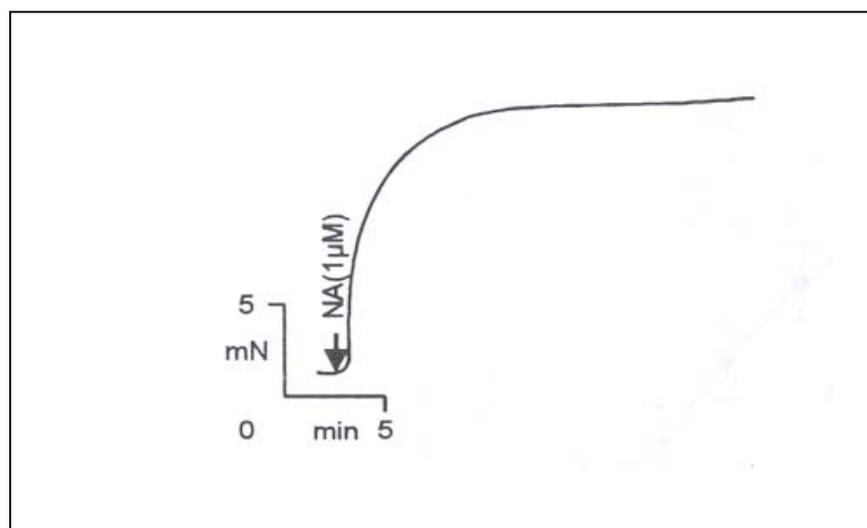


Abbildung 13: Typischer Verlauf einer durch Noradrenalin (1 μM) induzierten Kontraktion am Aortenring des Meerschweinchens.

Zugabe der Testsubstanzen

Der Hintonia-latiflora-Extrakt, Coutareagenin und Milrinon werden nach dem folgenden Schema (Tabelle 5, 6, 7) zupipettiert. Zwischen den einzelnen Zugaben kann eine Wartezeit bis zu 50 Minuten entstehen, bis alle Muskeln ihr steady state erreicht haben.

Tabelle 5: Pipettierschema Hintonia-latiflora-Extrakt

| Zugabe zu 5 ml Badlösung (µl) | Stammlösung (g/l) | Konzentration in 5 ml Badlösung (µg/ml) |
|-------------------------------|-------------------|---|
| 20 | 10 | 40 |
| 10 | 2,5 | 45 |
| 10 | 2,5 | 50 |
| 10 | 2,5 | 55 |
| 10 | 2,5 | 60 |
| 10 | 2,5 | 65 |

Tabelle 6: Pipettierschema Coutareagenin

| Zugabe zu 5 ml Badlösung (µl) | Stammlösung (g/l) | Konzentration in 5 ml Badlösung (µg/ml) |
|-------------------------------|-------------------|---|
| 15 | 5 | 15 |
| 5 | 5 | 20 |
| 10 | 5 | 30 |
| 10 | 5 | 40 |
| 10 | 5 | 50 |
| 10 | 5 | 60 |

Tabelle 7: Pipettierschema Milrinon

| Zugabe zu 5 ml Badlösung (µl) | Stammlösung (mM) | Konzentration in 5 ml Badlösung (µM) | Konzentration in 5 ml Badlösung (µg/ml) |
|-------------------------------|------------------|--------------------------------------|---|
| 5 | 1 | 1 | 0,21 |
| 10 | 1 | 3 | 0,63 |
| 3,5 | 10 | 10 | 2,11 |
| 10 | 10 | 30 | 6,34 |
| 35 | 10 | 100 | 21,12 |
| 100 | 10 | 300 | 63,36 |

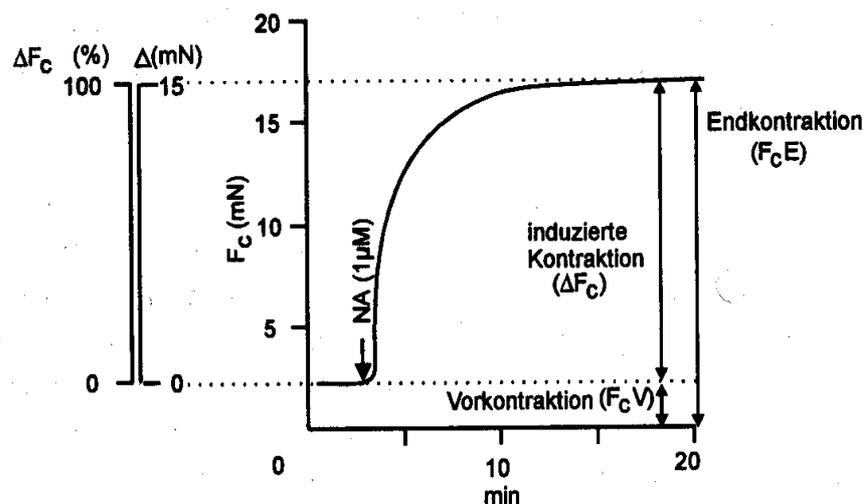
3.2.1.7 Kalibrierung

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

3.2.1.8 Auswertung

Die nach Zugabe von Noradrenalin induzierte Kontraktionskraft (ΔF_c) ist als Differenz zwischen der Vorkontraktion (F_{cV} , Kraftwert vor Zugabe) und der Endkontraktionskraft (F_{cE} , nach Erreichen des steady state) definiert.

Die durch Noradrenalin induzierte Kontraktionskraft (ΔF_c) wird mit 100 % gleichgesetzt. Nach Zugabe der Testsubstanz wird die jeweils verbleibende induzierte Kontraktionskraft (ΔF_c) gemessen und in Relation zum Ausgangswert (100 %) gesetzt.



- F_c gemessene Kontraktion
- F_{cV} Kontraktionskraft der Vorkontraktion vor Zugabe von Noradrenalin
- F_{cE} Kontraktionskraft der Endkontraktion nach Zugabe von Noradrenalin
- ΔF_c induzierte Kontraktion in mN oder % der Ausgangskraft aus der Differenz von Endkontraktion und Vorkontraktion

Abbildung 14: Auswertung der Kontraktionskurven von Aortenringen am Beispiel einer Noradrenalin-induzierten Kontraktion.

3.2.2 In-vitro-Messungen am isolierten Papillarmuskel

3.2.2.1 Geräte und Versuchsaufbau

Für die Papillarmuskelversuche wird ein ähnlicher Versuchsaufbau wie zur Kontraktionsmessung an der Aorta benutzt. Die verwendeten Organbäder mit einem Volumen von 50 ml, besitzen zwei, durch einen Kanal miteinander verbundene Kammern. Die eine Kammer dient der Aufnahme des vertikal eingespannten Muskels (Muskelkammer), die andere Kammer (Sättigungsgefäß) ist über eine Glasfritte mit einem Schlauch verbunden, über den kontinuierlich Carbogen in die Badlösung einströmt. Die Muskelkammer erhält keine direkte Begasung, um eine mechanische Artefaktbildung zu vermeiden. Durch die Begasung des Sättigungsgefäßes kommt es zu einer kontinuierlichen Zirkulation der Badlösung, so dass ständig Carbogen-gesättigte Lösung in die Muskelkammer einfließt. Das Wasserbad wird auf einer konstanten Temperatur von $35,0^{\circ}\text{C} \pm 0,5^{\circ}\text{C}$ gehalten. Um die Kontraktionskraft messen zu können ist ein induktiver Kraftaufnehmer (Q11, 10p, Fa. Hottinger Baldwin Messtechnik, Darmstadt) notwendig. Dieser steht über ein Goldkettchen, an dessen Ende eine Mikroklammer aus V 2 A-Stahl befestigt ist, mit dem eingespannten Muskel in Verbindung.

Darüber hinaus ist ein Stativ mit Stativschlitten vorhanden, an dem über einen Feintrieb ein Reizfuß mit Muskelhalterung und Reizelektrode befestigt ist.

Das Reizgerät ist ein im Haus eigens hergestelltes Gerät, das den Reizimpuls über zwei Platin-Elektroden im Reizfuß auf den Muskel überträgt. Die Signale, die über den induktiven Kraftaufnehmer registriert werden, können auf dem Monitor eines angeschlossenen Oszilloskopes (Fa. Tektronix, Typ R 561 B, Beaverton Portland, Oregon, USA) sichtbar gemacht und fotografiert werden. Gleichzeitig werden die Mess-Signale über den Zeitraum des gesamten Versuches mit Hilfe eines Pigmentschreibers (Fa. Hellige, Freiburg), mit einer Papiervorschub-Geschwindigkeit von 0,25 mm/s aufgezeichnet. Für die Beurteilung der Kontraktionskurven kann die Schreibergeschwindigkeit auf 250 mm/s umgeschaltet werden.

3.2.2.2 Versuchsdurchführung

Präparation, Einspannen, Vorspannen

Für den Versuch werden Meerschweinchen (Fa. Charles River, Kisslegg) beiderlei Geschlechts mit Körpergewichten zwischen 250 bis 300 g verwendet. Die Tötung der Tiere erfolgt durch Concussion. Nach sofortiger Eröffnung des Thorax wird das Herz freipräpariert und entnommen. Unmittelbar danach wird es in kalte modifizierte Krebs-Henseleit-Lösung (3,2 mM Ca²⁺) (siehe Tabelle 4) verbracht. Nach Entfernung des Herzbeutels und der beiden Vorhöfe wird die rechte Herzkammer mit einem Schnitt entlang des Septums eröffnet. Die Präparation eines Papillarmuskels erfolgt unter möglichst geringer Dehnung. Es wird sowohl ein kleiner Teil des Herzklappenrandes an der Muskelsehne als auch ein kleiner Teil der Kammermuskulatur an der Muskelbasis belassen. Dabei werden nur Muskeln mit einem Durchmesser unter 1 mm verwendet, da sonst keine ausreichende Sauerstoffdiffusion gewährleistet werden kann, die aber für die empfindlichen inotropen Messungen unbedingt nötig ist (KOCH-WESER 1963).

Die Basis des Papillarmuskels mit dem Restanteil der Kammermuskulatur wird am Reizfuß befestigt und die Sehne mit dem Anteil der Herzklappe durch die Mikroklammer über das Goldkettchen mit dem induktiven Kraftaufnehmer verbunden.

Es erfolgt nun ein Absenken der gesamten Organhalterung in die Muskelkammer des Organbades. Mit Hilfe des Feintriebs, der den Abstand zwischen Reizfuß und Kraftaufnehmer reguliert, wird der Muskel auf 3,9 mN vorgespannt. Nach dem Präparieren und Einspannen werden die Papillarmuskeln bei einer Stimulationsfrequenz von 1 Hz für etwa eine Stunde äquilibriert. Anschließend beginnt die kumulative Zugabe der Testsubstanz.

Tabelle 8: Pipettierschema Hintonia-latiflora-Extrakt

| Zugabe zu 50 ml Badlösung (µl) | Stammlösung (g/l) | Konzentration in 50 ml Badlösung (µg/ml) |
|--------------------------------|-------------------|--|
| 50 | 10 | 10 |
| 100 | 10 | 30 |
| 20 | 100 | 70 |
| 15 | 100 | 100 |
| 100 | 100 | 300 |

3.2.3 In-vitro-Calcium-Ionenbestimmung

3.2.3.1 A10-Zellen

Die Züchtung der für den Versuch benötigten A10-Zellen erfolgt im Institut für Pharmakologie und Toxikologie der Technischen Universität München. Als Ursprungszellen dienen isolierte Aortenzellen der Ratte bezogen von der DMSZ (Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen), Braunschweig.

3.2.3.2 Zellkultur

Die folgenden Schritte finden im Allgemeinen unter sterilen Bedingungen in einer sterilen Werkbank unter Laminar-Air-Flow (Hera Safe, Fa. Heraeus, München) und unter Beachtung der üblichen Arbeitsregeln statt.

Auftauen und Kultivierung

Die Lagerung der Zellen erfolgt in einem Kryoröhrchen bei -70°C im Tiefkühlschrank. Bei Bedarf werden die A10-Zellen nach einem bestimmten Verfahren vorsichtig aufgetaut: Nach Entnahme aus dem Gefrierschrank wird zunächst abgewartet, bis sich bei Zimmertemperatur eine Schmelzschicht im obersten Bereich des Röhrchens bildet. Anschließend stellt man das Röhrchen für 20 Minuten in ein mit kaltem Wasser gefülltes Glas. Der letzte Schritt des Auftauens erfolgt über 20 Minuten in einem 37°C warmem Wasserbad. Nach dem Auftauen werden die Zellen in der sterilen Werkbank sorgfältig resuspendiert und in ein Zentrifugenröhrchen (15 ml) überführt. Zusätzlich zu der Zellsuspension werden 5 ml DMEM-Medium in das Röhrchen gegeben. Die anschließende Zentrifugation erfolgt bei 800 Umdrehungen/min über 5 Minuten bei Raumtemperatur.

Danach wird unter Laminar-Air-Flow der Überstand mit einer Pipette abgesaugt. Die im unteren Teil des Gefäßes liegenden Zellen lassen sich durch Zugabe von 1 ml Medium wieder lösen und in eine 25 cm^2 Gewebekulturflasche (Fa. Greiner Labortechnik, Frickenhausen) geben. Diese wird mit 10 ml Medium (DMEM) aufgefüllt. Anschließend wird die Flasche in den Brutschrank verbracht und bei einer Temperatur von 37°C und bei 6,0 % CO_2 bebrütet. Nach ca. 12 Stunden setzen sich die freischwimmenden Zellen am Boden der Gewebekulturflasche ab und bilden eine feste Haftung am Boden aus.

Am darauffolgenden Tag findet ein Mediumwechsel statt, um das beim Einfrieren verwendete DMSO, das nach dem Auftauen bei länger dauernder Einwirkung zelltoxisch wirken kann, zu entfernen. Dabei werden auch tote Zellen und Zelltrümmer mit abgesaugt.

In den nächsten Tagen erfolgt eine tägliche mikroskopische Kontrolle bzw. Beurteilung der Zellen. Je nach Wachstumsrate wird das Medium in den darauffolgenden Tagen ca. alle 3 bis 4 Tage gewechselt. Sobald etwa 70 bis 80 % des Flaschenbodens komplett mit Zellen bedeckt sind, bedarf es einer Zellpassage. Hierbei wird das Medium unter sterilen Bedingungen vorsichtig abgesaugt. Danach werden die Zellen mit 5 ml PBS umspült und gewaschen. Anschließend wird das PBS wieder entfernt.

Der nächste Schritt besteht darin, 1 ml Trypsin/EDTA-Lösung in die Flasche zu geben. Bei gleichzeitigem Hin- und Herschwenken und vorsichtigem Beklopfen der Flasche lösen sich die Zellen vom Boden ab. Durch Zugabe von 9 ml Medium wird die Trypsinkonzentration vermindert, damit es zu keiner Schädigung der Zellen kommt.

Mit einer Pipettierhilfe wird das Medium ca. 20-mal in eine 10 ml Pipette aufgezogen und wieder abgegeben um dadurch die Zellen zu resuspendieren. Schließlich werden 2 ml des Mediums in der Flasche belassen und die restlichen 8 ml zu je 2 ml auf neue Gewebekulturflaschen verteilt.

Herstellung von Gefrierstocks

Zur Konservierung der Zellen werden Gefrierstocks von den in Kultivierung befindlichen Zellen angefertigt. Nach Ablösung von der Flaschenwand, Inaktivierung des Trypsin durch Mediumzugabe und Vereinzelung der Zellen wird die Zellsuspension für 10 Minuten bei 1000 Umdrehung/min zentrifugiert. Nun erfolgt die Zugabe von 9 Teilen DMEM und 1 Teil DMSO. Die Zellen werden nochmals resuspendiert, anschließend auf Kryoröhrchen verteilt und in einer Styroporbox langsam auf -70°C heruntergekühlt. Am darauffolgenden Tag können die Röhrchen aus der Styroporbox in eine Zellaufbewahrungsbox umgesetzt werden, um sie bei -70°C bis zu einem Jahr aufzubewahren.

Aussäen der A10 Zellen

Zur Durchführung eines Experimentes müssen die Zellen unter sterilen Bedingungen auf Deckgläschen (Stärke 0, VWR International GmbH, Ismaning) gebracht werden. Vor dem Aussäen ist darauf zu achten, die Deckgläschen für 24 Stunden in 80 %-igen Alkohol einzulegen, um eine Kontamination des Brutschrankes zu vermeiden. Danach erfolgt ein Trocknen der Gläschen und ein Verteilen auf Gewebekulturschalen. Die nach der Zellpassage abgelösten und suspendierten Zellen überführt man in ein 15 ml Röhrchen und zieht sie in eine 5 ml Pipette auf. Von dieser Zellsuspension wird nun jeweils ein Tropfen auf ein

Deckglas pipettiert. Anschließend wird jede Gewebeskulturschale mit DMEM aufgefüllt und je nach Zelldichte für ein bis zwei Tage bebrütet.

3.2.3.3 Verwendete Substanzen

Fura-2/AM

Für die Herstellung einer 1 mM Fura-2/AM-Stammlösung werden 1 mg des Fluoreszenz-Farbstoffes in 1 ml DMSO gelöst und bei -20°C gelagert.

Vasopressin

Zur Herstellung der Vasopressin-Stammlösung werden 5,42 mg Vasopressin (Fa. Sigma Aldrich Chemie, Steinheim) in 5 ml Aqua bidest. eingewogen, so dass die Konzentration der Lösung 1 mM beträgt. Diese 1 mM Lösung wird auf 1 μM verdünnt und davon 2 μl in die Versuchskammer zugegeben.

Tabelle 9: Modifizierte Krebs-Henseleit-Lösung (Konzentration in mM)

| | |
|---------------------------------|-------|
| NaCl | 115,0 |
| KCl | 2,8 |
| CaCl | 1,2 |
| NaHCO ₃ | 25,0 |
| KH ₂ PO ₄ | 1,2 |
| MgCl ₂ | 1,2 |
| Glucose | 10,0 |

Coutareagenin

Coutareagenin (Fa. Gehrlicher GmbH & Co, Eurasburg/Obb.) wird in einer Stammlösung von 5 mg/ml hergestellt. Als Lösungsmittel dient 50 %-iger Alkohol.

3.2.3.4 Versuchsaufbau

Das Schema in Abbildung 15 zeigt den Aufbau und die Anordnung der Geräte zur Messung der intrazellulären Calcium-Ionenkonzentration. Für die Fluoreszenzmikroskopie wird ein inverses Mikroskop (IM 35 Fa. Zeiss, Oberkochen), das auf einem Erschütterungs-reduzierten Tisch platziert ist, verwendet. Auf dem beweglichen Objektisch befindet sich die Versuchskammer mit einem Volumen von 1 ml, dessen Boden das Deckgläschen mit den zu

untersuchenden Zellen bildet. Zusätzlich ist am Objektisch eine Pumpe mit verschiedenen Anschlüssen angebracht, mit deren Hilfe die Lösungen in der Versuchskammer gewechselt werden können. Der Schlauch der Pumpe, der in das Versuchsbad hineinführt, ist mit einer Heizung ausgestattet. Über einen Temperaturfühler, der mit einem Temperaturregelgerät (PETC 80-3S npi, Fa. npi-Polder, Tamm) verbunden ist, kann die Temperatur im Versuchsbad konstant auf 35°C gehalten werden. Des Weiteren befindet sich eine Absaugvorrichtung an der Versuchskammer. Mit Hilfe einer selbst hergestellten Glasmikropipette, die oberhalb der Versuchskammer angebracht ist und durch einen Mikromanipulator (Fa. Narishige, Osaka, Japan) exakt auf eine Zelle eingestellt werden kann, ist eine gezielte Überströmung einer einzelnen Zelle möglich.

Die Anregung und Messung der Fluoreszenz erfolgt mit Hilfe eines 2-Wellenlängen-Gerätes (AMKO Multilight, Fa. AMKO, Tornesch). Als Lichtquelle dient eine Xenon-Lampe (75 W XBO 75, Fa. AMKO, Tornesch). Das Licht wird mit einem Spiegelrad alternierend auf Interferenzfilter mit Durchlässigkeit für Licht der Wellenlängen 340 und 380 nm gelenkt und dann über einen Lichtleiter in das Mikroskop geführt. Im Strahlengang des Mikroskops ist ein halbdurchlässiger Spiegel eingelassen, der Licht der Wellenlänge unter 500 nm auf die Versuchskammer lenkt (Fura-2-Anregung bei 340 und 380 nm) und Wellenlängen größer 500 nm (Emission) durchtreten lässt, das dann auf den Single Photon Counting Detektor (Fa. AMKO, Tornesch) weitergeleitet wird.

Vor dem Single Photon Counting Detektor, der auf den Okularausgang des Mikroskops montiert ist, wird zusätzlich ein Interferenzfilter (Fa. Zeiss, Oberkochen) mit Durchgangsspektrum 510 nm vorgeschaltet. Die vom Single Photon Counting Detektor abgegebenen Signale werden über einen A/D-Wandler digitalisiert und im Computer gespeichert bzw. auf einem Monitor sichtbar gemacht. Die Steuerung des Filterrades und die Aufnahme und Auswertung der Daten erfolgt mit einem Computerprogramm der Firma AMKO. Für einen Teil der Versuche wird ein Fluoreszenzmessgerät mit schnelldurchlaufendem Monochromator und mit CCD-Kamera (Fa. Till, Martinsried) verwendet. Damit ist es möglich, zusätzlich zu den Intensitäten der Signale deren räumliche Verteilung aufzulösen.

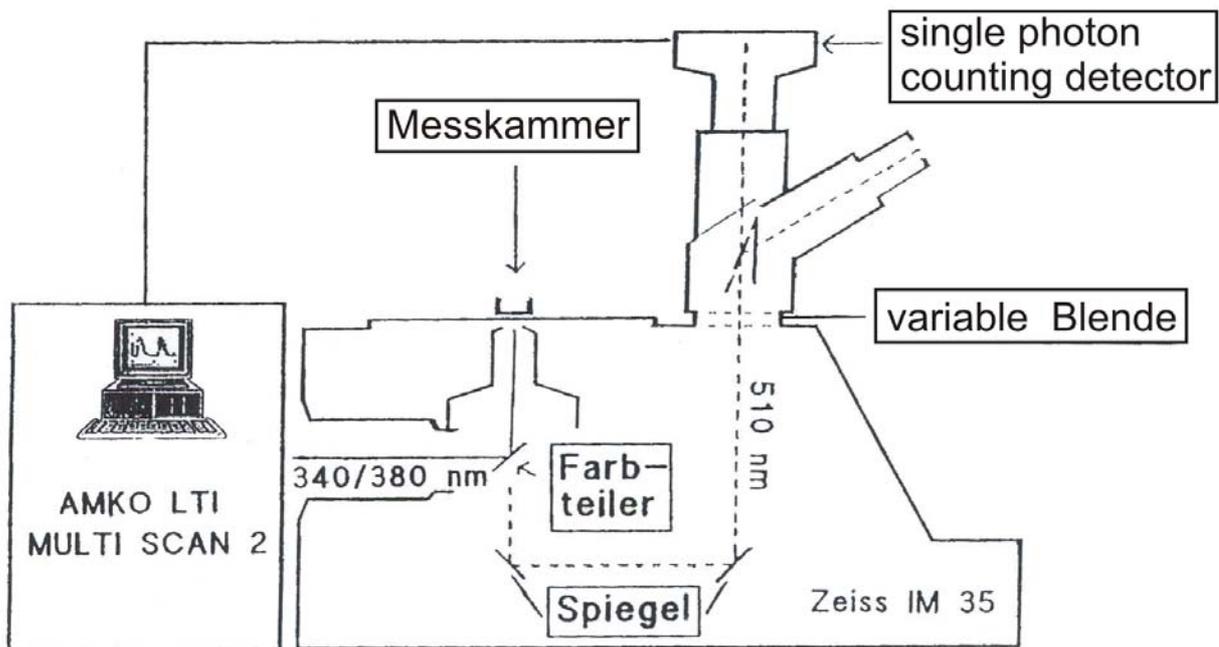


Abbildung 15: Versuchsaufbau für die fluoreszenzmikroskopische Calciummessung.

3.2.3.5 Versuchsvorbereitung

Wenn die ausgesäten Zellen in ausreichender Anzahl an das Deckgläschen angeheftet sind, kann die eigentliche Versuchsvorbereitung beginnen. Der Fluoreszenzfarbstoff Fura-2/AM (Fa. Microprobes, Eugene, Oregon, USA) ist unter Ausschluss von Tageslicht aufzutauen. Ferner ist ein Röhrchen mit 15 ml DMEM-Medium in einem Wasserbad bei 37°C aufzuwärmen. Die ausgewählten, mit Zellen bewachsenen Deckgläschen werden mit einer Pinzette in die Versuchskammern eingespannt und die Kammern mit jeweils 1 ml Medium befüllt. Danach werden die Kammern für 10 Minuten im Brutschrank bei 37°C und 6 % CO₂ inkubiert. Im Anschluss daran findet in einem abgedunkelten Versuchsraum die Beladung mit dem Farbstoff statt. Aus einer Fura-2/AM-Stammlösung (Lösungsvermittler DMSO) mit der Konzentration von 1 mM werden 8 bis 10 µl zu 1 ml modifizierter Krebs-Henseleit-Lösung (1,2 mM Ca²⁺) zugegeben und dann das Gemisch in die Versuchskammer pipettiert. Die Endkonzentration des Fura-2/AM in der Versuchskammer beträgt entsprechend 8 bis 10 µM. Dann kommt die Versuchskammer für weitere 30 Minuten in den Brutschrank. Anschließend wird die Versuchskammer auf dem Tisch des inversen Mikroskops befestigt und zur Beseitigung des überschüssigen Fura-2/AM 15 Minuten lang mit 35°C warmer modifizierter Krebs-Henseleit-Lösung perfundiert.

3.2.3.6 Versuchsdurchführung

Aufgrund der Photoinstabilität von Fura-2 ist es notwendig, in einem vollständig abgedunkelten Raum bzw. zur Messvorbereitung unter Natrium-Licht und mit Rotlichtfilter im Strahlengang des Mikroskops zu arbeiten. Um ideale Messbedingungen zu erreichen, wird die Versuchskammer kontinuierlich mit Carbogen-gesättigter, auf $35^{\circ}\text{C} \pm 0,5^{\circ}\text{C}$ temperierter Krebs-Henseleit-Lösung ($1,2\text{ mM Ca}^{2+}$) durchströmt. Die auf dem Boden der Versuchskammer befindlichen Zellen werden mit Hilfe eines Neofluar-Objektives (63-fache Vergrößerung) und Okularen (12,5-fache Vergrößerung) unter Verwendung von Öl-Immersion eingestellt. Nach Durchmusterung des gesamten Deckglases wird eine Zelle ausgewählt, die eine deutliche und gleichmäßig über die Zelle verteilte Fluoreszenz aufweist. Ziel ist es, nur eine Zelle optisch zu erfassen. Aus diesem Grund wird mit einer Rechteckblende vor dem Single Photon Counting Detektor die Umgebung der Zelle ausgegrenzt. Um die Möglichkeit einer gezielten Umspülung der ausgewählten Zelle zu garantieren, wird eine Mikropipette mit Hilfe eines Mikromanipulators direkt über bzw. neben der fokussierten Zelle platziert. An die Mikropipette ist eine Infusionspumpe mit Spritze angeschlossen. Durch Anschalten der Infusionspumpe kann durch Superfusion der Zelle ein schneller Wechsel der die Zellen umspülenden Lösung erfolgen. Die Messung erfolgt nach einem festgelegten Muster. Zunächst wird die Versuchsanordnung so eingestellt, dass die Fluoreszenz durch den Single Photon Counting Detektor registrierbar ist. Das Ergebnis ist auf einem Monitor zu sehen. Dadurch ist es möglich, die Reaktion der Zelle während des Versuches zu überwachen.

Nach einer Vorlaufzeit von 1 bis 2 Minuten, in der sich das Signal sowohl von 340 als auch von 380 nm als konstant erweisen muss, wird die Zelle mit 2 nM Vasopressin-Lösung umspült und dadurch ein vorübergehender Anstieg des intrazellulären Calciums (Calcium-Transient) ausgelöst. Auf dem Bildschirm stellt sich der Transient durch einen Anstieg des Signals bei 340 nm und ein Absinken des Signals bei 380 nm dar.

Die Einwirkdauer von Vasopressin beträgt 6 Minuten. Nach Abschalten der Superfusion wird die Lösung durch Perfusion wieder ausgetauscht und die Zelle von Vasopressin befreit. Wenn sichergestellt ist, dass die Zelle unter Vasopressin einen deutlichen Transienten zeigt, wird die gesamte Versuchskammer über einen Zeitraum von 40 Minuten mit 60 $\mu\text{g/ml}$ Coutareagenin-Lösung durchströmt. Anschließend erfolgt eine erneute Stimulation durch Vasopressin. Mit Hilfe einer CCD-Kamera kann die räumliche Calcium-Verteilung in den Zellen als Bild festgehalten werden.

3.2.3.7 Auswertung

Die bei einer Frequenz von 50 Hz gesammelten Einzelwerte der Lichtintensitäten von 340 und 380 nm werden vom Computer gemittelt und gespeichert. Zur Auswertung ist ein spezielles Computer-Programm der Firma AMKO notwendig, mit dem das Verhältnis der Intensitäten bei den Wellenlängen 340 und 380 nm, die sogenannte Ratio 340/380, berechnet wird. Die Ratio dient als Maß für die intrazelluläre Calciumkonzentration. Um eine genaue Beurteilung der Calcium-Konzentration zu ermöglichen, wird bei der Auswertung die Ratio verwendet, weil diese unabhängig von der Farbstoffkonzentration und dem sogenannten „photobleaching“ des Farbstoffes die Calcium-Konzentration wiedergibt.

3.2.3.8 Medium und Lösungen

Dulbecco's Minimum Essential Medium (DMEM)

DMEM (Fa. Biochrom Seromed, Berlin; Zusammensetzung siehe Tabelle 11) mit FCS (fetal calf serum) und Penicillin/Streptomycin (Tabelle 12) dient als Standardmedium für die A10-Zellen. Das sterile Medium steht in 500 ml Einheiten zur Verfügung. Unter Einhaltung steriler Arbeitsschritte ist es in zwei 250 ml Flaschen umzufüllen. Dem für den sofortigen Gebrauch bestimmten Medium werden unter Laminar-Air-Flow FCS (10 %), Penicillin (100 U/ml) und Streptomycin (100 µg/ml) zugegeben. Die derart präparierte Menge von 250 ml Medium ist für den Verbrauch innerhalb von 1 bis 2 Wochen bestimmt. Die andere Hälfte des Mediums ohne FCS ist wesentlich länger haltbar und wird erst bei Bedarf mit FCS versetzt. Die Lagerung erfolgt bei 2 bis 4°C im Kühlschrank.

EIGENE UNTERSUCHUNGEN

Tabelle 10: DMEM Zusammensetzung (Angaben in mg/l)

| | | | |
|---|---------|-------------------------|---------|
| NaCl | 6999,50 | L-Leucin | 59,00 |
| KCl | 311,80 | L-Lysin-HCl | 91,25 |
| Na ₂ HPO ₄ | 71,00 | L-Methionin | 17,25 |
| Na H ₂ PO ₄ *H ₂ O | 62,50 | L-Phenylalanin | 35,50 |
| MgSO ₄ *7 H ₂ O | 100,00 | L-Prolin | 17,25 |
| MgCl ₂ *6 H ₂ O | 61,00 | L-Serin | 26,25 |
| CaCl ₂ | 116,61 | L-Threonin | 53,50 |
| Fe(NO ₃) ₃ *9 H ₂ O | 0,05 | L-Tryptophan | 9,00 |
| FeSO ₄ *7 H ₂ O | 0,417 | L-Tyrosin | 38,70 |
| CuSO ₄ *5 H ₂ O | 0,00125 | L-Valin | 52,85 |
| ZnSO ₄ *7 H ₂ O | 0,432 | | |
| D-Glucose | 4500,00 | Cholinchlorid | 9,00 |
| NaHCO ₃ | 3700,00 | α-Biotin | 0,00365 |
| Na-Pyruvat | 55,00 | Folsäure | 2,65 |
| Phenolrot | 12,50 | D-Ca-Pantothenat | 2,24 |
| | | myo-Inositol | 12,60 |
| L-Alanin | 4,50 | Nicotinamid | 2,02 |
| L-Arginin-HCl | 147,50 | Pyridoxal-HCl | 2,00 |
| L-Asparagin*H ₂ O | 7,50 | Pyridoxin-HCl | 0,031 |
| L-Asparaginsäure | 6,65 | Riboflavin | 0,22 |
| L-Cystein-HCl | 15,75 | Thiamin-HCl | 2,17 |
| L-Cystin | 24,00 | Vitamin B ₁₂ | 0,68 |
| L-Glutamin | 1028,00 | Hypoxanthin | 2,05 |
| L-Glutaminsäure | 7,35 | Thymidin | 0,37 |
| Glycin | 18,75 | Liponsäure | 0,11 |
| L-Histidin-HCl*H ₂ O | 31,50 | Linolsäure | 0,042 |
| L-Isoleucin | 54,50 | Putrescin-2 HCl | 0,081 |

Tabelle 11: Zusatz zum DMEM-Zellmedium

| | |
|----------------|--------------|
| FCS dialysiert | 100 ml/l |
| Penicillin | 100 000 U/l |
| Streptomycin | 100 000 µg/l |

PBS Waschlösung

Tabelle 12: Zusammensetzung der PBS Waschlösung

| | |
|--|----------|
| NaCl | 8 g/l |
| KCl | 0,2 g/l |
| Na ₂ HPO ₄ * 2H ₂ O | 1,44 g/l |
| KH ₂ PO ₄ | 0,24 g/l |

Die PBS Waschlösung (Tabelle 12) wird mit 1N NaOH auf pH 7,4 eingestellt und autoklaviert. Sie ist zum Spülen und zum Entfernen von Trypsinrückständen der mit Zellen bewachsenen Kunststoffflaschen bestimmt.

Trypsin/EDTA-Lösung

Die Trypsin/EDTA-Lösung (Tabelle 13) enthält 0,05 % Trypsin und 0,02 % EDTA. Mit 1N NaOH wird der pH Wert auf 7,4 eingestellt. Die Lösung dient zum Entfernen der anhaftenden Zellen vom Flaschenboden.

Zur Herstellung der 0,05 %/0,02 % Lösung wird die gelieferte Trypsin/EDTA-Lösung um den Faktor 10 verdünnt. Es werden 100 ml hergestellt und anschließend in Portionen von 10 ml eingefroren. Damit lässt sich ein ständiges Auftauen und Einfrieren der gesamten Lösung vermeiden.

Tabelle 13: Zusammensetzung Trypsin/EDTA-Lösung

| | |
|---------------|-------|
| Trypsin 0,5 % | 10 ml |
| EDTA 0,2 % | 10 ml |
| PBS | 80 ml |

3.2.4 In-vivo-Versuche am Kaninchen

3.2.4.1 Versuchstiere

Die Durchführung der In-vivo-Untersuchungen findet in den OP-Räumen des Institutes für Experimentelle Onkologie und Therapieforschung im Klinikum rechts der Isar (Technische Universität München) statt.

Es werden 8 weibliche, adulte Weiße Neuseeländer Kaninchen (Fa. Charles River, Kisslegg) im Alter von ca. 16 bis 32 Wochen und einem Körpergewicht von ca. 2,6 bis 4,5 kg eingesetzt. Da jedes Versuchstier im Abstand von mindestens 2 Wochen als Interventions- und Kontrolltier eingesetzt wurde, ergibt sich diese Alters- und Gewichtsdivergenz in den Gruppen.

3.2.4.2 **Haltungsbedingungen**

Die Kaninchen werden in Kolonien von 5 Tieren in einem Raum von ca. 4,2 m² Grundfläche gehalten. Der gesamte Stallboden besteht aus einer Gummimatte und diese wiederum ist mit Holzgranulat-Einstreu bedeckt.

Die Raumtemperatur beträgt 16 bis 19°C, relative Luftfeuchte beträgt 50 bis 60%. In dem fensterlosen Raum wird ein künstlicher Tag-Nachtrhythmus über automatischen Beleuchtungswechsel gewährleistet. Die 12-stündige Tagphase hat eine Beleuchtungsintensität von 50 bis 100 Lux. In der Nachtphase herrscht völlige Dunkelheit.

Den Tieren steht pelletiertes Alleinfutter und Wasser ad libitum zur Verfügung.

Einmal täglich bekommen sie zusätzlich Heu, Karotten und hartes Brot, um ihren Nagetrieb befriedigen zu können.

Zwischen der Anlieferung der Tiere und dem Einsatz in Versuchen liegt jeweils eine Eingewöhnungsphase von mindestens 7 Tagen.

3.2.4.3 **Verwendete Substanzen**

Hintonia-latiflora-Extrakt gelöst in Macrogol 300®

Um eine Direktwirkung des Lösungsvermittlers Ethanol am Kaninchen zu vermeiden, wird als Lösungsmittel Polyethylenglycol (Macrogol 300®) verwendet (KOREC et al. 2000). Zur Herstellung einer Lösung wird Hintonia-latiflora-Extrakt in ein Reagenzröhrchen eingewogen und mit Macrogol 300® aufgefüllt, wobei 200 mg Extrakt pro 1 ml Macrogol 300® eingesetzt werden. Um eine gleichmäßige Auflösung aller Bestandteile zu erreichen, muss die Lösung für zwei Stunden in ein Ultraschallbad verbracht werden. Die Dosierung des oral zu verabreichenden Extraktes im Versuch beträgt 200 mg/kg KGW pro Kaninchen.

Polyethylenglycol (Macrogol 300®)

Da Macrogol 300® eine gute Verträglichkeit und darüber hinaus die Fähigkeit besitzt, gebundene Substanzen komplikationslos und schnell wieder abzugeben, wird es in diesem Versuch als Lösungsvermittler für Hintonia-latiflora-Extrakt verwendet. Die Kontroll-Gruppe erhält entsprechend Macrogol 300® in einer oralen Dosierung von 1 ml/kg/KGW.

EIGENE UNTERSUCHUNGEN

Tabelle 14: Verwendete Medikamente

| Substanz | Handelsname | Firma | Anwendungsform | Konzentration |
|----------------------------|------------------|---|-----------------|------------------|
| Hintonia-latiflora-Extrakt | Sucontral® | Gehrlicher GmbH Herbal Extracts, Euras- burg/Obb. | Spissum Extrakt | 200 mg/kg KGW |
| Polyaethylenglycolum | Macrogol 300® | Caelo, Caesar & Lorentz, Hilden | | 1 ml/kg KGW |

Tabelle 15: Versuchsbegleitende Medikamente

| Medikament | Handelsname | Firma | Anwendungsform | Konzentration |
|-----------------|---|---|-------------------------------|--|
| Propofol | Propofol® 1% Frese- nius | Fresenius Kabi GmbH, Bad Homburg | Injektionslösung | 10 mg/ml |
| Dexapenthanol | Bepanthen® Augen- und Nasen- salbe | Hoffman-La Roche GmbH, Grenzach-Wyhlen | Augensalbe | 0,05 mg/g Salbe |
| Infusionslösung | Isotonische Natrium- chloridlösung | Delta Select GmbH | Infusionslösung | 8,6 g NaCl 0,3 g KCl 0,33g CaCl ₂ H ₂ O pro 1000 ml |
| Propanol | Cutasept® F | Bode Chemie Hamburg | Hautdesinfizienz Pumpspray | 63 g/100 g |
| Heparin | Heparin-Na® Braun 25 000 I: E:/5 ml | B. Braun Melsungen AG | Injektionslösung | 5000 I.E./ml |

3.2.4.4 Allgemeiner Versuchsplan

Mit Hilfe der Gefäßsonographie soll in vivo am Kaninchen untersucht werden, ob der Hintonia-latiflora-Extrakt (gelöst in Macrogol 300®) bzw. die Kontrollsubstanz, das Lösungsmittel Macrogol 300® einen vasodynamischen Effekt produziert. Pro Versuchstag werden zwei Kaninchen untersucht, wobei jeweils ein Tier den Hintonia-latiflora-Extrakt (200 mg/kg KGW in einer Konzentration von 200 mg/ml Macrogol 300®) das andere nur das Lösungsmittel Macrogol 300® (1 ml/kg/KGW) erhält.

Es werden pro Tier jeweils zu 6 Messzeitpunkten (basal vor Applikation, und dann 0,5, 1, 2, 3 und 4 Stunden nach Applikation) folgende Parameter erhoben: Mittlerer arterieller Blutdruck (MAP), Herzfrequenz (HF), Blutzucker (BZ), sonographische Messungen (Gefäßdurchmesser, maximale systolische Blutflussgeschwindigkeit, enddiastolische Blutflussgeschwindigkeit, Resistenz-Index) an der Aorta abdominalis und der Arteria carotis communis (siehe Tabelle 16). Zunächst wird die Aorta abdominalis und dann die Arteria carotis communis sonographisch dargestellt. Um einen genauen Vergleich möglich zu machen, finden die Ultraschall-Messungen beider Tiere durch einen geblindeten Untersucher in geringem zeitlichem Abstand statt. Nach Abnahme aller Basalwerte erfolgt unter Propofolkurz- und Narkose die einmalige orale Eingabe der jeweiligen Substanz über eine Schlundsonde.

Die gesamte Versuchsdauer beträgt etwa 6 Stunden. Die Länge der Versuchsdauer ergibt sich zum einem aus anderen tierexperimentellen Studien (KOREC et al. 2000), zum anderen aus der Beobachtung am Menschen, dass das Medikament eine Langzeitwirkung besitzt. Um das Kreislaufsystem der Tiere nicht durch Anästhetika zu beeinflussen, bleiben die Tiere, außer zur Applikation der Substanzen, während des ganzen Versuches im Wachzustand.

Nach der letzten Messung werden die Verweilkatheter entfernt, die Tiere noch etwa 20 Minuten beobachtet und dann in den Stall zurückgebracht.

Der Tierversuch wurde gemäß § 8a des Deutschen Tierschutzgesetzes bei der Regierung von Oberbayern angezeigt.

3.2.4.5 Versuchsgruppe

Für die vorliegenden Untersuchungen werden die Kaninchen 2 Gruppen zugeordnet. Die beiden Gruppen (Hintonia-latiflora-Gruppe und Kontroll-Gruppe) bestehen aus jeweils n=8 Tieren, wobei jedes Tier im Abstand von mindestens 2 Wochen der Hintonia-latiflora-Gruppe und der Kontroll-Gruppe zugeteilt wurde. Da zwischen den einzelnen Versuchen mindestens 2 Wochen Pause liegen, ist es den Tieren möglich, sich ausreichend zu erholen. Pro Versuchstag werden zwei Kaninchen untersucht, wobei einem Kaninchen die Testsubstanz (Hintonia-latiflora-Extrakt) und dem zweiten Tier nur die Kontrollsubstanz (Macrogol 300®) verabreicht wird.

3.2.4.6 Versuchsverlauf

Tabelle 16: Versuchsverlauf des In-vivo-Versuches.

| Monitoring | | | Sonographische Darstellung | |
|--|---------------------|-------------------|--|----------------------------|
| | | | Gefäßdurchmesser Maximaler systolische Blutflussgeschw. Enddiastolische Blutflussgeschw. | |
| Mittlerer arterieller Blutdruck | Herzfrequenz | Blutzucker | Aorta abdominalis | A. carotis communis |
| Basalwert (1. Messung) | | | | |
| Kurznaarkose (Propofol) Applikation von Hintonia-latiflora-Extrakt (200 mg/kg/KGW) bzw. Applikation von Lösungsmittel Macrogol 300® (1 ml/kg/KGW) (t=0) | | | | |
| 2. Messung nach 0,5h | | | | |
| 3. Messung nach 1 h | | | | |
| 4. Messung nach 2 h | | | | |
| 5. Messung nach 3 h | | | | |
| 6. Messung nach 4 h | | | | |

3.2.4.7 Versuchsvorbereitung

Um narkosebedingte Artefakte zu vermeiden wird das Ausscheren und Rasieren der Tiere bereits 2 Tage vor dem eigentlichen Versuch durchgeführt. Zunächst wird das Körpergewicht der beiden ausgewählten Tiere erhoben, um eine exakte Dosierung der Substanzen zu ermöglichen. Anschließend erfolgt eine kurze Allgemeinuntersuchung des jeweiligen Tieres und danach eine Kurznaarkose mit Propofol (1 %, Fresenius, Bad Homburg) (7 mg/kg/KGW intravenös), um das Kaninchen an der linken Seite des Abdomens und an der linken Halsseite zu scheren und zu rasieren.

Dazu wird die Haut mit Emla® –Creme eingerieben. Durch leichtes Beklopfen des Ohres tritt das Gefäß gut sichtbar hervor. Dadurch kann ein Venenverweilkatheter (Vasofix™ Braunüle, 22 G1,0,9 x 25 mm) perkutan in die Vene vorgeschoben werden. Um das Herausgleiten des Katheters zu verhindern wird er mit Klebeband (Leukoplast® 2,5 cm x 5 m, BSN medical GmbH & Co KG) am Ohr befestigt. Der venöse Zugang wird in die V. auricularis des rechten Ohres gelegt, über ihn erfolgt anschließend die Narkoseeinleitung. Sofort nach Narkoseeinleitung wird Augensalbe (Bepanthen®) verabreicht, um die Augen vor Austrocknung während der Narkose zu schützen. Nach Erlöschen des Stellreflexes erfolgt das Scheren mit der Schermaschine (Aesculap®, Tuttlingen) und das Rasieren mit

einem Nassrasierer. Danach wird das Kaninchen in einen Käfig verbracht und bis zum vollständigen Erwachen warm gehalten.

3.2.4.8 Versuchsdurchführung

Am Versuchstag steht den Kaninchen bis zum Versuchsbeginn Futter und Wasser ad libitum zu Verfügung. Zunächst wird das vorgesehene Tier einer kurzen klinischen Untersuchung unterzogen. Anschließend wird ein arterieller Zugang über die A. auricularis media gelegt, um die intraarterielle Blutdruckmessung durchführen zu können.

Nach Desinfektion mit Cutasept® (Bode Chemie) und leichtem Beklopfen der Ohrarterie tritt das Gefäß deutlich hervor und ermöglicht das Einschieben des Katheters (Vasofix™ Braunüle, 20 G ¼, 1,1 33 mm). Mit Hilfe von Klebebändern (Leukoplast®) lässt sich die Verweilkanüle am Ohr befestigen. Am anderen Ohr wird wie bereits in der Vorbereitung beschrieben ein Venenverweilkatheter in der V. auricularis lateralis angebracht. Vor Beginn des Versuches erhält das Kaninchen 100 I.E./kg KGW Heparin intravenös zur Thromboseprophylaxe. Nach Abschluss der Vorbereitung erfolgt die **Erhebung der Basalwerte:**

Blutdruck und Herzfrequenz

Zur Messung des systolischen, diastolischen und mittleren arteriellen Blutdruckes und der Herzfrequenz wird ein Gerät der Firma Datex-Ohmeda GmbH (Datex Ohmeda S/5, Type F-CM1.00, Helsinki, Finnland) verwendet.

Für die Messung wird das Kaninchen auf den Behandlungstisch gesetzt und von einer Hilfsperson leicht fixiert. An den arteriellen Verweilkatheter wird ein Druckabnehmer (Hellige Type 4-327-I, Datex Ohmeda Helsinki, Finnland) angeschlossen, der mit dem Datex-Ohmeda-Gerät verbunden ist.

Auf dem Gerätemonitor können nun die oben aufgeführten Parameter abgelesen werden.

Es werden pro Messzeitpunkt und Parameter im Abstand von 5 Sekunden 4 Werte erhoben und ein Mittelwert daraus errechnet.

Blut-Glucose-Spiegel

Zur Registrierung des Blutzuckers wird ein ACCU-CHECK® Sensor-Gerät (ACCU-CHECK® Sensor Blutzuckermessgerät, Roche Diagnostics GmbH, Mannheim) verwendet.

Das Blut wird für die Messung aus dem arteriellen Verweilkatheter entnommen.

Nach Öffnen des Katheters werden die ersten Blutstropfen verworfen. Anschließend wird ein Teststreifen (ACCU-CHECK Sensor Comfort, Roche Diagnostics GmbH, Mannheim)

seitlich neben die Öffnung des Katheters gehalten. Der Teststreifen zieht dann automatisch eine ausreichende Menge Blut ein. Durch Einführen des Teststreifens in das Blutzuckermessgerät ist es möglich, nach ungefähr 1 Minute den Blutzuckerwert abzulesen.

Pro Messzeitpunkt werden jeweils zwei Blutzuckermessungen durchgeführt und gemittelt.

Sonographische Darstellung der Gefäße

Mit Hilfe eines Ultraschallgerätes (GE Vingmed Ultrasound A/S System VIVID FIVE, N-3191 Horten, Norwegen) und einer 10-MHz-Linearsonde (FLA 10 MHz 1A, N-3191 Horten, Norwegen) ist es möglich, die Aorta abdominalis und die Arteria carotis communis sinistra darzustellen.

Folgende sonographische Gefäßparameter werden erhoben: Gefäßdurchmesser (mm), maximale systolische und enddiastolische Blutflussgeschwindigkeit (cm/sec) und der Resistenz-Index (RI). Pro Messzeitpunkt werden die aufgeführten Parameter viermal erhoben und anschließend für die Auswertung gemittelt.

B-Mode und Doppler-Echographie der Aorta abdominalis

Da das Kaninchen über den Zeitraum der gesamten Untersuchung in wachem Zustand bleibt, ist es unbedingt notwendig, um stressbedingte Artefakt zu vermeiden, für eine ruhige Umgebung und eine sehr umsichtige Handhabung zu sorgen.

Das Tier wird auf den Schoß des Untersuchers platziert, so dass die linke, rasierte Flanke, lateral zugänglich ist. Gleichzeitig werden die hinteren Extremitäten leicht nach kaudal gezogen, um das gesamte Abdomen leicht gestreckt zu halten.

Um eine optimale Ankoppelung zwischen Haut und Ultraschallsonde zu erzielen wird eine etwa 2 cm dicke Schicht Ultraschall-Gel (TMP Tüshaus Medical Produkte GmbH, Velen-Ramsdorf) auf den Sondenkopf aufgetragen. Der Schallkopf wird mit seiner Längsachse, parallel zur Wirbelsäule, zwischen Rippenbogen und Hintergliedmaße unter leichtem Druck am Abdomen positioniert. Mit dem B-Mode mit zusätzlich zugeschaltetem Farbdoppler sucht man das Gefäß auf. Es wird dabei im Längsschnitt gezeigt.

Die farbige Doppler-Darstellung des Blutstromes macht eine Unterscheidung zwischen Gefäßen unterschiedlicher Blutflussrichtung möglich. Das auf den Schallkopf zufließende Blut erscheint in rotem, das vom Schallkopf wegfließende Blut in blauem Farbton.

Da bei jeder nachfolgenden Messung möglichst dieselbe Mess-Stelle des Gefäßes betrachtet werden soll, dienen die Niere und die Arteria renalis als Orientierungshilfen. Die sonographischen Messungen werden kaudal der A. renalis an der Aorta abdominalis

durchgeführt. Durch Einstellung des Tiefenausgleichs oder Gain (gain, engl., Verstärkung) werden die Grauwerte des Bildes so eingestellt, dass eine möglichst gute Detailerkennung und alle zur Verfügung stehenden Grautöne einschließlich schwarz und weiß erkennbar sind. Durch den Tiefenausgleich kommt es zu einer gleichmäßigen Verstärkung der Echos aus allen Gewebetiefen. Die Einstellung des Gerätes ist als optimal zu betrachten, wenn, bei wieder zugeschalteter Dopplerfunktion, das Gefäß vollständig von dem Farbsignal ausgefüllt ist, ohne dass dieses jedoch über die Gefäßgrenzen hinaustritt. Zusätzlich zeigt sich die Farbkodierung in der Mitte des Gefäßes hellrot, wohingegen es am Rande zu einer eher dunkleren Färbung kommt. Diese Farbunterschiede kommen durch schnellere Blutflussgeschwindigkeiten im Zentrum und langsamere am Rande des Gefäßes zustande.

Zur Bestimmung des Gefäßdurchmessers wird der Farbdoppler ausgeschaltet und ein zweidimensionales Standbild im B-Mode angefertigt. Der Durchmesser des Gefäßes kann nun mit Hilfe von Cursormarkierungen, die an der Gefäßendothelschicht von der Intimaschicht auf der einen Seite zur gegenüberliegenden Intimaschicht gelegt werden, ausgemessen werden. Insgesamt werden pro Messzeitpunkt jeweils vier Standbilder angefertigt. Nach Bestimmung des Gefäßdurchmessers wird die Blutflussgeschwindigkeit mit Hilfe des PW-Dopplers gemessen. Zusätzlich zu einem farbigen Signal im Gefäß lässt sich das Dopplerspektrum als fortlaufende Kurve graphisch und akustisch darstellen. Diese Grafik erscheint unterhalb des Ultraschallbildes auf dem Monitor des Gerätes.

Um das Messvolumen im Gefäß genau eingrenzen zu können, wird ein Dopplertor in das Gefäß gelegt und auf etwa zwei Drittel des Gefäßes verbreitert. Zusätzlich erfolgt eine Winkelkorrektur. Um Messfehler zu vermeiden und das Dopplersignal möglichst optimal zu erhalten, darf der Winkel zwischen Gefäßwand und Ultraschallstrahl nicht über 60° liegen. Eine zusätzliche graphische und akustische Darstellung gibt Aufschluss über die Qualität der Einstellung.



Abbildung 16: Positionierung der Ultraschall-Sonde zur Darstellung der Aorta abdominalis

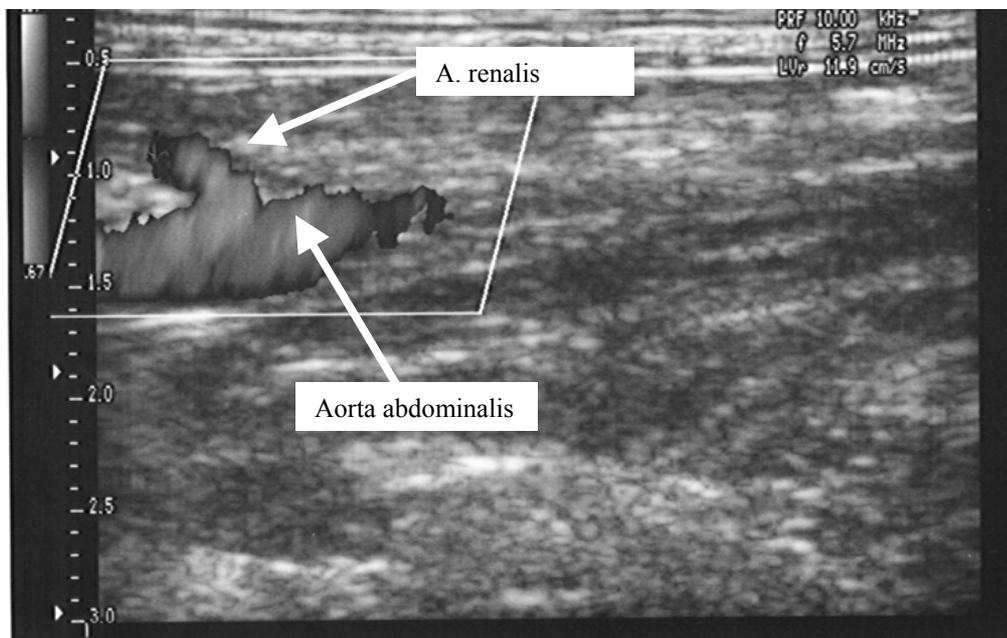


Abbildung 17: Aorta abdominalis mit Abgang der Arteria renalis im B-Mode mit zugeschaltetem Doppler.

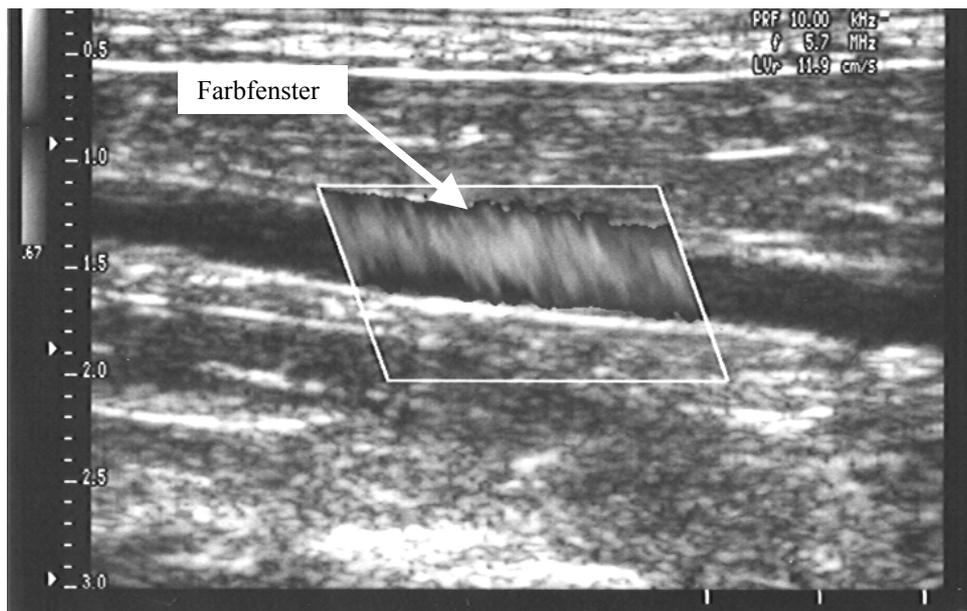


Abbildung 18: Sonographische Darstellung der Aorta abdominalis im B-Mode und zugeschaltetem Doppler zum Auffinden des Gefäßes.

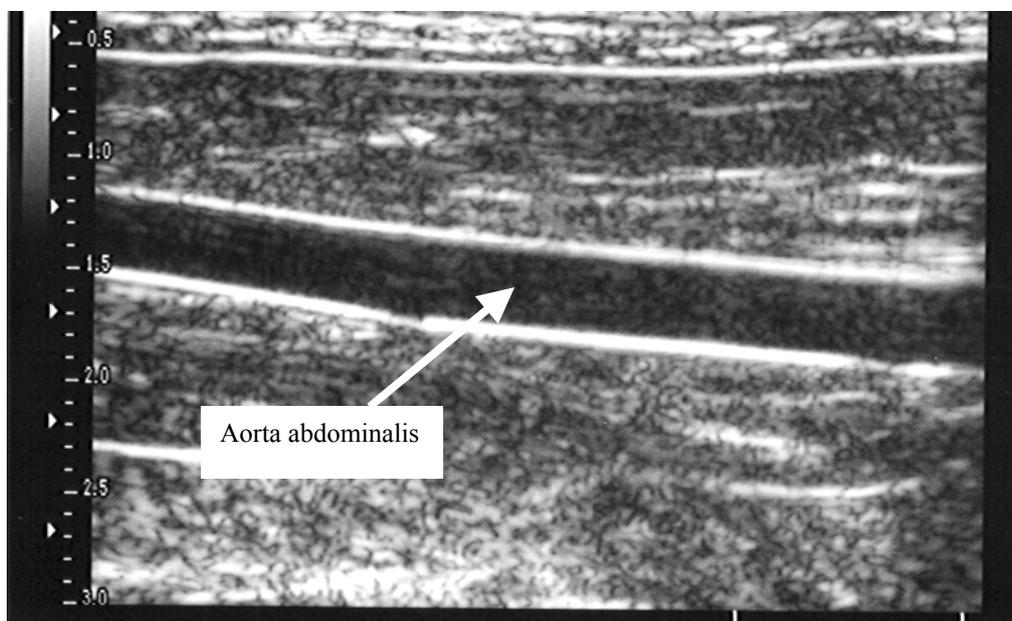


Abbildung 19: B-Mode-Darstellung der Aorta abdominalis zum Ausmessen des Gefäßdurchmessers.

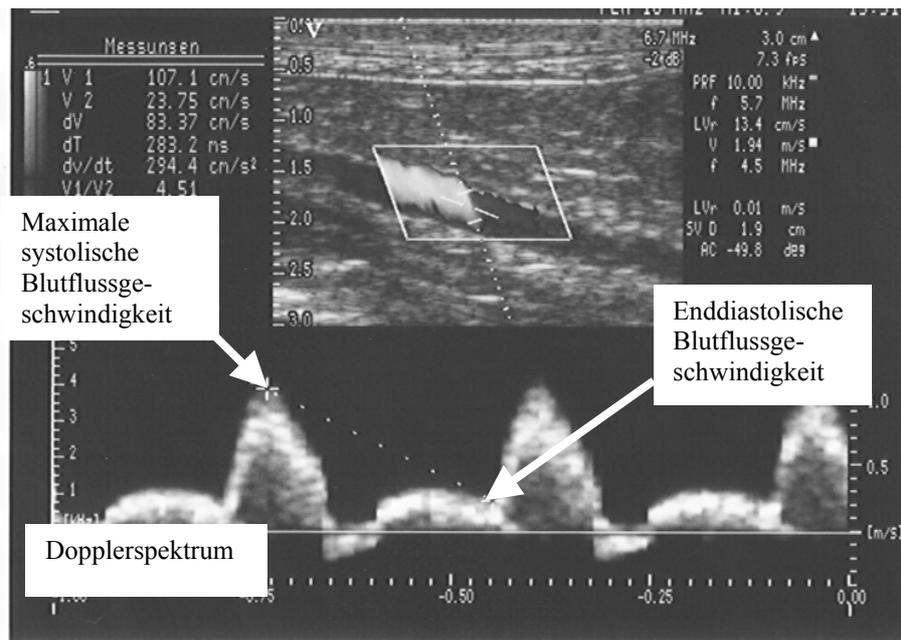


Abbildung 20: Dopplerspektrum der Aorta abdominalis zur Messung der maximalen systolischen und enddiastolischen Blutflussgeschwindigkeit.

B-Mode und Doppler-Echographie der A. carotis communis

Im Anschluss an die Ultraschall-Messungen der Aorta abdominalis erfolgt die Darstellung der A. carotis communis sinistra.

Das Kaninchen ist aus der eher liegenden Stellung in eine sitzende Haltung zu bringen, wobei der Hals, soweit es vom Tier toleriert wird, in eine leichte Streckstellung gebracht wird. Die Sonde, die in Längsrichtung zum Hals positioniert wird, ist mit einer etwa 2 cm dicken Schicht Ultraschall-Gel beladen. Sie wird an der linken Halsseite, paramedian, zwischen linkem Unterkieferknochen und Sternum angesetzt.

Zum Auffinden des Gefäßes wird wieder der Farbdoppler zugeschaltet. Hier wird dieselbe Vorgehensweise wie bei der Darstellung der Aorta abdominalis angewendet. Nach Auffinden des Gefäßes wird der Farbdoppler weggeschaltet, das Bild optimal eingestellt und über vier Standbilder der Gefäßdurchmesser ermittelt.

Im Anschluss daran erfolgt wieder eine Messung der Blutflussgeschwindigkeit mit Hilfe des PW-Dopplers. Die akustischen und graphischen Doppler-Signale der A. carotis communis unterscheiden sich dabei aufgrund unterschiedlicher Endstromgebiete eindeutig von denen der Aorta abdominalis.



Abbildung 21: Positionierung der Ultraschall-Sonde zur Darstellung der A. carotis communis

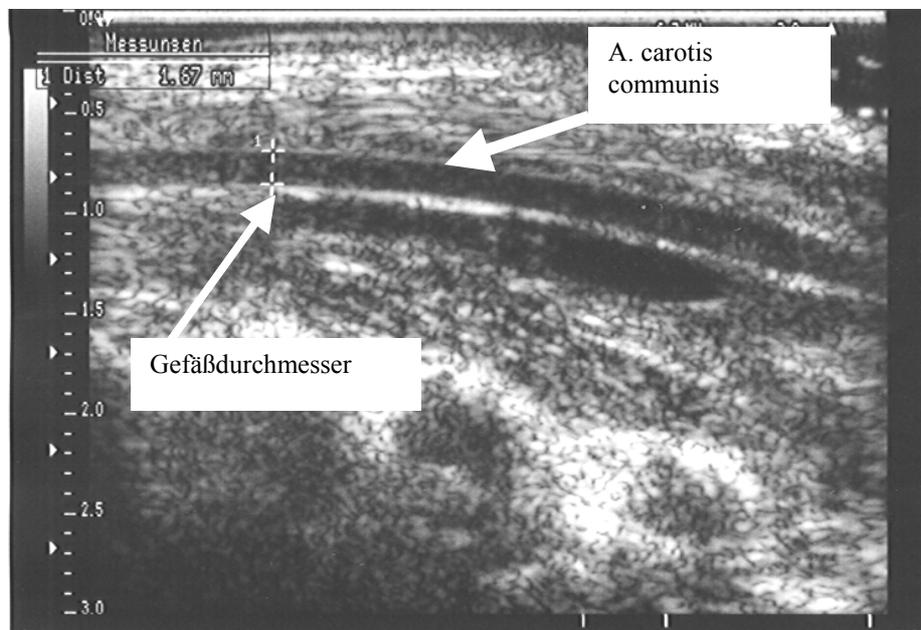


Abbildung 22: B-Mode-Darstellung der A. carotis communis zur Ausmessung des Gefäßdurchmessers.

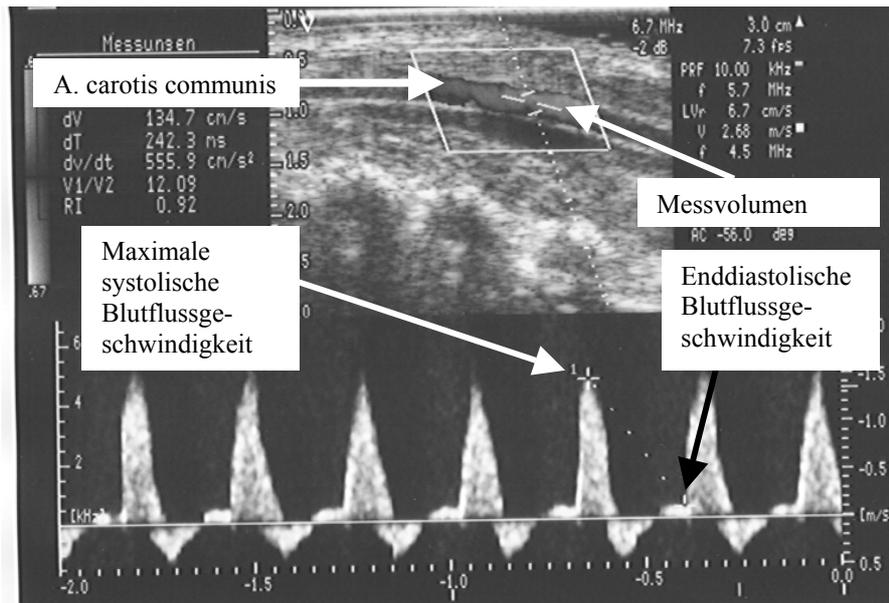


Abbildung 23: Dopplerspektrum der A. carotis communis zur Messung der maximalen systolischen und enddiastolischen Blutflussgeschwindigkeit.

3.2.4.9 Auswertung

Nach Anfertigung eines Standbildes ist es möglich, das Dopplerspektrum auszumessen. Anhand der maximalen Peaks der Dopplerkurve in der Systole und der Dopplerspektrumhöhe in der enddiastolischen Phase kann die Geschwindigkeit des systolischen und enddiastolischen Blutflusses über Cursormarkierungen bestimmt werden.

Zur quantitativen Erfassung der Flussgeschwindigkeitskurven werden verschiedene Indizes definiert. In dieser Arbeit findet die Auswertung des systolischen und enddiastolischen Flusses über den sogenannten Widerstandsindex, Resistenz-Index (RI) oder Pourcelot-Index statt, der nach folgender Formel berechnet wird:

$$RI = \frac{S-D}{S}$$

S = Systolische Flussgeschwindigkeit

D = Enddiastolische Blutflussgeschwindigkeit

Der Widerstandsindex gilt als wichtiger Parameter des peripheren Widerstandes in dem jeweiligen Endstromgebiet des untersuchten Gefäßes.

Applikation der Substanzen

Nach Registrierung aller Basalwerte wird das Tier in eine Propofol-Kurznaarkose (7 mg/kg/KGW) gelegt (Dauer ca. 5 Minuten). Nach dem Verschwinden des Stellreflexes wird Bepanthen® Augensalbe auf die Cornea aufgetragen. Der Kopf des Kaninchens wird von einer Hilfsperson von kaudal in einer aufrechten Haltung so fixiert, dass von einer zweiten Person von kranial eine Schlundsonde gelegt werden kann. Die Sonde wird in das Maul über den Kehlkopf und den Ösophagus bis in den Magen vorgeschoben. Durch Spülen des Schlauches mit Natrium-Chlorid-Lösung, bei gleichzeitigem Anlegen eines Stethoskops an die seitliche Bauchwand, kann die korrekte Lage der Sonde überprüft werden. Der Hintonia-latiflora-Extrakt wird in einer Dosierung von 200 mg/kg KGW in eine Spritze aufgezogen und über die Schlundsonde verabreicht. Um sicher zu gehen, dass die gesamte Menge der Testsubstanz in den Magen des Kaninchens gelangt, wird mit ca. 2 bis 3 ml Wasser nachgespült. Vor dem Absetzen der Spritze ist darauf zu achten, den Schlauch zu knicken und zusammenzupressen, um einen Rückfluss beim Entfernen der Sonde zu verhindern.

Genauso erfolgt auch die Gabe des Lösungsvermittlers Macrogol 300® beim Kontrolltier in einer Dosierung von 1 ml/kg/KGW, entsprechend der Menge des eingegebenen Hintonia-latiflora-Extraktes beim Testtier. Damit eine möglichst objektive Durchführung und Auswertung der Untersuchung stattfindet, wird der Versuch geblendet durchgeführt. Beim zweiten Tier erfolgt nun die gleiche Vorgehensweise bei der Registrierung der Basalwerte und der Gabe der Substanz.

Statistische Auswertung

Die Signifikanzen des In-vitro-Teils (Aortenkontraktionsversuche) werden mit Verteilungsfreien Tests berechnet. Aus den Messwerten werden jeweils die Mittelwerte (MW, arithmetisches Mittel) und die Standardabweichung (SD) bzw. die Standardfehler (SE) bestimmt.

Zum Vergleich des Effektes bei verschiedenen Konzentrationen innerhalb der Gruppe wird der paarweise Wilcoxon-Test durchgeführt. Innerhalb einer Gruppe werden dabei die einzelnen Konzentrationen auf signifikante Unterschiede zum Ausgangswert hin überprüft. Als Signifikanzniveau wird die Irrtumswahrscheinlichkeit $p < 0,05$ als signifikant und $p < 0,005$ als hochsignifikant festgelegt. Für den In-vitro-Teil der Arbeit (Aortenkontraktionsversuche) erfolgt zusätzlich die Berechnung der EC_{50} unter Verwendung

der Gauß-Newton-Methode mit dem Computerprogramm GraphPad, Prism, Version 3.05, San Diego, CA, USA. Mit Hilfe des Programms werden die Daten durch „Fitten“ an folgende Gleichung angenähert und die entsprechenden Parameter einschließlich der EC₅₀-Werte berechnet.

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

E: Effekt
C: Konzentration
K₁: asymptotischer Maximalwert
K₂: asymptotischer Minimalwert
K₃: Steigungsparameter
K₄: EC₅₀

Eine Überprüfung der statistischen Zusammenhänge wird ebenfalls für die sonographischen Messungen an der Aorta abdominalis (Gefäßdurchmesser, maximale systolische und enddiastolische Blutflussgeschwindigkeit) und an der A. carotis communis (Gefäßdurchmesser, maximale systolische und enddiastolische Blutflussgeschwindigkeit) des In-vivo-Teils der Studie durchgeführt. Des Weiteren werden die Herz-Kreislauf-Parameter (mittlerer arterieller Blutdruck und Herzfrequenz) und Blutzucker statistisch ausgewertet. Zur Auswertung wird das Statistikprogramm SPSS (Statistical Package for the Social Science, Version 11.5, SPSS GmbH München) verwendet. Aus den Messwerten werden jeweils die Mittelwerte (MW, arithmetisches Mittel) und die Standardabweichung (SD) bzw. die Standardfehler (SE) bestimmt.

Für die Signifikanzberechnungen werden verteilungsfreie Tests benutzt.

Beim Vergleich der Messwerte zu verschiedenen Messzeitpunkten mit dem jeweiligen Ausgangswert wird ein paarweiser Vorzeichentest und der Friedman-Test gewählt. Hat sich der Friedman-Test als signifikant erwiesen, wird zusätzlich der paarweise Wilcoxon-Test (Zeitvergleich innerhalb der Gruppe) durchgeführt. Dabei werden die einzelnen Messzeitpunkte eines Messparameters auf signifikante Unterschiede zum Ausgangswert hin überprüft. Beim Vergleich der beiden Gruppen (Hintonia-latiflora-Gruppe mit der Kontroll-Gruppe) wird der Mann-Whitney-Test benutzt. Als Signifikanzniveau wird die Irrtumswahrscheinlichkeit $p < 0,05$ als signifikant und $p > 0,05 < 0,1$ als nicht signifikante Tendenz festgelegt. Sowohl die Überprüfung der statistischen Signifikanz als auch die grafische Darstellung der Untersuchungsergebnisse bezieht sich auf die relativen Mittelwerte und Standardfehler (%), wobei der relative Mittelwert des Ausgangswertes (Basalwert) jeweils 100 % gleichgesetzt wird.

3.3 Ergebnisse

3.3.1 Kontraktionskraftmessungen an isolierten Aortenringen

3.3.1.1 Wirkung des *Hintonia-latiflora*-Extraktes an Noradrenalin-vorkontrahierten Präparaten

Die Meerschweinchen-Aortenringe werden durch Zugabe von Noradrenalin (10 μ M in der Badlösung) vorkontrahiert. Anschließend erfolgt eine kumulative Zugabe des *Hintonia-latiflora*-Extraktes. Es kommt zu einer Konzentrations-abhängigen Relaxation der Aortenringe. Bis zu einer Konzentration von 45 μ g/ml erschlafft die Gefäßmuskulatur nicht. Bei höheren Konzentrationen kommt es zu einer starken Relaxation. Ab 60 μ g/ml relaxieren die Muskeln vollständig (um $99,18 \pm 2,35$ % bei 60 μ g/ml). Die EC_{50} liegt bei 51,98 μ g/ml. Die Wirkung des Extraktes entfaltet sich demnach in einem sehr engen Konzentrationsbereich.

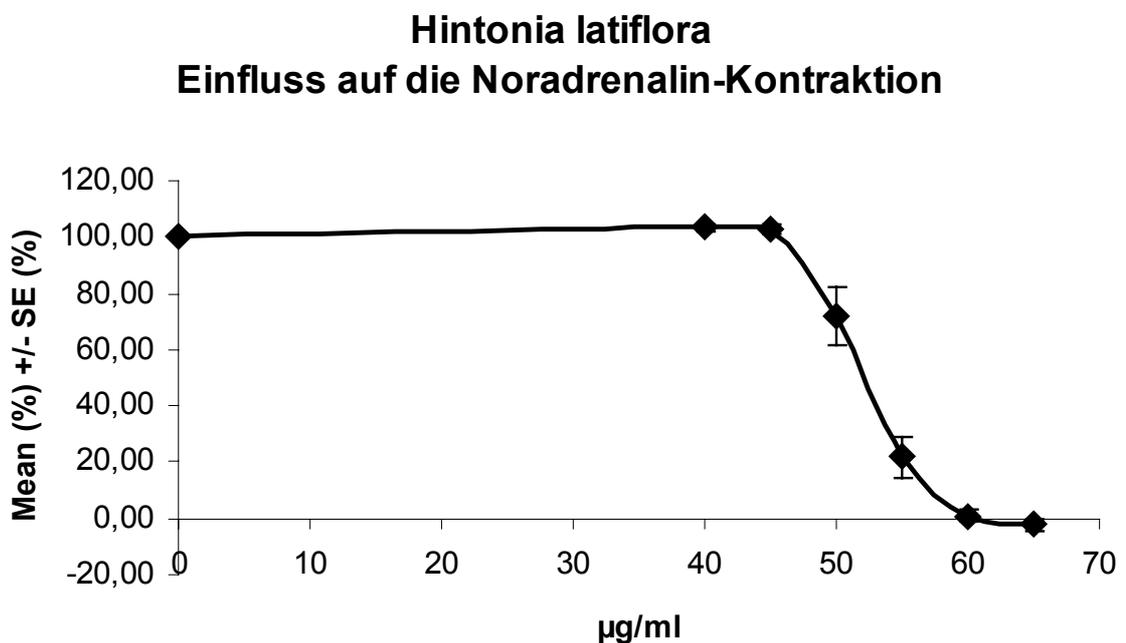


Abbildung 24: Der Einfluss des *Hintonia-latiflora*-Extraktes auf Noradrenalin-vorkontrahierte Aortenringe des Meerschweinchens. Mean % = Mittelwert in %, SE % = Standardfehler in %, n = 8

Tabelle 17: Hintonia latiflora Einfluss auf die Noradrenalin-induzierte Kontraktion (mN) (Zahlenwerte zu Abbildung 24)

| Hint. lat. | Absolut (mN) | Relativ (%) | Wilcoxon (rel.) | Wilcoxon (rel.) |
|----------------|--------------|---------------|-----------------|-----------------|
| Zugabe (µg/ml) | MW ± SE | MW ± SE | p < 0,05 | p < 0,005 |
| 0 | 15,58 ± 1,22 | 100,00 ± 0 | | |
| 40 | 16,16 ± 1,30 | 103,32 ± 0,96 | + | - |
| 45 | 16,18 ± 1,35 | 102,72 ± 1,63 | - | - |
| 50 | 11,12 ± 1,70 | 71,91 ± 10,58 | - | + |
| 55 | 3,77 ± 1,26 | 21,79 ± 7,48 | - | + |
| 60 | 0,30 ± 0,39 | 0,82 ± 2,53 | - | + |
| 65 | -0,13 ± 0,36 | -2,24 ± 2,33 | - | + |

MW = arithmetisches Mittel, SE = Standardfehler in % bzw. mN, Wilcoxon = statistischer Test für die Veränderungen innerhalb einer Wirkungskurve bezogen auf die Relativ-Werte p < 0,05 = signifikant, p < 0,005 = hochsignifikant

3.3.1.2 Wirkung von Coutareagenin an Noradrenalin-vorkontrahierten Präparaten

Wie bei den Versuchen mit Hintonia-latiflora-Extrakt werden die Aortenringe mit 10 µM Noradrenalin in der Badlösung vorkontrahiert und anschließend Coutareagenin kumulativ zugegeben. Coutareagenin ist einer der Leitwirkstoffe des Extraktes. Seine relaxierende Wirkung tritt bereits bei Konzentrationen über 20 µg/ml auf. Eine Konzentration von 60 µg/ml führt zu einer weitgehenden Erschlaffung der Muskeln (um 93,81 ± 5,62 %). Die EC₅₀ liegt bei 32,55 µg/ml. Die Substanz weist eine weniger steile Konzentrations-Wirkungskurve als die des Hintonia-latiflora-Extraktes auf, d.h. die Wirkung spielt sich in einem etwas weiteren Konzentrationsbereich als bei dem Hintonia-latiflora-Extrakt ab.

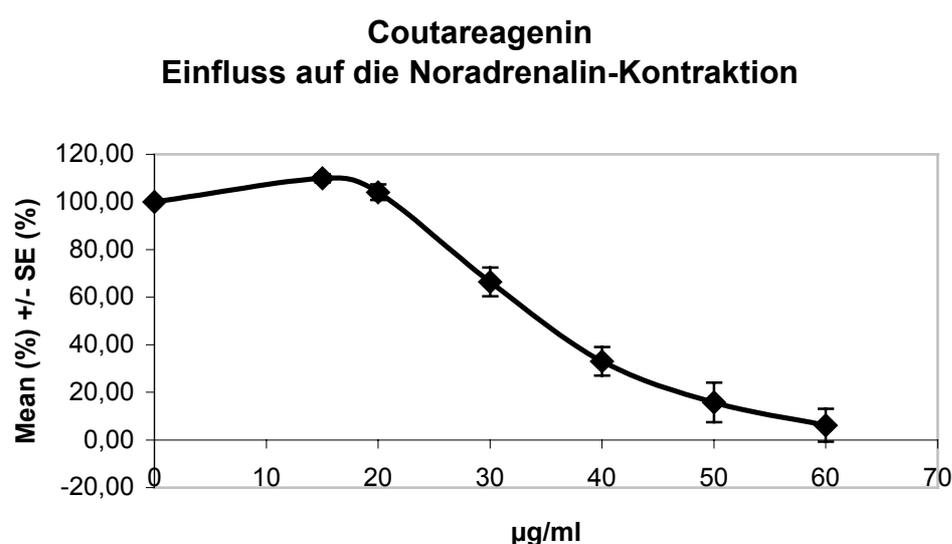


Abbildung 25: Der Einfluss von Coutareagenin auf die Noradrenalin-vorkontrahierten Aortenringe des Meerschweinchens. Mean % = Mittelwert in %, SE % = Standardfehler in %, n = 8

Tabelle 18: Coutareagenin Einfluss auf die Noradrenalin-induzierte Kontraktion (mN) (Zahlenwerte zu Abbildung 25)

| Couta. | Absolut (mN) | Relativ (%) | Wilcoxon | Wilcoxon |
|--------------|--------------|---------------|----------|-----------|
| Zugabe µg/ml | MW ± SE | MW ± SE | p < 0,05 | p < 0,005 |
| 0 | 18,39 ± 1,25 | 100,00 ± 0 | | |
| 15 | 20,40 ± 1,54 | 109,98 ± 1,48 | - | + |
| 20 | 19,42 ± 1,53 | 104,10 ± 2,51 | - | - |
| 30 | 12,79 ± 1,40 | 66,43 ± 4,46 | - | + |
| 40 | 6,67 ± 1,01 | 33,02 ± 4,98 | - | + |
| 50 | 3,64 ± 1,01 | 15,82 ± 6,59 | - | + |
| 60 | 1,85 ± 0,77 | 6,19 ± 5,62 | - | + |

MW = arithmetisches Mittel, SE = Standardfehler in % bzw. mN, Wilcoxon = statistischer Test für die Veränderungen innerhalb einer Wirkungskurve bezogen auf die Relativ-Werte p < 0,05 = signifikant, p < 0,005 = hochsignifikant

3.3.1.3 Milrinon an Noradrenalin-vorkontrahierten Präparaten

Unter Milrinon, das als vasodilatierende Referenzsubstanz verwendet wird, kommt es bereits ab 0,21 µg/ml zu einem frühen kontinuierlichen Abfall der Kontraktionskraft. Eine maximale Relaxation um 88,39 ± 4,91 % zeigt sich bei einer Konzentration von 21,12 µg/ml. Die EC₅₀ liegt bei 2,43 µg/ml. Im Vergleich zu den Wirkungskurven von Coutareagenin und des *Hintonia-latiflora*-Extraktes ist die Konzentrations-Wirkungskurve sehr flach.

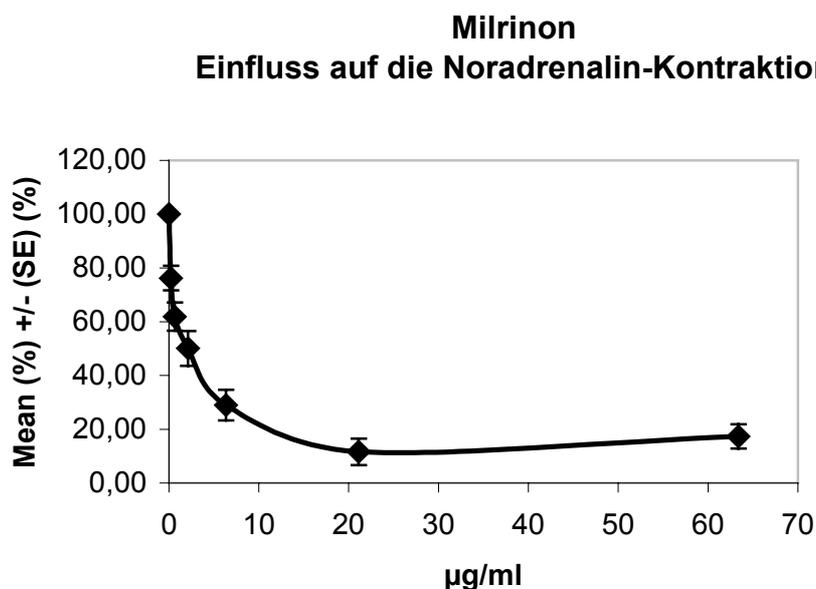


Abbildung 26: Der Einfluss von Milrinon auf die Noradrenalin-vorkontrahierten Aortenringe des Meerschweinchens. Mean % = Mittelwert in %, SE % = Standardfehler in %, n = 8

Tabelle 19: Milrinon Einfluss auf die Noradrenalin-induzierte Kontraktion (mN) (Zahlenwerte zu Abbildung 26)

| Milrinon | Absolut (mN) | Relativ(%) | Wilcoxon | Wilcoxon |
|--------------|--------------|--------------|----------|-----------|
| Zugabe µg/ml | MW ± SE | MW ± SE | p < 0,05 | p < 0,005 |
| 0,00 | 17,28 ± 1,42 | 100,00 ± 0 | | |
| 0,21 | 13,41 ± 1,54 | 76,23 ± 4,59 | - | + |
| 0,63 | 10,98 ± 1,46 | 61,89 ± 5,28 | - | + |
| 2,11 | 8,75 ± 1,37 | 50,03 ± 6,50 | - | + |
| 6,34 | 5,04 ± 1,13 | 28,98 ± 5,70 | - | + |
| 21,12 | 2,08 ± 1,08 | 11,61 ± 4,91 | - | + |
| 63,36 | 2,86 ± 0,81 | 17,30 ± 4,52 | - | + |

MW = arithmetisches Mittel, SE = Standardfehler in % bzw. mN, Wilcoxon = statistischer Test für die Veränderungen innerhalb einer Wirkungskurve bezogen auf die Relativ-Werte p < 0,05 = signifikant, p < 0,005 = hochsignifikant

3.3.1.4 Zusammenfassung der Wirkungen von Hintonia latiflora-Extrakt, Coutareagenin und Milrinon auf die Noradrenalin-vorkontrahierten Aortenringe

Vasorelaxierende Wirkungen von Hintonia latiflora, Coutareagenin und Milrinon

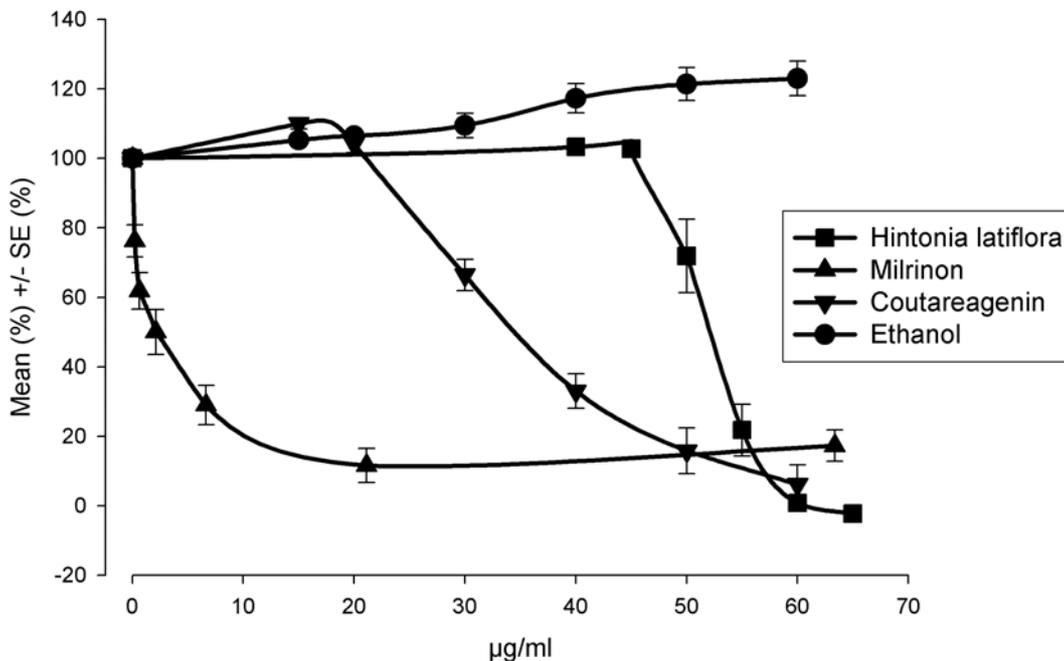


Abbildung 27: Der Einfluss von Hintonia latiflora, Coutareagenin und Milrinon auf Noradrenalin-vorkontrahierte Aortenringe des Meerschweinchens. Die Ethanol-Kurve gibt die Wirkung des Lösungsvermittlers Ethanol in den Konzentrationen wieder, die bei Coutareagenin verwendet wurden. Mean % = Mittelwert in %, SE % = Standardfehler in %, n jeweils = 8

Tabelle 20: Ethanol-Einfluss auf die Noradrenalin-Kontraktur
(Zahlenwerte zur Abbildung 27)

| Kontrolle | Absolut (mN) | Relativ (%) | Wilcoxon | Wilcoxon |
|-----------------------------------|---------------------|----------------------|----------|-----------|
| Zugabe µg/ml bei Coutareagenin | MW ± SE | MW ± SE | p < 0,05 | p < 0,005 |
| 0 | 21,26 ± 1,42 | 100 ± 0 | | |
| 15 | 22,88 ± 1,95 | 107,09 ± 2,11 | - | - |
| 20 | 24,32 ± 2,18 | 113,72 ± 2,67 | - | - |
| 30 | 24,46 ± 2,43 | 114,20 ± 4,25 | + | - |
| 40 | 25,03 ± 2,73 | 116,58 ± 5,56 | - | + |
| 50 | 25,03 ± 2,97 | 116,25 ± 6,88 | - | + |
| 60 | 25,13 ± 2,99 | 116,84 ± 7,17 | - | + |

MW = arithmetisches Mittel, SE = Standardfehler in % bzw. mN, Wilcoxon = statistischer Test für die Veränderungen innerhalb einer Wirkungskurve bezogen auf die Relativ-Werte p < 0,05 = signifikant, p < 0,005 = hochsignifikant

3.3.1.5 Wirkung des *Hintonia latiflora*-Extraktes an Kalium-vorkontrahierten Präparaten

Der Einfluss von *Hintonia latiflora* auf isolierte Aortenringe des Meerschweinchens wird an Präparaten untersucht, bei denen durch Zugabe von KCl die extrazelluläre Kalium-Konzentration auf 30 mM erhöht wird. Diese Erhöhung der Kalium-Konzentration führt zur Kontraktion der Präparate. Danach erfolgt eine kumulative Zugabe von *Hintonia latiflora*-Extrakt. In Gegenwart von Kalium kommt es bei *Hintonia latiflora*-Konzentrationen von 40 bis 100 µg/ml zu einem leichten Anstieg (um $10,73 \pm 6,73$ % bei 100 µg/ml), während eine Erhöhung auf 300 µg/ml eine geringgradige Minderung bewirkt (um $18,94 \pm 8,19$ %). Eine EC₅₀ konnte wegen der geringen Unterschiede im Kurvenverlauf nicht berechnet werden. Die Wirkung von *Hintonia latiflora* auf Kalium-vorkontrahierte Präparate muss deshalb als ausgesprochen schwach beschrieben werden.

Hintonia latiflora
Einfluss auf die Kalium-Kontraktion

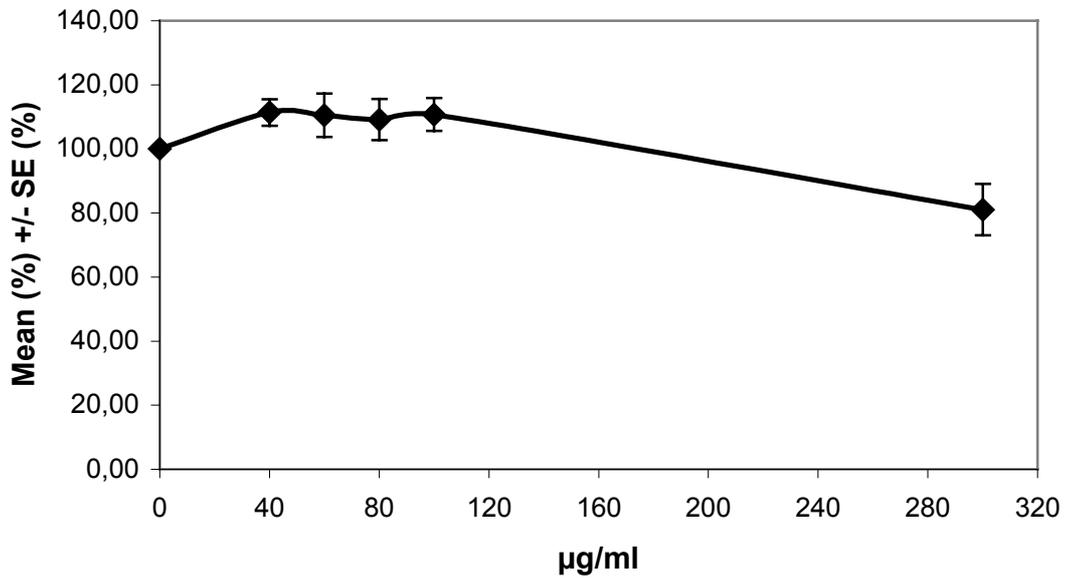


Abbildung 28: Der Einfluss von Hintonia-latiflora-Extrakt auf die Kalium-vorkontrahierten Aortenringe des Meerschweinchens. Mean % = Mittelwert in %, SE % = Standardfehler in %, n = 6

Tabelle 21: Hintonia-latiflora Einfluss auf die Kalium-induzierte Kontraktion (mN) (Zahlenwerte zur Abbildung 28)

| Hint. lat. | Absolut(mN) | Relativ(%) | Wilcoxon | Wilcoxon |
|----------------|--------------|---------------|----------|----------|
| Zugabe (µg/ml) | MW + SE | MW + SE | p< 0,05 | p>0,005 |
| 0 | 14,20 + 1,81 | 100,00 + 0 | | |
| 40 | 15,50 + 1,87 | 111,37 + 4,11 | + | - |
| 60 | 15,24 + 1,90 | 110,50 + 6,74 | - | + |
| 80 | 15,14 + 1,96 | 109,12 + 6,42 | - | - |
| 100 | 15,30 + 1,81 | 110,73 + 5,11 | - | - |
| 300 | 11,87 + 1,99 | 81,06 + 7,98 | - | + |

MW = arithmetisches Mittel, SE = Standardfehler in % bzw. mN, Wilcoxon = statistischer Test für die Veränderungen innerhalb einer Wirkungskurve bezogen auf die Relativ-Werte p<0,05 = signifikant, p<0,005 = hochsignifikant

3.3.1.6 Wirkung von Coutareagenin an Kalium-vorkontrahierten Präparaten

Wie schon bei *Hintonia latiflora* beschrieben, werden die Aortenringe durch die Zugabe von Kalium (30 mM in der Badlösung) vorkontrahiert und anschließend erfolgt eine kumulative Zugabe von Coutareagenin. Im Gegensatz zur Wirkung des *Hintonia-latiflora*-Extraktes kommt es bereits bei einer Konzentration von 40 µg/ml Coutareagenin zu einer leichten Relaxation der Kalium-induzierten Kontraktion (um $9,29 \pm 17,52$ %). Eine maximale Abnahme der Kontraktionskraft zeigt sich bei einer Konzentration von 90 µg/ml (um $92,00 \pm 6,27$ %). Die EC_{50} liegt bei 61,86. Im Unterschied zu den durch Noradrenalin vorkontrahierten Präparaten müssen hier wesentlich höhere Konzentrationen eingesetzt werden, um eine ausreichende Wirkung zu erzielen

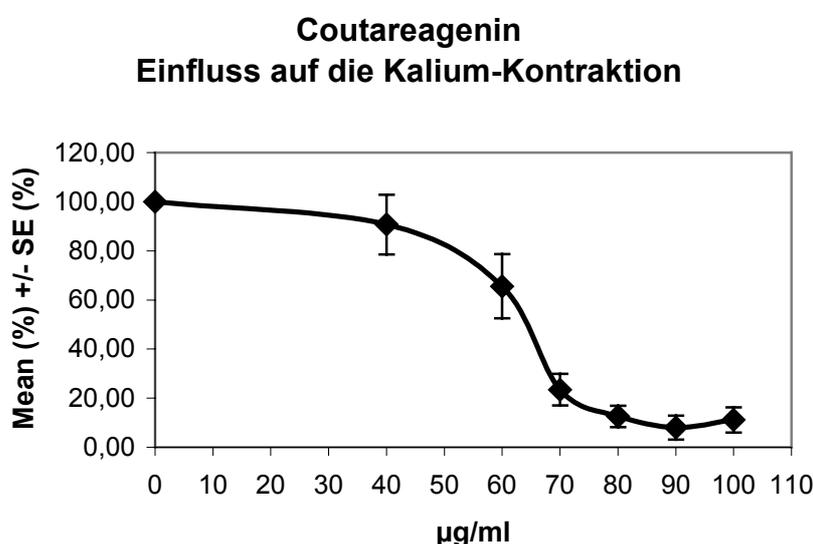


Abbildung 29: Der Einfluss von Coutareagenin auf die Kalium-vorkontrahierten Aortenringe des Meerschweinchens. Mean % = Mittelwert in %, SE % = Standardfehler in %, n = 8

Tabelle 22: Coutareagenin Einfluss auf die Kalium-induzierte Kontraktion (mN) (Zahlenwerte zur Abbildung 29)

| Coutareagenin | Absolut(mN) | Relativ(%) | Wilcoxon | Wilcoxon |
|----------------------|--------------------|----------------------|-----------------|-----------------|
| Zugabe µg/ml | MW + SE | MW + SE | p< 0,05 | p<0,005 |
| 0 | 8,98 + 0,97 | 100,00 + 0 | | |
| 40 | 7,88 + 1,29 | 90,71 + 12,19 | - | - |
| 60 | 5,36 + 0,99 | 65,59 + 13,07 | - | - |
| 70 | 1,78 + 0,44 | 23,45 + 6,44 | + | - |
| 80 | 0,88 + 0,28 | 12,58 + 4,34 | + | - |
| 90 | 0,45 + 0,36 | 8,00 + 4,87 | + | - |
| 100 | 0,73 + 0,39 | 11,13 + 5,10 | + | - |

MW = arithmetisches Mittel, SE = Standardfehler in % bzw. mN, Wilcoxon = statistischer Test für die Veränderungen innerhalb einer Wirkungskurve bezogen auf die Relativ-Werte p<0,05 = signifikant, p<0,005 = hochsignifikant

3.3.2 Kontraktionen des Papillarmuskels

Die Kontraktion des Papillarmuskels wird durch den *Hintonia-latiflora*-Extrakt nur wenig verändert. Abbildung 30 zeigt die Kontraktionen eines Papillarmuskels vor Zugabe und nach Zugabe von 30 µg/ml, 100 µg/ml und 300 µg/ml *Hintonia-latiflora*-Extrakt. Die Kontraktion wird durch den Extrakt weder in der Höhe (Kontraktionskraft) noch in ihrem Zeitverlauf wesentlich verändert. Im Mittel zeigt sich bei kumulativer Zugabe von *Hintonia-latiflora*-Extrakt eine geringe Abnahme der Kontraktionskraft des Papillarmuskels bis 100 µg/ml während es bei 300 µg/ml zu einem leichten Wiederanstieg kommt (Abbildung 31). Die Abnahme der Kraft unter Kontrollbedingungen (mit Ethanol, aber ohne Zugabe von Extrakt) ist etwas stärker.

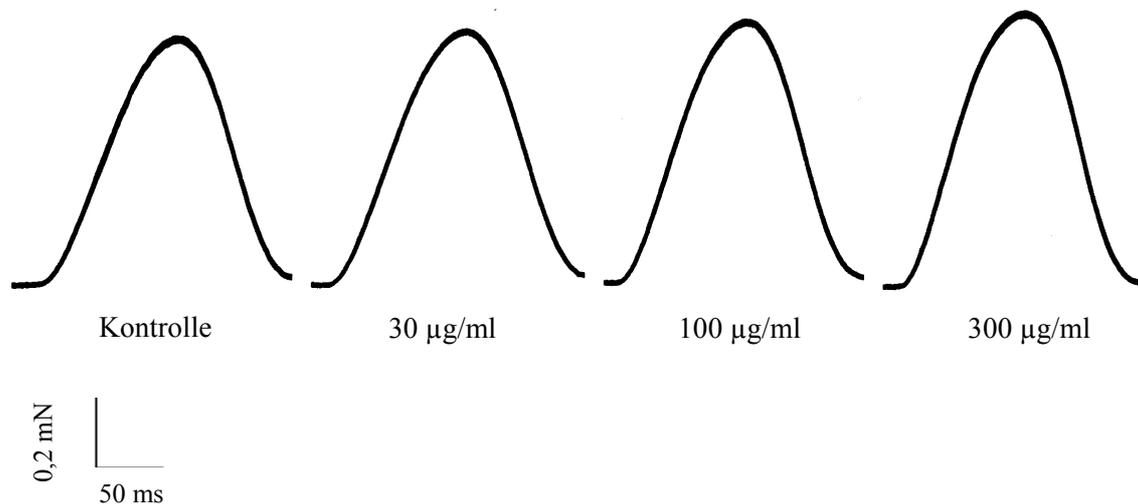


Abbildung 30: Kontraktionskurven eines Papillarmuskels bei verschiedenen Konzentrationen (30, 100, 300 µg/ml) von *Hintonia-latiflora*-Extrakt im Vergleich zur Kontraktionskurve (Kontrolle) vor Zugabe des Extraktes (unten angegeben ist der Maßstab in mN und ms, der für alle Kontraktionskurven gilt).

Hintonia latiflora
Einfluss auf den Papillarmuskel

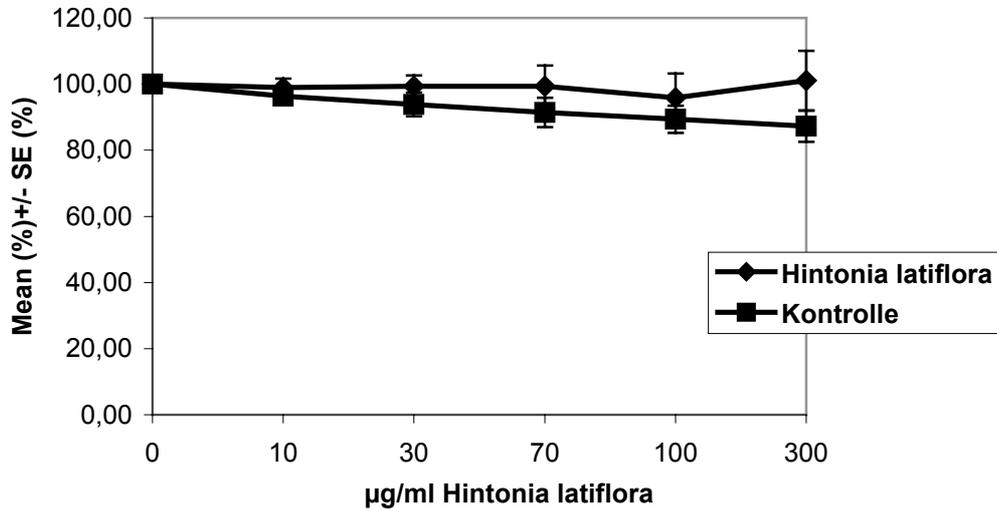


Abbildung 31: Der Einfluss von Hintonia latiflora auf die Kontraktionskraft des Papillarmuskels des Meerschweinchens. Mean % = Mittelwert in %, SE % = Standardfehler in %, n = 8

Tabelle 23: Hintonia-latiflora-Extrakt Einfluss auf den Papillarmuskel (mN) (Zahlenwerte zur Abbildung 31)

| Hint lat. | Absolut(mN) | Relativ(%) | Wilcoxon(rel) | Wilcoxon(rel) |
|----------------|--------------------|----------------------|---------------|---------------|
| Zugabe (µg/ml) | MW + SE | MW + SE | p< 0,05 | p<0,005 |
| 0 | 6,60 + 1,50 | 100,00 + 0 | | |
| 10 | 6,67 + 1,62 | 98,94 + 2,72 | - | - |
| 30 | 6,67 + 1,61 | 99,34 + 3,29 | - | - |
| 70 | 6,73 + 1,68 | 99,30 + 6,36 | - | - |
| 100 | 6,60 + 1,72 | 95,86 + 7,32 | - | - |
| 300 | 6,83 + 1,76 | 101,05 + 9,00 | - | - |

| Kontrolle | Absolut(mN) | Relativ(%) | Wilcoxon(rel) | Wilcoxon(rel) |
|----------------|--------------------|---------------------|---------------|---------------|
| Zugabe (µg/ml) | MW + SE(mN) | MW + SE(%) | p< 0,05 | p<0,005 |
| 0 | 8,94 + 1,81 | 100,00 + 0 | | |
| 10 | 8,59 + 1,73 | 96,30 + 1,76 | - | - |
| 30 | 8,41 + 1,71 | 93,83 + 3,53 | - | - |
| 70 | 8,27 + 1,73 | 91,45 + 4,43 | - | - |
| 100 | 8,17 + 1,78 | 89,38 + 4,11 | - | - |
| 300 | 8,02 + 1,81 | 87,24 + 4,72 | - | - |

MW = arithmetisches Mittel, SE = Standardfehler in % bzw. mN, Wilcoxon = statistischer Test für die Veränderungen innerhalb einer Wirkungskurve bezogen auf die Relativ-Werte p<0,05 = signifikant, p<0,005 = hochsignifikant

3.3.3 Fluoreszenzmikroskopische Calcium-Messungen

In den fluoreszenzmikroskopischen Calcium-Messungen kann gezeigt werden, dass der vorübergehende Calcium-Anstieg (Transient) in A10-Zellen, der durch die Zugabe von 2 nM Vasopressin erreicht wird, unter dem Einfluss von Coutareagenin wesentlich schwächer ausfällt. Abbildung 32 zeigt den Zeitverlauf der intrazellulären freien Calcium-Konzentration nach Zugabe von 2 nM Vasopressin in Abwesenheit und Anwesenheit von Coutareagenin (60 µg/ml). Die Einwirkdauer von Coutareagenin beträgt 40 Minuten. Im Mittel sinkt die Ratio, die ein Maß für die freie Calcium-Konzentration ist, von $0,66 \pm 0,08$ (= 100 %) auf $0,18 \pm 0,03$ (= $27,78 \pm 4,61$ %) ab (Abbildung 33).

Mit Hilfe einer CCD-Kamera kann die räumliche Verteilung der Calcium-Konzentration in der Zelle bildlich dargestellt werden (Abbildung 34). Nach Zugabe von Vasopressin steigt die Calcium-Konzentration in der Zelle an (Änderung des Farbtones von blau nach rot) und fällt anschließend wieder ab. Durch Coutareagenin wird der Calcium-Konzentrationsanstieg in der gesamten Zelle unterdrückt.

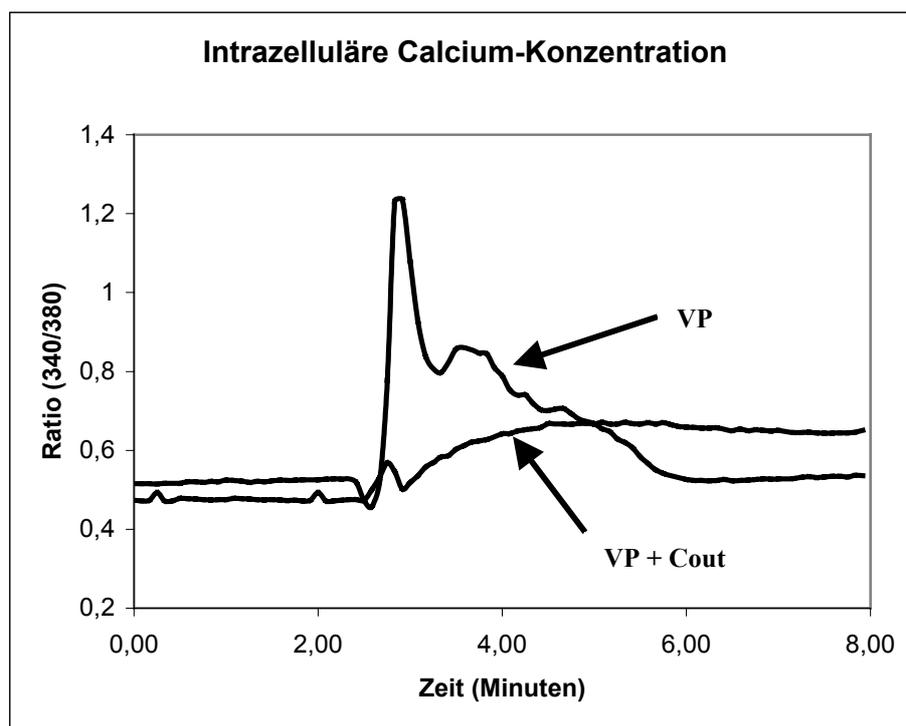


Abbildung 32: Zeitverlauf der intrazellulären Calcium-Konzentration in einer einzelnen Zelle nach Zugabe von Vasopressin (2 nM) ohne und mit Anwesenheit von Coutareagenin. (VP = Vasopressin, VP + Cout = Vasopressin in Anwesenheit von Coutareagenin)

Coutareagenin Einfluss auf den Calcium-Transienten

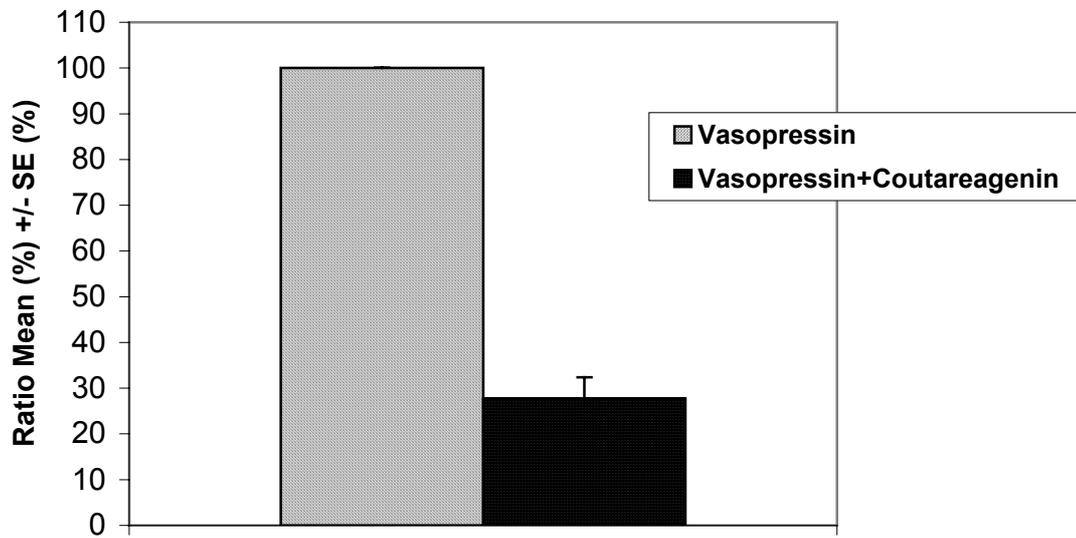


Abbildung 33: Der Einfluss von Coutareagenin auf den durch 2 nM Vasopressin induzierten Calcium-Transienten in Fura-2 beladenen A10-Zellen. Mean (%) = Mittelwert in %, SE (%) = Standardfehler in %, n = 8

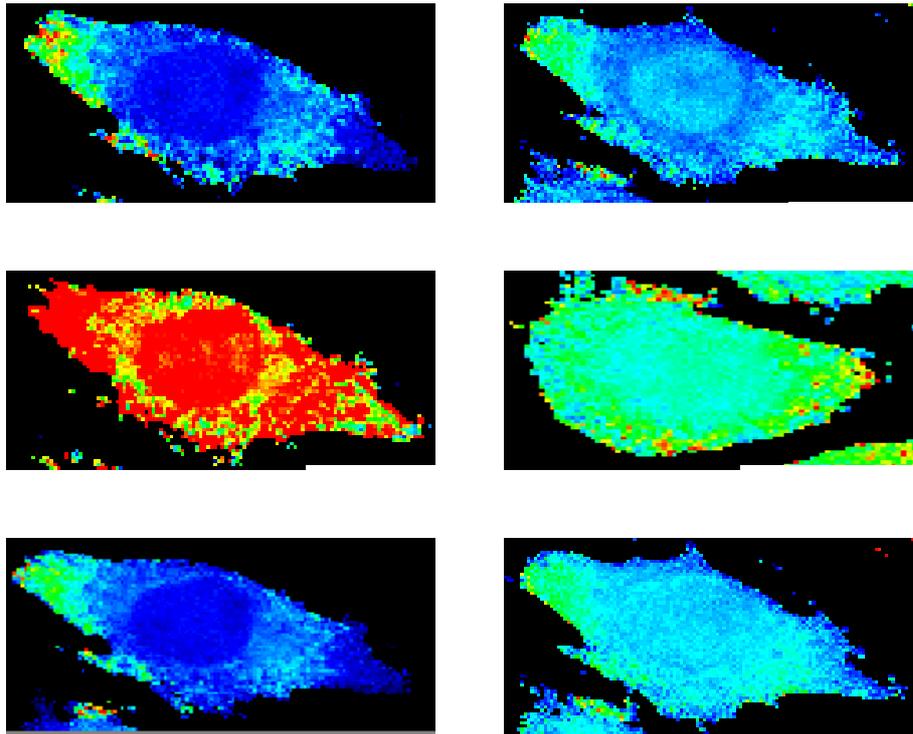


Abbildung 34: Die intrazelluläre Calcium-Verteilung einer Zelle vor und nach Zugabe von Vasopressin (2 nM) ohne (linke Spalte) und mit (rechte Spalte) Einwirken von Coutareagenin. Die Bilder der 1. Reihe zeigen die Zelle vor Zugabe von Vasopressin. In der 2. Reihe ist die Zelle 30 s nach Zugabe von Vasopressin wiedergegeben. Die 3. Reihe stellt die Zelle 5 min nach der Zugabe von Vasopressin dar. Aufnahmen mit einer CCD-Kamera. Wiedergegeben werden farbcodierte Ratio-Werte. Die Abbildung 35 zeigt den Zusammenhang zwischen Ratio-Werten und Farbskala. Niedrige Calcium-Konzentrationen werden durch blaue, hohe durch rote Farbtöne repräsentiert.



Abbildung 35: Farbskala der Calcium-Konzentrationen im Bezug auf die Ratio-Werte. Die angegebenen Ratio-Werte müssen durch Faktor 1000 dividiert werden, um mit den Werten der Abbildung 32 zu korrelieren.

3.3.4 Sonographische Untersuchungen am Kaninchen

Die sonographischen Untersuchungen werden sowohl an 8 Tieren der Hintonia-latiflora-Gruppe als auch an 8 Tieren der Kontroll-Gruppe durchgeführt.

Die Versuchsdurchführung verläuft komplikationslos. Bei keinem der Versuchstiere kann während und nach dem Versuch eine Beeinträchtigung des Allgemeinbefindens festgestellt werden.

3.3.4.1 B-Mode Sonographie an der Aorta abdominalis

Bestimmung des Gefäßdurchmessers der Aorta abdominalis

Der Basalwert wird vor der Gabe von Hintonia-latiflora-Extrakt bzw. der Kontrollsubstanz gemessen und entspricht 100 %. Eine halbe Stunde nach Gabe des Extraktes erweitert sich der Gefäßdurchmesser von 100 % auf $105,28 \pm 1,53$ % (von $3,16 \pm 0,12$ mm auf $3,32 \pm 0,11$ mm). Im Verlauf von 2 Stunden sinkt der Durchmesser auf $102,38 \pm 1,32$ %, um nach 3 Stunden wieder deutlich anzusteigen (auf $105,80 \pm 1,66$ %). Nach 4 Stunden zeigt das Gefäß eine Durchmessererweiterung auf $107,03 \pm 1,99$ % ($3,38 \pm 0,11$ mm). Im Zeitvergleich innerhalb der Gruppe ergibt sich eine signifikante Erweiterung nach einer halben Stunde, nach 3 und nach 4 Stunden. Im Unterschied dazu weist die Kontroll-Gruppe zu keinem Zeitpunkt eine signifikante Änderung auf. Hier kommt es nach einer halben Stunde zu einer Minderung des Gefäßdurchmessers auf $95,86 \pm 2,69$ % (von $3,45 \pm 0,10$ mm auf $3,32 \pm 0,11$ mm), und nach einer Stunde zu einem Wiederanstieg auf $97,05 \pm 2,73$ %, wobei aber im weiteren Verlauf der Ausgangswert nicht mehr erreicht wird. Im Gruppenvergleich zwischen der Hintonia-latiflora-Gruppe im Vergleich zur Kontroll-Gruppe ergibt sich ein signifikanter Unterschied eine halbe Stunde nach Applikation der Substanzen. Bei den Messzeitpunkten nach 3 und 4 Stunden zeigt sich ein deutlicher, aber nicht signifikanter Unterschied.

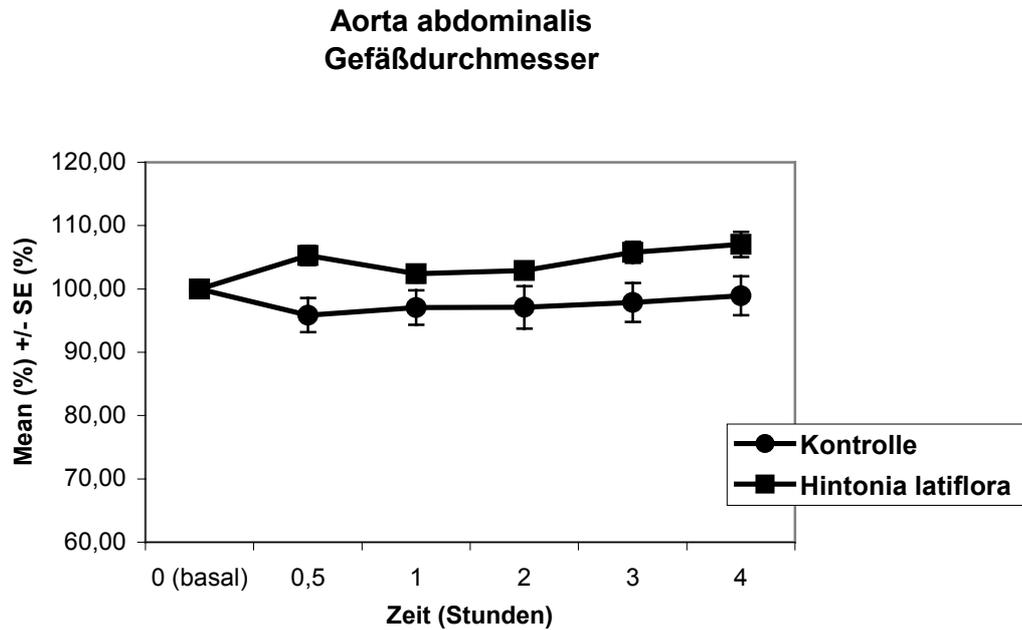


Abbildung 36: Sonographische Darstellung des Gefäßdurchmessers der Aorta abdominalis unter dem Einfluss von Hintonia-latiflora-Extrakt beim wachen Kaninchen. Mean % = Mittelwert in %, SE % = Standardfehler in %, n = jeweils 8

Tabelle 24: Aorta abdominalis Gefäßdurchmesser (mm) (Zahlenwerte zur Abbildung 36)

| Hin. lat. | Absolut(mm) | Relativ(%) | Wilcoxon(rel) | Wilcoxon (rel) | Mann-W.(rel) | Mann-W.(rel) |
|-----------|--------------------|----------------------|---------------|----------------|--------------|--------------|
| Messungen | MW + SE | MW + SE | p< 0,05 | p>0,05<0,1 | p< 0,05 | p>0,05<0,1 |
| Basalwert | 3,16 ± 0,12 | 100,00 ± 0 | | | | |
| M 0,5 h | 3,32 ± 0,11 | 105,28 ± 1,53 | + | - | + | - |
| M 1 h | 3,23 ± 0,12 | 102,38 ± 1,32 | - | + | - | - |
| M 2 h | 3,25 ± 0,12 | 102,90 ± 1,20 | + | - | - | - |
| M 3 h | 3,33 ± 0,10 | 105,80 ± 1,66 | + | - | - | + |
| M 4 h | 3,37 ± 0,11 | 107,03 ± 1,99 | + | - | - | + |

| Kontrolle | Absolut(mm) | Relativ(%) | Wilcoxon (rel) | Wilcoxon (rel) | Mann-W.(rel) | Mann-W.(rel) |
|-----------|--------------------|---------------------|----------------|----------------|--------------|--------------|
| Messungen | MW + SE | MW + SE | p< 0,05 | p>0,05<0,1 | p< 0,05 | p>0,05<0,1 |
| Basalwert | 3,45 ± 0,10 | 100,00 ± 0 | | | | |
| M 0,5 h | 3,32 ± 0,11 | 95,86 ± 2,69 | - | - | + | - |
| M 1 h | 3,33 ± 0,10 | 97,05 ± 2,73 | - | - | - | - |
| M 2 h | 3,35 ± 0,13 | 97,08 ± 3,33 | - | - | - | - |
| M 3 h | 3,36 ± 0,09 | 97,88 ± 3,07 | - | - | - | + |
| M 4 h | 3,40 ± 0,10 | 98,93 ± 3,09 | - | - | - | + |

MW = arithmetisches Mittel, SE = Standardfehler in % bzw. (mm), Wilcoxon = statistischer Test für die Veränderungen innerhalb einer Wirkungskurve bezogen auf die Relativ-Werte, Mann-Whitney-Test = Unterschied zwischen Kontrolle und Hintonia latiflora, p<0,05 = signifikant, p>0,05<0,1 = tendenziell

Maximale systolische Blutflussgeschwindigkeit (MSB) der Aorta abdominalis

Bei der *Hintonia latiflora* Gruppe kommt es anfangs zu einem Anstieg der Blutflussgeschwindigkeit, die im weiteren Verlauf jedoch langsam abnimmt und nach 3 Stunden deutlich unter den Ausgangswert von 100 % auf $92,34 \pm 6,04$ % (von $69,30 \pm 2,67$ cm/s auf $65,76 \pm 3,84$ cm/s) sinkt. Die Werte im Zeitvergleich innerhalb der Gruppe sind für die *Hintonia-latiflora*-Gruppe nicht signifikant. In der Kontroll-Gruppe steigt der Blutfluss in der Aorta nach einer Stunde deutlich an und erreicht nach 2 Stunden sein Maximum von $113,66 \pm 13,14$ % (Anstieg von $69,43 \pm 5,96$ cm/s auf $74,64 \pm 4,00$ cm/s). Auch nach 4 Stunden liegt die Blutflussgeschwindigkeit in der Kontroll-Gruppe noch über dem Basalwert. Der Vergleich zwischen der *Hintonia-latiflora*-Gruppe und der Kontroll-Gruppe ergibt einen deutlichen Unterschied zwischen den Gruppen zum Messzeitpunkt nach 3 Stunden wobei sich aber keiner der Unterschiede als signifikant erweist.

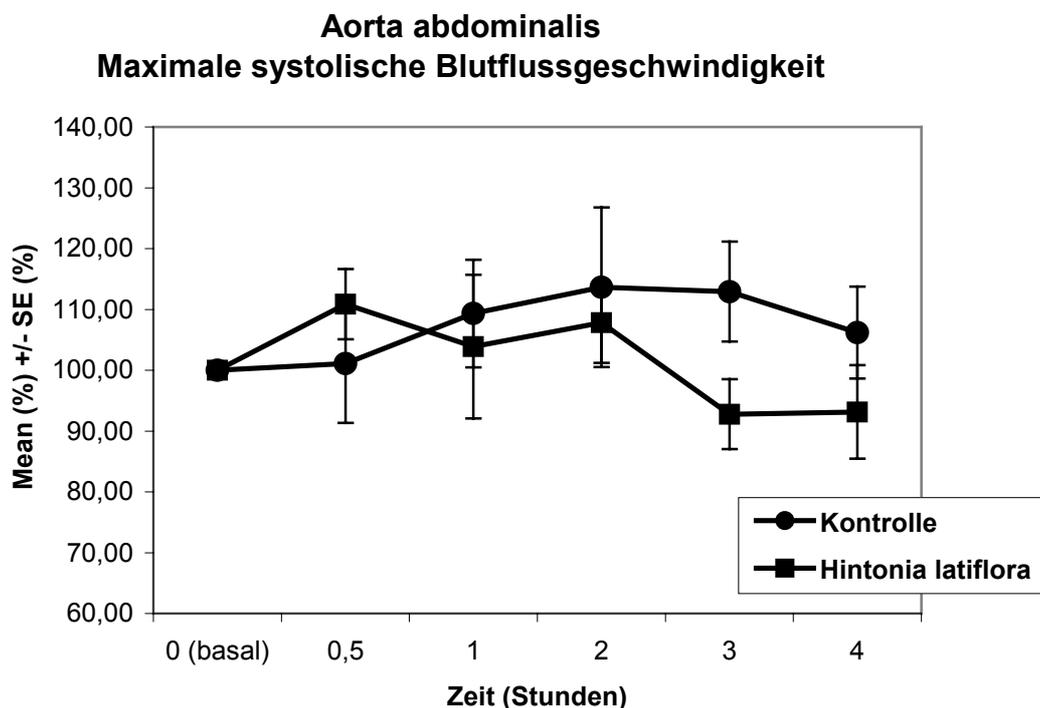


Abbildung 37: Sonographische Darstellung der maximalen systolischen Blutflussgeschwindigkeit in der Aorta abdominalis unter *Hintonia-latiflora*-Extrakt am wachen Kaninchen. Mean % = Mittelwert in %, SE = Standardfehler in %, n = jeweils 8

Tabelle 25: Aorta abdominalis Maximale systolische Blutflussgeschwindigkeit (cm/s)
(Zahlenwerte zur Abbildung 37)

| Hin. lat. | Absolut(cm/s) | Relativ(%) | Wilcoxon (rel) | Wilcoxon (rel) | Mann-W.(rel) | Mann-W.(rel) |
|-----------|---------------------|-----------------------|----------------|----------------|--------------|--------------|
| Messungen | MW ± SE | MW ± SE | p< 0,05 | p>0,05<0,1 | p< 0,05 | p>0,05<0,1 |
| Basalwert | 69,30 ± 2,67 | 100,00 ± 0 | | | | |
| M 0,5 h | 78,63 ± 4,12 | 110,86 ± 5,76 | - | - | - | - |
| M 1 h | 75,78 ± 3,87 | 103,89 ± 11,82 | - | - | - | - |
| M 2 h | 74,80 ± 3,01 | 107,84 ± 6,63 | - | - | - | - |
| M 3 h | 65,76 ± 3,84 | 92,77 ± 5,75 | - | - | - | + |
| M 4 h | 66,32 ± 6,34 | 93,13 ± 7,70 | - | - | - | - |

| Kontrolle | Absolut(cm/s) | Relativ(%) | Wilcoxon (rel) | Wilcoxon (rel) | Mann-W.(rel) | Mann-W.(rel) |
|-----------|---------------------|-----------------------|----------------|----------------|--------------|--------------|
| Messungen | MW ± SE | MW ± SE | p< 0,05 | p>0,05<0,1 | p< 0,05 | p>0,05<0,1 |
| Basalwert | 69,43 ± 5,96 | 100,00 ± 0 | | | | |
| M 0,5 h | 67,04 ± 3,62 | 101,09 ± 9,78 | - | - | - | - |
| M 1 h | 72,91 ± 3,54 | 109,32 ± 8,83 | - | - | - | - |
| M 2 h | 74,64 ± 4,00 | 113,66 ± 13,14 | - | - | - | - |
| M 3 h | 76,10 ± 4,34 | 112,94 ± 8,21 | - | - | - | + |
| M 4 h | 71,50 ± 3,58 | 106,20 ± 7,55 | - | - | - | - |

MW = arithmetisches Mittel, SE = Standardfehler in % bzw. (cm/s), Wilcoxon = statistischer Test für die Veränderungen innerhalb einer Wirkungskurve bezogen auf die Relativ-Werte, Mann-Whitney-Test = Unterschied zwischen Kontrolle und Hintonia latiflora, p<0,05 = signifikant, p>0,05<0,1 = tendenziell

Enddiastolische Blutflussgeschwindigkeit der Aorta abdominalis

Nach Verabreichung von Hintonia-latiflora-Extrakt steigt die enddiastolische Blutflussgeschwindigkeit nach 30 Minuten von 100 % auf 118,22 ± 17,85 % (von 13,38 ± 1,23 cm/s auf 14,74 ± 1,82 cm/s). Zum Messzeitpunkt von 2 Stunden sinkt die enddiastolische Blutflussgeschwindigkeit auf 110,48 ± 18,99 % ab und liegt nach 4 Stunden bei 110,90 ± 15,49 %. Im Zeitvergleich innerhalb der Gruppe ist keiner der Werte signifikant. Im Gegensatz dazu fällt die enddiastolische Blutflussgeschwindigkeit in der Kontroll-Gruppe nach 30 Minuten von 100 % auf 96,66 ± 9,24 % (14,87 ± 1,53 cm/s auf 13,65 ± 1,14 cm/s) ab. Anschließend steigt der Wert zum Messzeitpunkt von 2 Stunden auf 119,00 ± 18,75 % an und erreicht nach 4 Stunden sein Maximum von 120,93 ± 9,32 %. Keiner der Werte zeigt im Zeitvergleich innerhalb der Gruppen einen signifikanten Unterschied. Auch im Vergleich zwischen Hintonia latiflora und Kontroll-Gruppe ergeben sich keine signifikanten Unterschiede.

**Aorta abdominalis
Enddiastolische Blutflussgeschwindigkeit**

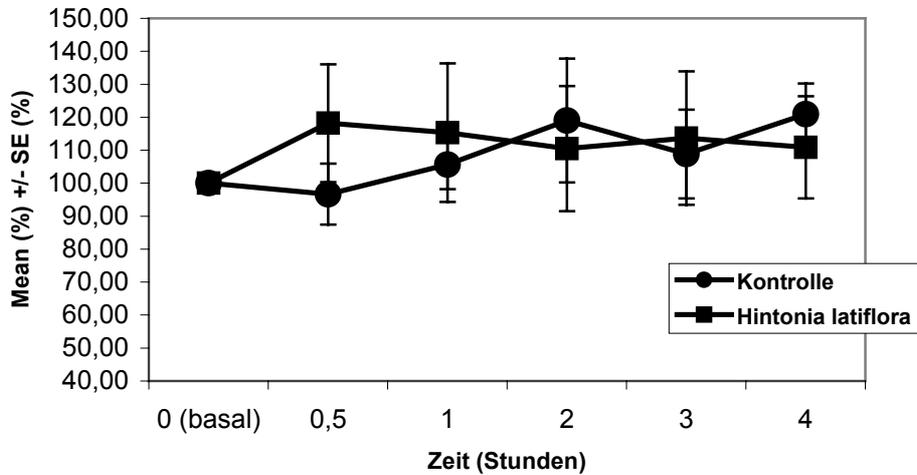


Abbildung 38: Sonographische Darstellung der enddiastolischen Blutflussgeschwindigkeit in der Aorta abdominalis unter Hintonia-latiflora-Extrakt am wachen Kaninchen. Mean % = Mittelwert in %, SE = Standardfehler in %, n = jeweils 8

Tabelle 26: Aorta abdominalis Enddiastolische Blutflussgeschwindigkeit (cm/s) (Zahlenwerte zur Abbildung 38)

| Hin. lat. | Absolut(cm/s) | Relativ(%) | Wilcoxon (rel) | Wilcoxon (rel) | Mann-W.(rel) | Mann-W.(rel) |
|-----------|---------------------|-----------------------|----------------|----------------|--------------|--------------|
| Messungen | MW + SE | MW + SE | p< 0,05 | p>0,05<0,1 | p< 0,05 | p>0,05<0,1 |
| Basalwert | 13,38 + 1,23 | 100,00 + 0 | | | | |
| M 0,5 h | 14,74 + 1,82 | 118,22 + 17,85 | - | - | - | - |
| M 1 h | 14,08 + 1,68 | 115,37 + 21,02 | - | - | - | - |
| M 2 h | 13,65 + 1,93 | 110,48 + 18,99 | - | - | - | - |
| M 3 h | 13,70 + 1,16 | 113,67 + 20,25 | - | - | - | - |
| M 4 h | 14,36 + 2,29 | 110,90 + 15,49 | - | - | - | - |

| Kontrolle | Absolut(cm/s) | Relativ(%) | Wilcoxon (rel) | Wilcoxon (rel) | Mann-W.(rel) | Mann-W.(rel) |
|-----------|---------------------|-----------------------|----------------|----------------|--------------|--------------|
| Messungen | MW + SE | MW + SE | p< 0,05 | p>0,05<0,1 | p< 0,05 | p>0,05<0,1 |
| Basalwert | 14,87 + 1,53 | 100,00 + 0 | | | | |
| M 0,5 h | 13,65 + 1,14 | 96,66 + 9,24 | - | - | - | - |
| M 1 h | 15,61 + 1,95 | 105,67 + 7,50 | - | - | - | - |
| M 2 h | 16,07 + 1,12 | 119,00 + 18,75 | - | - | - | - |
| M 3 h | 15,01 + 0,84 | 108,85 + 13,48 | - | - | - | - |
| M 4 h | 17,49 + 1,54 | 120,93 + 9,32 | - | + | - | - |

MW = arithmetisches Mittel, SE = Standardfehler in % bzw. (mm), Wilcoxon = statistischer Test für die Veränderungen innerhalb einer Wirkungskurve bezogen auf die Relativ-Werte, Mann-Whitney-Test = Unterschied zwischen Kontrolle und Hintonia latiflora, p<0,05 = signifikant, p>0,05<0,1 = tendenziell

Resistenz-Index (RI) der Aorta abdominalis

Zusätzlich zur Bestimmung der systolischen und enddiastolischen Blutflussgeschwindigkeit wurde der Resistenz-Index ausgewertet. Der Resistenz-Index errechnet sich aus der maximalen systolischen und enddiastolischen Blutflussgeschwindigkeit (Formel siehe Seite 77). Dieser Parameter korreliert mit der maximalen systolischen und enddiastolischen Blutflussgeschwindigkeit und erlaubt eine Aussage über die Gefäßspannung und indirekt über den peripheren Widerstand im Endstromgebiet des untersuchten Gefäßes. Der RI kann somit zu einer Beurteilung der Wirkung des Hintonia-latiflora-Extraktes in der Peripherie beitragen. Der RI der Hintonia-latiflora-Gruppe zeigt keine signifikante Änderung im Zeitvergleich innerhalb der Gruppe. Auch bei der Kontroll-Gruppe stellt sich beim Zeitvergleich innerhalb der Gruppe keine signifikante Veränderung ein. Bei Vergleich beider Gruppen ergeben sich nur geringe, nicht signifikante Unterschiede zwischen der Hintonia-latiflora- und der Kontroll-Gruppe.

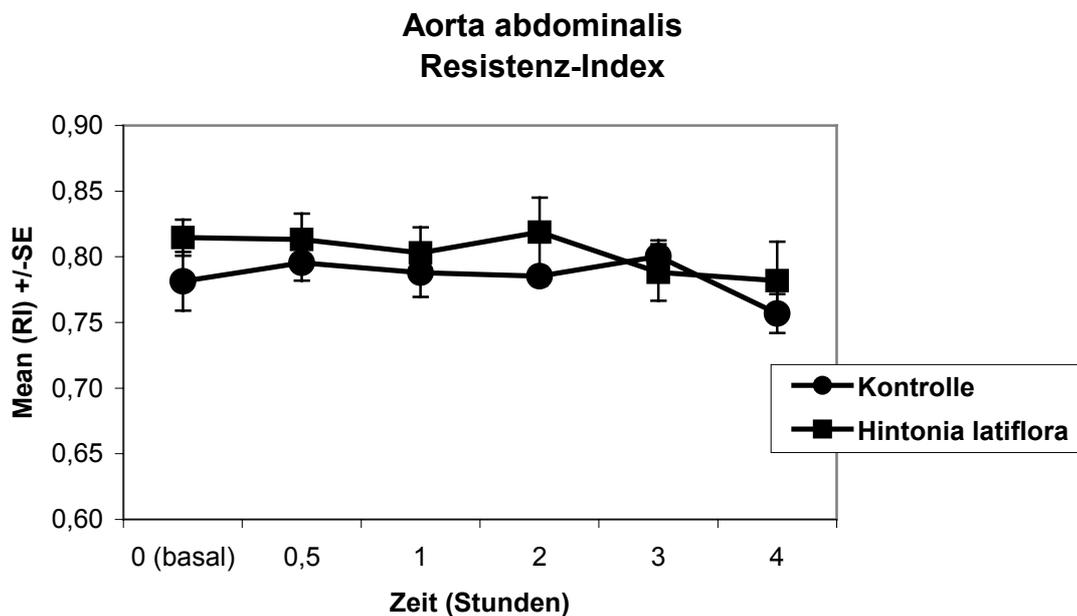


Abbildung 39: Resistenz-Index der Aorta abdominalis unter dem Einfluss von Hintonia-latiflora-Extrakt. Mean % = Mittelwert in %, SE = Standardfehler in %, n = jeweils 8

Tabelle 27: Aorta abdominalis Resistenz-Index (Zahlenwerte zur Abbildung 39)

| Hin. lat. | Absolut | Wilcoxon (rel) | Wilcoxon (rel) | Mann-W.(rel) | Mann-W.(rel) |
|------------------|-----------------------------------|----------------|----------------|--------------|--------------|
| Messungen | MW \pm SE | p< 0,05 | p>0,05<0,1 | p< 0,05 | p>0,05<0,1 |
| Basalwert | 0,81 \pm 0,01 | | | | |
| M 0,5 h | 0,81 \pm 0,02 | - | - | - | - |
| M 1 h | 0,80 \pm 0,02 | - | - | - | - |
| M 2 h | 0,82 \pm 0,03 | - | - | - | + |
| M 3 h | 0,79 \pm 0,02 | - | - | - | - |
| M 4 h | 0,78 \pm 0,03 | - | - | - | - |

| Kontrolle | Absolut | Wilcoxon (rel) | Wilcoxon (rel) | Mann-W. (rel) | Mann-W.(rel) |
|------------------|-----------------------------------|----------------|----------------|---------------|--------------|
| Messungen | MW \pm SE | p< 0,05 | p>0,05<0,1 | p< 0,05 | p>0,05<0,1 |
| Basalwert | 0,78 \pm 0,02 | | | | |
| M 0,5 h | 0,80 \pm 0,01 | - | - | - | - |
| M 1 h | 0,79 \pm 0,02 | - | - | - | - |
| M 2 h | 0,79 \pm 0,01 | - | - | - | + |
| M 3 h | 0,80 \pm 0,01 | - | - | - | - |
| M 4 h | 0,76 \pm 0,01 | - | - | - | - |

MW = arithmetisches Mittel, SE = Standardfehler, Wilcoxon = statistischer Test für die Veränderungen innerhalb einer Wirkungskurve bezogen auf die Relativ-Werte, Mann-Whitney-Test = Unterschied zwischen Kontrolle und *Hintonia latiflora*, p<0,05 = signifikant, p>0,05<0,1 = tendenziell

3.3.4.2 B-Mode Sonographie an der *A. carotis communis*

Bestimmung des Gefäßdurchmessers der *A. carotis communis*

Nach Verabreichung des *Hintonia-latiflora*-Extraktes erfolgt innerhalb einer halben Stunde eine Erweiterung des Gefäßes von 100 % auf $103,07 \pm 2,89$ % (von $1,82 \pm 0,07$ mm auf $1,89 \pm 0,05$ mm) die im Verlauf der nächsten 2 Stunden leicht zurückgeht, aber nie unter den Ausgangswert sinkt und am Ende der Messungen wieder bei $103,08 \pm 4,79$ % liegt. Die Veränderungen sind aber im Zeitvergleich innerhalb der Gruppe nicht signifikant.

In der Kontroll-Gruppe sinkt der Gefäßdurchmesser der *A. carotis communis* nach 2 Stunden von 100 % auf $96,78 \pm 2,78$ % (von $1,91 \pm 0,08$ mm auf $1,83 \pm 0,07$ mm) bleibt dann weitgehend konstant und liegt bei der letzten Messung nach 4 Stunden bei $97,00 \pm 3,29$ %. Im Zeitvergleich innerhalb der Gruppe gibt es keine signifikanten Unterschiede. Auch im Vergleich zwischen *Hintonia-latiflora*-Gruppe und Kontroll-Gruppe zeigen sich keine signifikanten Unterschiede.

**A. carotis communis
Gefäßdurchmesser**

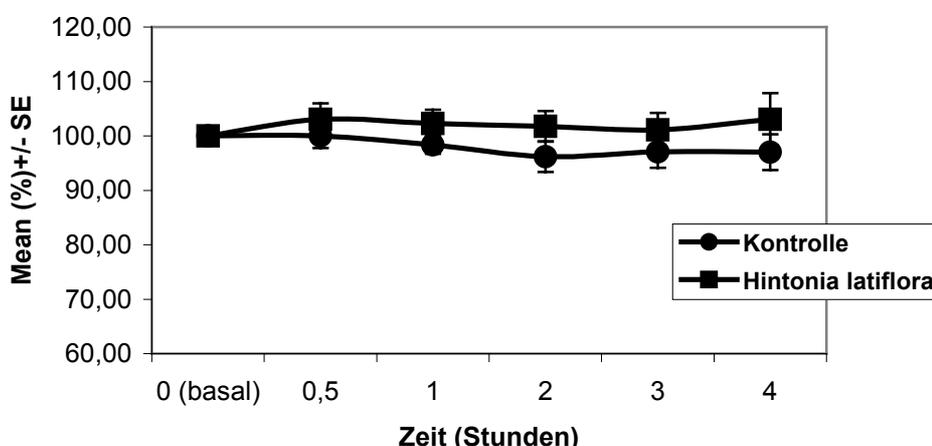


Abbildung 40: Sonographische Darstellung des Gefäßdurchmessers der A. carotis communis unter Hintonia-latiflora-Extrakt am wachen Kaninchen. Mean % = Mittelwert in %, SE = Standardfehler in %, n = jeweils 8

Tabelle 28: A. carotis communis Gefäßdurchmesser (mm) (Zahlenwerte zur Abbildung 40)

| Hint. lat. | Absolut(mm) | Relativ(%) | Wilcoxon (rel) | Wilcoxon (rel) | Mann-W.(rel) | Mann-W.(rel) |
|------------|--------------------|----------------------|----------------|----------------|--------------|--------------|
| Messungen | MW + SE | MW + SE | p< 0,05 | p>0,05<0,1 | p< 0,05 | p>0,05<0,1 |
| Basalwert | 1,82 + 0,07 | 100,00 + 0 | | | | |
| M 0,5 h | 1,89 + 0,05 | 103,07 + 2,89 | - | - | - | - |
| M 1 h | 1,87 + 0,05 | 102,31 + 2,49 | - | - | - | - |
| M 2 h | 1,85 + 0,05 | 101,78 + 2,78 | - | - | - | - |
| M 3 h | 1,85 + 0,06 | 101,14 + 3,05 | - | - | - | - |
| M 4 h | 1,85 + 0,04 | 103,08 + 4,79 | - | - | - | - |

| Kontrolle | Absolut(mm) | Relativ(%) | Wilcoxon (rel) | Wilcoxon (rel) | Mann-W.(rel) | Mann-W.(rel) |
|-----------|--------------------|----------------------|----------------|----------------|--------------|--------------|
| Messungen | MW + SE | MW + SE | p< 0,05 | p>0,05<0,1 | p< 0,05 | p>0,05<0,1 |
| Basalwert | 1,91 + 0,08 | 100,00 + 0 | | | | |
| M 0,5 h | 1,91 + 0,07 | 100,02 + 2,25 | - | - | - | - |
| M 1 h | 1,88 + 0,07 | 98,39 + 1,66 | - | - | - | - |
| M 2 h | 1,83 + 0,07 | 96,18 + 2,78 | - | - | - | - |
| M 3 h | 1,85 + 0,09 | 97,04 + 2,91 | - | - | - | - |
| M 4 h | 1,84 + 0,06 | 97,00 + 3,29 | - | - | - | - |

MW = arithmetisches Mittel, SE = Standardfehler in % bzw. (mm), Wilcoxon = statistischer Test für die Veränderungen innerhalb einer Wirkungskurve bezogen auf die Relativ-Werte, Mann-Whitney-Test = Unterschied zwischen Kontrolle und Hintonia latiflora, p<0,05 = signifikant, p>0,05<0,1 = tendenziell

Maximale systolische Blutflussgeschwindigkeit (MSB) der A. carotis communis

Eine halbe Stunde nach Applikation des Hintonia-latiflora-Extraktes kommt es im Zeitvergleich innerhalb der Gruppe zu einem signifikanten Absinken der MSB von 100 % auf $81,57 \pm 4,01$ % (von $95,14 \pm 9,36$ cm/s auf $73,81 \pm 5,94$ cm/s). Nach 2 Stunden wird ein Wiederanstieg der Blutflussgeschwindigkeit auf $92,91 \pm 10,20$ % (auf $83,63 \pm 5,96$ cm/s) beobachtet, der nach 4 Stunden, am Ende der Messungen, auf $88,99 \pm 6,45$ % (auf $81,94 \pm 5,58$ cm/s) abfällt.

Auch in der Kontroll-Gruppe ist nach einer halben Stunde ein deutliches Sinken des MSB von 100 % auf $89,53 \pm 6,35$ % (von $81,25 \pm 6,14$ cm/s auf $71,38 \pm 4,62$ cm/s) zu registrieren, aber bereits zum Zeitpunkt der nächsten Messung, nach einer Stunde, ergibt sich ein Anstieg auf $95,22 \pm 7,41$ %. Im weiteren Verlauf nimmt die MSB kontinuierlich zu und befindet sich nach 4 Stunden mit $111,34 \pm 8,20$ % (auf $88,95 \pm 6,65$ cm/s) erheblich über dem Basalwert. Für die Kontroll-Gruppe zeigen sich innerhalb des Zeitvergleichs der Gruppe keine signifikanten Unterschiede. Insgesamt ergibt sich bei der Messung nach 4 Stunden ein deutlicher Unterschied im Gruppenvergleich zwischen Kontroll-Gruppe und Hintonia-latiflora-Gruppe.

**A. carotis communis
Maximale systolische Blutflussgeschwindigkeit**

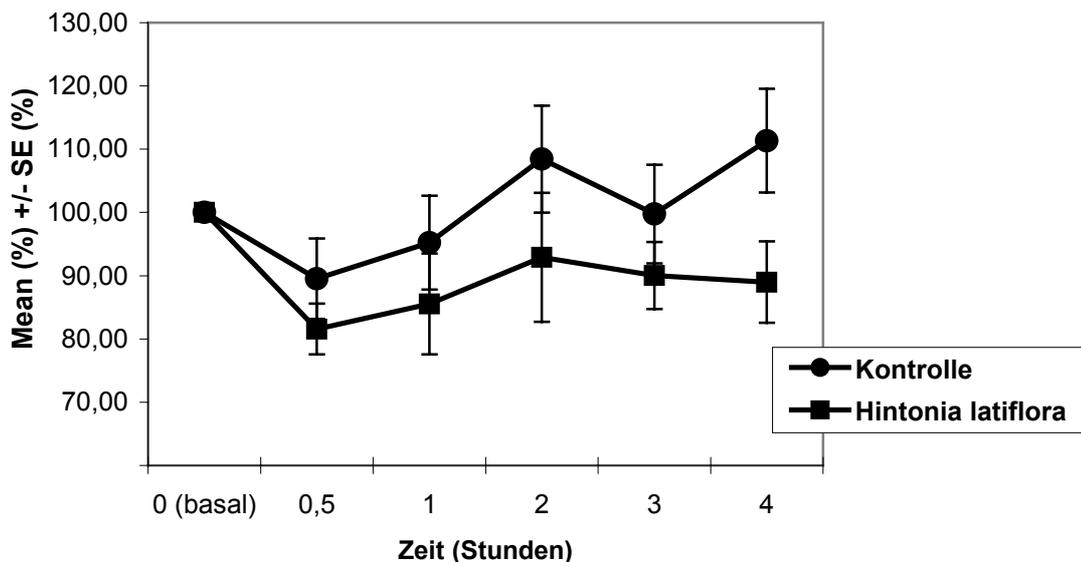


Abbildung 41: Darstellung der maximalen systolischen Blutflussgeschwindigkeit der A. carotis communis am wachen Kaninchen unter dem Einfluss von Hintonia-latiflora-Extrakt. Mean % = Mittelwert in %, SE = Standardfehler in %, n = jeweils 8

EIGENE UNTERSUCHUNGEN

Tabelle 29: A. carotis communis Maximale systolische Blutflussgeschwindigkeit (cm/s)
(Zahlenwerte zur Abbildung 41)

| Hint. lat. | Absolut(cm/s) | Relativ(%) | Wilcoxon(rel) | Wilcoxon(rel) | Mann-W.(rel) | Mann-W.(rel) |
|-------------------|------------------------------------|-------------------------------------|---------------|---------------|--------------|--------------|
| Messungen | MW \pm SE | MW \pm SE | p< 0,05 | p>0,05<0,1 | p< 0,05 | p>0,05<0,1 |
| Basalwert | 95,14 \pm 9,36 | 100,00 \pm 0 | | | | |
| M 0,5 h | 73,81 \pm 5,94 | 81,57 \pm 4,01 | + | - | - | - |
| M 1 h | 78,33 \pm 6,75 | 85,54 \pm 7,98 | - | - | - | - |
| M 2 h | 83,63 \pm 5,96 | 92,91 \pm 10,20 | - | - | - | - |
| M 3 h | 84,10 \pm 6,86 | 90,01 \pm 5,29 | - | - | - | - |
| M 4 h | 81,94 \pm 5,58 | 88,99 \pm 6,45 | - | - | - | + |

| Kontrolle | Absolut(cm/s) | Relativ(%) | Wilcoxon(rel) | Wilcoxon(rel) | Mann-W.(rel) | Mann-W.(rel) |
|------------------|------------------------------------|-------------------------------------|---------------|---------------|--------------|--------------|
| Messungen | MW \pm SE | MW \pm SE | p< 0,05 | p>0,05<0,1 | p< 0,05 | p>0,05<0,1 |
| Basalwert | 81,20 \pm 6,14 | 100,00 \pm 0 | | | | |
| M 0,5 h | 71,38 \pm 4,62 | 89,53 \pm 6,35 | - | - | - | - |
| M 1 h | 75,86 \pm 5,26 | 95,22 \pm 7,41 | - | - | - | - |
| M 2 h | 85,83 \pm 5,16 | 108,44 \pm 8,44 | - | - | - | - |
| M 3 h | 79,81 \pm 6,01 | 99,76 \pm 7,80 | - | - | - | - |
| M 4 h | 88,95 \pm 6,65 | 111,34 \pm 8,20 | - | - | - | + |

MW = arithmetisches Mittel, SE = Standardfehler in % bzw. cm/s, Wilcoxon = statistischer Test für die Veränderungen innerhalb einer Wirkungskurve bezogen auf die Relativ-Werte, Mann-Whitney-Test = Unterschied zwischen Kontrolle und Hintonia latiflora, p<0,05 = signifikant, p>0,05<0,1 = tendenziell

Enddiastolische Blutflussgeschwindigkeit der A. carotis communis

Die enddiastolische Blutflussgeschwindigkeit sinkt in der Hintonia-latiflora-Gruppe konstant ab. Nach einer halben Stunde fällt die Blutflussgeschwindigkeit von 100 % auf $95,35 \pm 8,29$ % (von einem Ausgangswert von $21,60 \pm 2,16$ cm/s auf $20,11 \pm 2,04$ cm/s). Zum Messzeitpunkt von 2 Stunden liegt der Wert bei $88,37 \pm 14,27$ %, nach 3 Stunden bereits bei $74,16 \pm 8,01$ und nach 4 Stunden nimmt die enddiastolische Blutflussgeschwindigkeit auf $70,07 \pm 7,48$ % ab. Im Zeitvergleich innerhalb der Gruppe erweisen sich die Werte nach 3 und 4 Stunden als signifikant im Vergleich zum Ausgangswert. In der Kontroll-Gruppe findet nach einer halben Stunde zunächst eine Senkung von 100 % auf $91,13 \pm 14,80$ % (von $16,83 \pm 1,28$ cm/s auf $14,63 \pm 1,73$ cm/s) statt. Anschließend kommt es jedoch zu einem Wiederanstieg, der nach 2 Stunden bei $104,91 \pm 17,48$ % und nach 4 Stunden bei $104,04 \pm 13,95$ % liegt. Keiner der Werte in der Kontroll-Gruppe zeigt einen signifikanten Unterschied im Zeitvergleich innerhalb der Gruppe. Im Vergleich zwischen Hintonia-latiflora- und Kontroll-Gruppe ist der Messzeitpunkt nach 4 Stunden signifikant unterschiedlich.

A. carotis communis
Enddiastolische Blutflussgeschwindigkeit

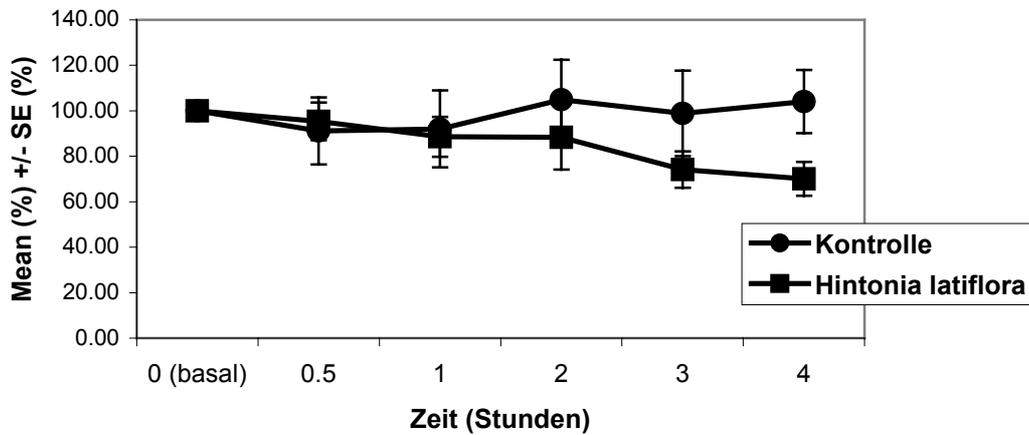


Abbildung 42: Darstellung der enddiastolischen Blutflussgeschwindigkeit der A. carotis communis am wachen Kaninchen unter dem Einfluss von Hintonia-latiflora-Extrakt. Mean % = Mittelwert in %, SE = Standardfehler in %, n = jeweils 8

Tabelle 30: A. carotis communis Enddiastolische Blutflussgeschwindigkeit (cm/s) (Zahlenwerte zur Abbildung 42)

| Hint. lat. | Absolut(cm/s) | Relativ(%) | Wilcoxon(rel) | Wilcoxon(rel) | Mann-W. (rel) | Mann-W. (rel) |
|------------|---------------------|----------------------|---------------|---------------|---------------|---------------|
| Messungen | MW ± SE | MW ± SE | p< 0,05 | p>0,05<0,1 | p< 0,05 | p>0,05<0,1 |
| Basalwert | 21,60 ± 2,16 | 100,00 ± 0 | | | | |
| M 0,5 h | 20,11 ± 2,04 | 95,35 ± 8,29 | - | - | - | - |
| M 1 h | 18,76 ± 2,31 | 88,57 ± 8,78 | - | - | - | - |
| M 2 h | 18,43 ± 2,72 | 88,37 ± 14,27 | - | - | - | - |
| M 3 h | 15,31 ± 1,18 | 74,16 ± 8,01 | + | - | - | - |
| M 4 h | 14,87 ± 1,79 | 70,07 ± 7,48 | + | - | + | - |

| Kontrolle | Absolut(cm/s) | Relativ(%) | Wilcoxon(rel) | Wilcoxon(rel) | Mann-W. (rel) | Mann-W. (rel) |
|-----------|---------------------|-----------------------|---------------|---------------|---------------|---------------|
| Messungen | MW ± SE | MW ± SE | p< 0,05 | p>0,05<0,1 | p< 0,05 | p>0,05<0,1 |
| Basalwert | 16,83 ± 1,28 | 100,00 ± 0 | | | | |
| M 0,5 h | 14,63 ± 1,73 | 91,13 ± 14,80 | - | - | - | - |
| M 1 h | 14,82 ± 2,04 | 92,04 ± 16,95 | - | - | - | - |
| M 2 h | 17,17 ± 2,89 | 104,91 ± 17,48 | - | - | - | - |
| M 3 h | 15,87 ± 2,56 | 98,81 ± 18,81 | - | - | - | - |
| M 4 h | 16,82 ± 1,80 | 104,04 ± 13,95 | - | - | + | - |

MW = arithmetisches Mittel, SE = Standardfehler in % bzw. cm/s, Wilcoxon = statistischer Test für die Veränderungen innerhalb einer Wirkungskurve bezogen auf die Relativ-Werte, Mann-Whitney-Test = Unterschied zwischen Kontrolle und Hintonia latiflora, p<0,05 = signifikant, p>0,05<0,1 = tendenziell

Resistenz-Index (RI) der *A. carotis communis*

Wie bereits erwähnt, wird der Resistenz-Index als Parameter für den peripheren Widerstand im Endstromgebiet ausgewertet. Der Resistenz-Index ergibt sich aus maximaler systolischer und enddiastolischer Blutflussgeschwindigkeit. In der *Hintonia-latiflora*-Gruppe ergibt sich eine Verminderung des RI nach einer halben Stunde von $0,76 \pm 0,03$ (Ausgangswert) auf $0,74 \pm 0,01$. Anschließend erfolgt nach 1 Stunde ein Anstieg auf $0,76 \pm 0,03$. Nach 3 Stunden ergibt sich im Zeitvergleich innerhalb der Gruppe ein signifikanter Anstieg (auf $0,81 \pm 0,02$) und nach 4 Stunden auf $0,82 \pm 0,02$ (nicht signifikant). In der Kontroll-Gruppe ergeben sich keine signifikanten Veränderungen im Zeitvergleich innerhalb der Gruppe. Der RI steigt nach einer halben Stunde von $0,78 \pm 0,02$ auf $0,80 \pm 0,02$ an und bleibt etwa auf dem gleichen Wert bis zum Ende der Messungen. Im Vergleich zwischen der Kontroll-Gruppe und der *Hintonia-latiflora*-Gruppe ist ein signifikanter Unterschied nach einer halben Stunde zu sehen.

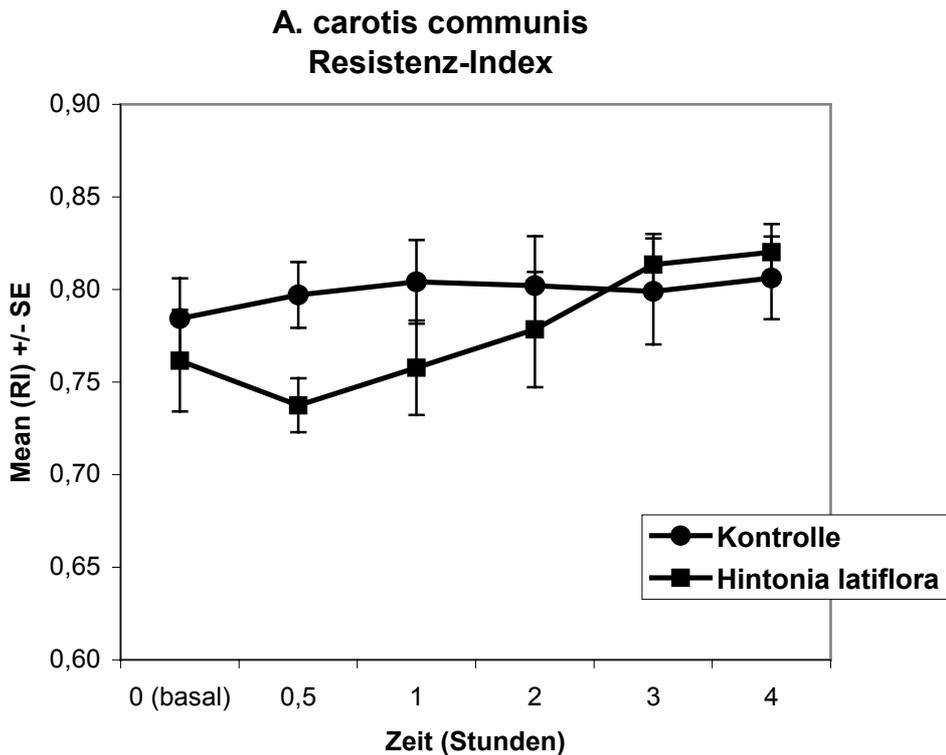


Abbildung 43: Resistenz-Index der *A. carotis communis* unter dem Einfluss von *Hintonia-latiflora*-Extrakt. Mean % = Mittelwert in %, SE = Standardfehler in %, n = jeweils 8

Tabelle 31: A. carotis communis Resistenz-Index (Zahlenwerte zur Abbildung 43)

| Hint. lat. | Absolut | Wilcoxon | Wilcoxon | Mann-W. | Mann-W. |
|------------|-----------------------------------|----------|----------------|----------|----------------|
| Messungen | MW \pm SE | p < 0,05 | p > 0,05 < 0,1 | p < 0,05 | p > 0,05 < 0,1 |
| Basalwert | 0,76 \pm 0,03 | | | | |
| M 0,5 h | 0,74 \pm 0,01 | - | - | + | - |
| M 1 h | 0,76 \pm 0,03 | - | - | - | - |
| M 2 h | 0,78 \pm 0,03 | - | - | - | - |
| M 3 h | 0,81 \pm 0,02 | + | - | - | - |
| M 4 h | 0,82 \pm 0,02 | - | + | - | - |

| Kontrolle | Absolut | Wilcoxon | Wilcoxon | Mann-W. | Mann-W. |
|-----------|-----------------------------------|----------|----------------|----------|----------------|
| Messungen | MW \pm SE | p < 0,05 | p > 0,05 < 0,1 | p < 0,05 | p > 0,05 < 0,1 |
| Basalwert | 0,78 \pm 0,02 | | | | |
| M 0,5 h | 0,80 \pm 0,02 | - | - | + | - |
| M 1 h | 0,80 \pm 0,02 | - | - | - | - |
| M 2 h | 0,80 \pm 0,03 | - | - | - | - |
| M 3 h | 0,80 \pm 0,03 | - | - | - | - |
| M 4 h | 0,81 \pm 0,02 | - | - | - | - |

MW = arithmetisches Mittel, SE = Standardfehler, Wilcoxon = statistischer Test für die Veränderungen innerhalb einer Wirkungskurve bezogen auf die Relativ-Werte, Mann-Whitney-Test = Unterschied zwischen Kontrolle und Hintonia latiflora, p < 0,05 = signifikant, p > 0,05 < 0,1 = tendenziell

Herzfrequenz

Eine Stunde nach Applikation der Testsubstanz zeigt die Hintonia-latiflora-Gruppe im Zeitvergleich innerhalb der Gruppe eine signifikante Minderung der Herzfrequenz von 100 % auf $87,76 \pm 4,19$ % (von $208,57 \pm 8,21$ Schlägen/min auf $180,80 \pm 4,74$ Schläge/min). Nach 2 Stunden steigt die Herzfrequenz wieder auf $91,30 \pm 5,30$ %. Anschließend sinkt die Herzfrequenz wieder ab und erreicht zum Zeitpunkt der Messung nach 3 Stunden $89,84 \pm 3,65$ % und nach 4 Stunden $87,68 \pm 4,23$ %. Die Werte nach 1, 3 und 4 Stunden unterscheiden sich im Zeitvergleich innerhalb der Gruppe signifikant vom Ausgangswert. Auch in der Kontroll-Gruppe kommt es zunächst zu einem signifikanten Absinken von 100 % auf $87,56 \pm 4,63$ % (von $213,00 \pm 10,75$ Schläge/min auf $183,29 \pm 4,00$ Schläge/min) der Herzfrequenz im Messzeitraum von einer halben Stunde. Bei der Messung nach 2 Stunden weist die Herzfrequenz ebenfalls eine signifikante Abnahme im Zeitvergleich innerhalb der Gruppe auf $88,91 \pm 3,70$ % auf. Danach steigt die Herzfrequenz der Kontroll-Gruppe jedoch stetig an und liegt am Ende der Messungen nach 4 Stunden bei einem Wert von $93,50 \pm 5,09$ % des Ausgangswertes. Im Gruppenvergleich unterscheiden sich die beiden Gruppen in keinem der Werte signifikant.

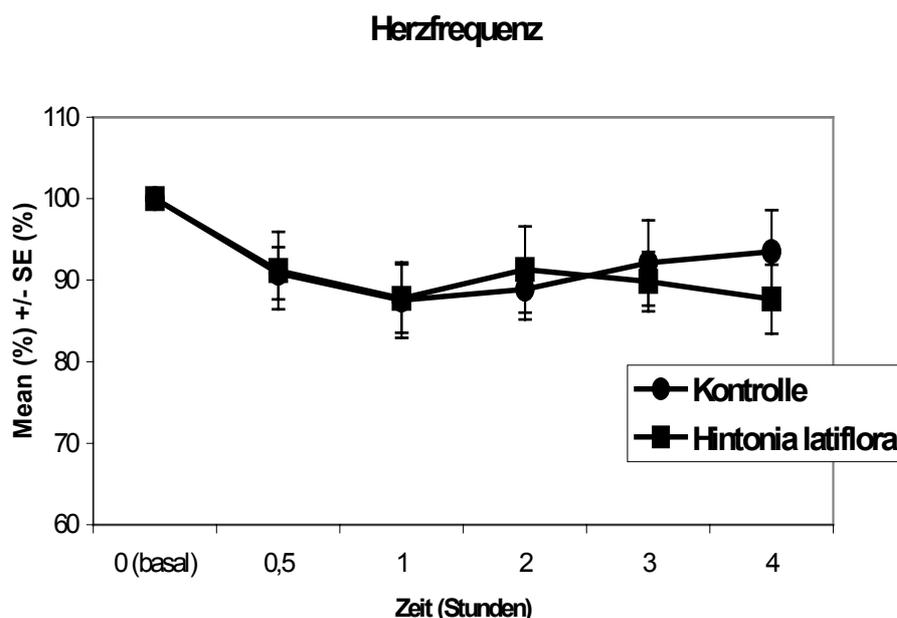


Abbildung 44: Herzfrequenz am wachen Kaninchen unter dem Einfluss von Hintonia-latiflora-Extrakt. Mean % = Mittelwert in %, SE = Standardfehler in %, n = jeweils 7

Tabelle 32: Herzfrequenz (Schläge/min) (Zahlenwerte zur Abbildung 44)

| Hint. lat. | Absolut (Schläge/min) | Relativ | Wilcoxon(rel) | Wilcoxon(rel) | Mann-W. (rel) | Mann-W. (rel) |
|------------|-----------------------|---------------------|---------------|----------------|---------------|----------------|
| Messungen | MW + SE | MW(%) + SE(%) | p < 0,05 | p > 0,05 < 0,1 | p < 0,05 | p > 0,05 < 0,1 |
| Basalwert | 208,57 ± 8,21 | 100,00 ± 0 | | | | |
| M 0,5 h | 187,63 ± 5,64 | 91,19 ± 4,73 | - | - | - | - |
| M 1 h | 180,80 ± 4,74 | 87,76 ± 4,19 | + | - | - | - |
| M 2 h | 187,89 ± 7,05 | 91,30 ± 5,30 | - | - | - | - |
| M 3 h | 185,23 ± 3,08 | 89,84 ± 3,65 | + | - | - | - |
| M 4 h | 181,19 ± 7,01 | 87,68 ± 4,23 | + | - | - | - |

| Kontrolle | Absolut (Schläge/min) | Relativ(%) | Wilcoxon | Wilcoxon | Mann-W. (rel) | Mann-W. (rel) |
|-----------|-----------------------|---------------------|----------|----------------|---------------|----------------|
| Messungen | MW + SE | MW + SE | p < 0,05 | p > 0,05 < 0,1 | p < 0,05 | p > 0,05 < 0,1 |
| Basalwert | 213,00 ± 10,75 | 100,00 ± 0 | | | | |
| M 0,5 h | 191,51 ± 6,66 | 90,85 ± 3,22 | + | - | - | - |
| M 1 h | 183,29 ± 4,00 | 87,56 ± 4,63 | - | + | - | - |
| M 2 h | 186,97 ± 4,84 | 88,91 ± 3,70 | + | - | - | - |
| M 3 h | 192,83 ± 5,39 | 92,12 ± 5,24 | - | - | - | - |
| M 4 h | 199,07 ± 5,93 | 93,50 ± 5,09 | - | - | - | - |

MW = arithmetisches Mittel, SE = Standardfehler in % bzw. Schläge/min, Wilcoxon = statistischer Test für die Veränderungen innerhalb einer Wirkungskurve bezogen auf die Relativ-Werte, Mann-Whitney-Test = Unterschied zwischen Kontrolle und Hintonia latiflora, p < 0,05 = signifikant, p > 0,05 < 0,1 = tendenziell

Mittlerer arterieller Blutdruck (MAP)

Nach Gabe von *Hintonia latiflora* bleibt der Blutdruck während der ersten 30 Minuten zunächst konstant und sinkt anschließend, nach 2 Stunden, von 100 % auf ein Minimum von $89,23 \pm 7,65$ % bzw. von $83,14 \pm 3,00$ mmHg auf $74,10 \pm 7,12$ mmHg ab. Diese Abnahme ist im Zeitvergleich innerhalb der Gruppe nicht signifikant. Darauf erfolgt ein Wiederanstieg nach 3 Stunden auf $101,46 \pm 4,91$ % und nach 4 Stunden auf $107,68 \pm 3,11$ %.

In der Kontroll-Gruppe kommt es ebenfalls zu einem Abfallen des Blutdruckes. Nach einer Stunde zeigt sich eine Verminderung von 100 % auf $92,44 \pm 3,76$ % (von $90,33 \pm 4,33$ mmHg auf $77,06 \pm 7,16$ mmHg) und nach 2 Stunden auf $87,48 \pm 8,78$ % des Ausgangswertes. Daraufhin steigt der Blutdruck wie in der *Hintonia-latiflora*-Gruppe wieder an und bleibt nach 4 Stunden bei $98,20 \pm 3,40$ % des Ausgangswertes. Im Gruppenvergleich weisen die Messungen keine signifikanten Unterschiede auf.

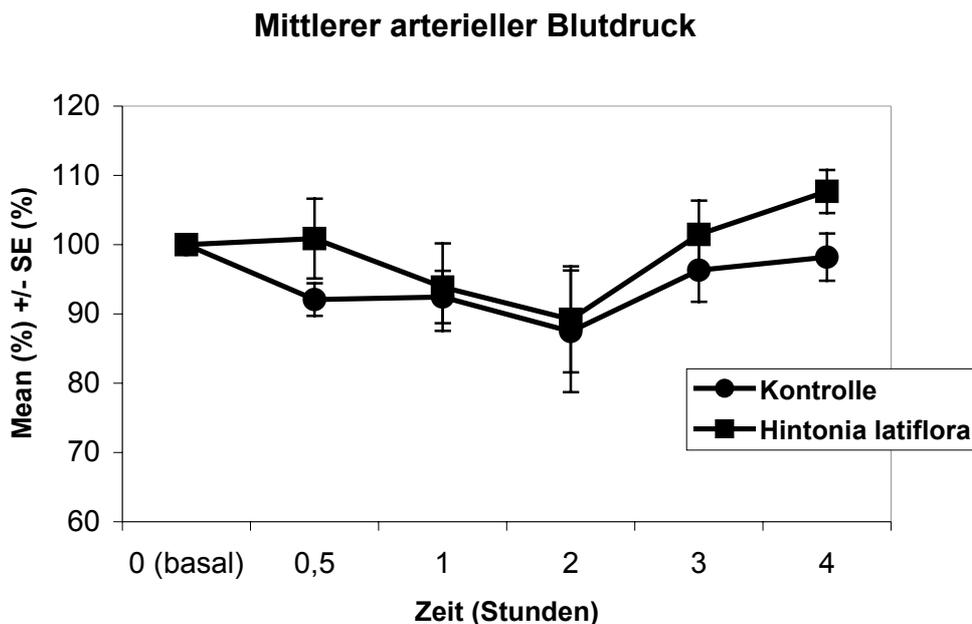


Abbildung 45: Mittlerer arterieller Blutdruck am wachen Kaninchen unter dem Einfluss von *Hintonia-latiflora*-Extrakt. Mean % = Mittelwert in %, SE = Standardfehler in %, n = jeweils 8

EIGENE UNTERSUCHUNGEN

Tabelle 33: Mittlerer arterieller Blutdruck (mmHg) (Zahlenwerte zur Abbildung 45)

| Hint. lat. | Absolut(mmHg) | Relativ(%) | Wilcoxon(rel) | Wilcoxon(rel) | Mann-W. (rel) | Mann-W. (rel) |
|------------|------------------------------------|-------------------------------------|---------------|----------------|---------------|----------------|
| Messungen | MW \pm SE | MW \pm SE | p < 0,05 | p > 0,05 < 0,1 | p < 0,05 | p > 0,05 < 0,1 |
| Basalwert | 83,14 \pm 3,00 | 100,00 \pm 0 | | | | |
| M 0,5 h | 83,53 \pm 5,05 | 100,87 \pm 5,77 | - | - | - | - |
| M 1 h | 77,48 \pm 4,94 | 93,85 \pm 6,31 | - | - | - | - |
| M 2 h | 74,10 \pm 7,12 | 89,23 \pm 7,65 | - | + | - | - |
| M 3 h | 83,48 \pm 2,60 | 101,46 \pm 4,91 | - | - | - | - |
| M 4 h | 88,41 \pm 3,40 | 107,68 \pm 3,11 | - | + | - | + |

| Kontrolle | Absolut(mmHg) | Relativ(%) | Wilcoxon(rel) | Wilcoxon(rel) | Mann-W. (rel) | Mann-W. (rel) |
|-----------|------------------------------------|------------------------------------|---------------|----------------|---------------|----------------|
| Messungen | MW \pm SE | MW \pm SE | p < 0,05 | p > 0,05 < 0,1 | p < 0,05 | p > 0,05 < 0,1 |
| Basalwert | 90,33 \pm 4,33 | 100,00 \pm 0 | | | | |
| M 0,5 h | 82,56 \pm 3,00 | 92,06 \pm 2,35 | - | - | - | - |
| M 1 h | 82,65 \pm 3,04 | 92,44 \pm 3,76 | - | + | - | - |
| M 2 h | 77,06 \pm 7,16 | 87,48 \pm 8,78 | - | + | - | - |
| M 3 h | 85,76 \pm 2,37 | 96,29 \pm 4,53 | - | - | - | - |
| M 4 h | 88,27 \pm 4,66 | 98,20 \pm 3,40 | - | - | - | + |

MW = arithmetisches Mittel, SE = Standardfehler in % bzw. mmHg, Wilcoxon = statistischer Test für die Veränderungen innerhalb einer Wirkungskurve bezogen auf die Relativ-Werte, Mann-Whitney-Test = Unterschied zwischen Kontrolle und *Hintonia latiflora*, p < 0,05 = signifikant, p > 0,05 < 0,1 = tendenziell

Blutzucker

Der Blutzucker wird durch die Gabe von *Hintonia latiflora* (200 mg/kg KG) gesenkt. Bereits nach einer halben Stunde fällt der Blutzucker in der *Hintonia-latiflora*-Gruppe signifikant von 100 % auf $93,26 \pm 2,21$ % (von $100,50 \pm 3,55$ mg/dl auf $93,56 \pm 3,30$ mg/dl) und bleibt auch nach 1 Stunde signifikant auf $93,10 \pm 2,40$ % des Ausgangswertes. Der niedrigste Wert wird nach 2 Stunden mit $89,13 \pm 2,33$ % erreicht. Anschließend erfolgt ein Wiederanstieg des Blutzuckerwertes in der *Hintonia-latiflora*-Gruppe, ohne den Ausgangswert erneut zu erreichen. Die Messzeitpunkte nach einer halben Stunde, nach 1 und 2 Stunden zeigen sich signifikant unterschiedlich im Zeitvergleich innerhalb der Gruppe. Unter Kontrollbedingungen kommt es nur zu geringfügigen Schwankungen des Blutzuckerwertes (zwischen $94,38 \pm 3,27$ mg/dl und $89,94 \pm 2,42$ mg/dl). Nach einer halben Stunde sinkt der Blutzuckerwert von 100 % auf $97,79 \pm 2,56$ %, anschließend steigt er leicht auf $102,06 \pm 2,62$ % an. Nach 3 Stunden erreicht er den niedrigsten Wert mit $96,05 \pm 2,42$ % und nach 4 Stunden liegt er wieder bei $101,13 \pm 1,60$ %. Im Zeitvergleich innerhalb der Gruppe ist keiner der Werte signifikant. Die Unterschiede zwischen *Hintonia-latiflora*-Gruppe und Kontroll-Gruppe sind nach 1 und 2 Stunden im Gruppenvergleich signifikant.

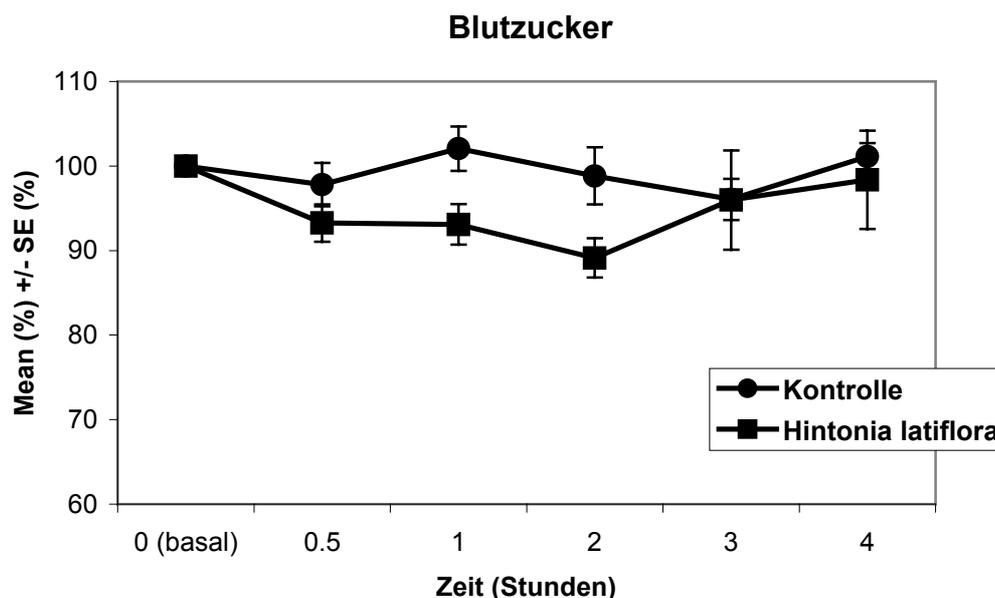


Abbildung 46: Blutzucker am wachen Kaninchen unter dem Einfluss von Hintonia-latiflora-Extrakt. Mean % = Mittelwert in %, SE = Standardfehler in %. n = jeweils 8

Tabelle 34: Blutzucker (mg/dl) (Zahlenwerte zur Abbildung 46)

| Hint. lat. | Absolut(mg/dl) | Relativ(%) | Wilcoxon(rel) | Wilcoxon(rel) | Mann-W. (rel) | Mann-W. (rel) |
|-------------------|----------------------|---------------------|---------------|---------------|---------------|---------------|
| Messungen | MW + SE | MW + SE | p< 0,05 | p>0,05<0,1 | p< 0,05 | p>0,05<0,1 |
| Basalwert | 100,50 + 3,55 | 100,00 + 0 | | | | |
| M 0,5 h | 93,56 + 3,30 | 93,26 + 2,21 | + | - | - | - |
| M 1 h | 93,38 + 3,27 | 93,10 + 2,40 | + | - | + | - |
| M 2 h | 89,14 + 1,86 | 89,13 + 2,33 | + | - | + | - |
| M 3 h | 95,75 + 4,79 | 95,98 + 5,88 | - | - | - | - |
| M 4 h | 98,19 + 5,19 | 98,35 + 5,82 | - | - | - | - |

| Kontrolle | Absolut(mg/dl) | Relativ(%) | Wilcoxon(rel) | Wilcoxon(rel) | Mann-W. (rel) | Mann-W. (rel) |
|------------------|---------------------|----------------------|---------------|---------------|---------------|---------------|
| Messungen | MW + SE | MW + SE | p< 0,05 | p>0,05<0,1 | p< 0,05 | p>0,05<0,1 |
| Basalwert | 94,38 + 3,27 | 100,00 + 0 | | | | |
| M 0,5 h | 89,44 + 3,77 | 97,79 + 2,56 | - | - | - | - |
| M 1 h | 92,75 + 3,20 | 102,06 + 2,62 | - | - | + | - |
| M 2 h | 89,94 + 2,42 | 98,84 + 3,37 | - | - | + | - |
| M 3 h | 90,63 + 2,72 | 96,05 + 2,42 | - | - | - | - |
| M 4 h | 94,19 + 3,46 | 101,13 + 1,60 | - | - | - | - |

MW = arithmetisches Mittel, SE = Standardfehler in % bzw. mg/dl, Wilcoxon = statistischer Test für die Veränderungen innerhalb einer Wirkungskurve bezogen auf die Relativ-Werte, Mann-Whitney-Test = Unterschied zwischen Kontrolle und Hintonia latiflora, p<0,05 = signifikant, p>0,05<0,1 = tendenziell

4 DISKUSSION

In früheren Zeiten wurde bei der Therapie des Diabetes mellitus das Hauptaugenmerk auf die Absenkung erhöhter Blutzuckerwerte gelegt, um akut lebensbedrohliche Zustände wie das Coma diabeticum zu verhindern oder zu behandeln. Diese akuten Komplikationen spielen durch die verbesserte Überwachung und Therapie heute nur noch eine untergeordnete Rolle. Mit zunehmender Lebenserwartung der Diabetiker rückten aber mehr und mehr die Spätfolgen in das Blickfeld der Therapeuten. Hier sind insbesondere Retinopathie, Nephropathie und Polyneuropathie als Ausdruck der Mikroangiopathie sowie koronare Herzerkrankungen und periphere Durchblutungsstörungen als Folge einer Makroangiopathie zu erwähnen (STEHOUWER et al. 1997, PUTTEMANS und NEMRY 1998, CALLES-ESCANDON und CIPOLLA 2001, TSILIBARY 2003). Dabei sind besonders die makroangiopathischen Veränderungen sehr schwer zu verhindern (COLWELL 1997). Durch ein sehr häufiges Monitoring und eine sehr genaue Einstellung der Blutzuckerwerte mit Hilfe der intensivierten Therapie gelang es in letzter Zeit auch diese Komplikationen zurückzudrängen (EDIC 1999, LUDVIGSSON und HANAS 2003, WOJCICKI und LADYZYNSKI 2003, RIZVI 2004). Trotzdem ist die Situation nicht optimal. Ein Großteil der Diabetiker muss bei längerer Dauer der Erkrankung nach wie vor mit solchen Spätfolgen rechnen. Diese beeinträchtigen die Lebensqualität der Patienten erheblich und können zu Frühmortalität führen. Spätkomplikationen treten besonders bei Typ 2 Diabetikern auf, die meist mit oralen Antidiabetika behandelt werden, wobei eine so präzise Einstellung wie mit der intensivierten Insulintherapie häufig nicht erreicht wird. In einer Langzeitstudie (University Group Diabetes Program = UGDP-study) zeigten die oralen Antidiabetika zwar eindrucksvolle Blutzuckersenkungen, die Auswirkungen auf die Sekundärerkrankungen waren aber enttäuschend (RIVELINE et al. 2003). Von daher besteht nach wie vor Bedarf nach einem möglichst oral verabreichbaren Medikament, mit dem nicht nur der Blutzucker gesenkt, sondern auch ein günstiger Effekt auf die Spätfolgen des Diabetes erreicht werden kann. Die Spätfolgen kommen in erster Linie durch Veränderungen der Gefäße mit der Folge von verminderter Durchblutung und damit verschlechterter Versorgung verschiedener Gewebe zustande. Deshalb könnte ein Medikament vielversprechend sein, das zusätzlich zu seiner antidiabetischen Wirkung eine vasodilatierende Wirkung besitzt, mit der Folge einer verbesserten Durchblutung. Der Hintonia-latiflora-Extrakt, der seit über 50 Jahren als Sucontral® im Handel ist, zeigt erwiesenermaßen Blutzucker-senkende Wirkung (KAISER und GEYER 1955, PINTO et al. 1997, SLIJEPČEVIĆ und KRAUS 1997 und KOREC et al. 2000). In der vorliegenden Arbeit wird nun zum ersten Mal

gezeigt, dass der Extrakt zusätzlich einen Gefäß-erweiternden Effekt besitzt. Ein großer Vorteil dieses Pflanzenextraktes besteht darin, dass, im Gegensatz zu sehr vielen anderen Pflanzenextrakten, die Leitsubstanz bekannt und deshalb ein gezielter Einsatz mit einem standardisierten Extrakt möglich ist.

4.1 Diskussion der In-vitro-Versuchsmodelle

4.1.1 Kontraktionsmessungen an isolierten Aortenringen und am isolierten Papillarmuskel des Herzens

Entsprechend der Zielsetzung dieser Arbeit erlauben Kontraktionskraftmessungen am isolierten Aortenring und am Papillarmuskel des Meerschweinchenherzens die Charakterisierung der Wirkung von Pflanzenextrakten und –inhaltsstoffen auf die Gefäße und das Herz (DONGMO et al. 2004). Sie gestatten es, direkt die Wirkung auf die Funktion des Organs zu erfassen und Aussagen über den zugrunde liegenden Wirkungsmechanismus zu treffen. Die in dieser Arbeit eingesetzte Methode, mit deren Hilfe an isolierten Aortenringen geprüft werden kann, ob eine Substanz oder ein Extrakt eine Wirkung auf den Tonus der glatten Gefäßmuskulatur besitzt, basiert auf Untersuchungen von NELSON et al. (1984), NAKAKI et al. (1985), HAGIWARA et al. (1993) und MÜLLER (1997). Die Ringe können entweder durch Zusatz von Noradrenalin oder Erhöhung der extrazellulären Kalium-Konzentration zur Kontraktion gebracht werden. Bei unterschiedlicher Beeinflussung der Kontraktionen, je nach auslösendem Agens, sind bereits erste Schlüsse auf den Wirkungsmechanismus möglich.

Das Aortenmodell gilt als gut etabliertes Versuchsmodell, mit dem Versuche relativ einfach durchzuführen sind. Auch andere Autoren, die sich mit den Effekten von pharmakologisch wirkenden Substanzen, Pflanzeninhaltsstoffen und –extrakten beschäftigen, wenden diese Methode an (MAGOS et al. 1995, KIM et al. 1997, FORD und BROADLEY 1998, GUERRERO et al. 2004). In diesem Modell kann grundsätzlich beurteilt werden, ob eine Substanz oder ein Extrakt eine Wirkung auf den Tonus der glatten Gefäßmuskulatur besitzt. Die Aussagekraft von Untersuchungen an der Aorta ist allerdings beschränkt, weil hier nur der Tonus der glatten Muskulatur eines großen Gefäßes berücksichtigt wird. Ergänzende Informationen könnten Versuche mit Widerstandsgefäßen liefern. Zusätzlich sind noch andere Methoden (Ultraschall, Blutdruckmessung etc.) nötig, um Einflüsse auf die Kreislaufparameter und speziell auf die Gefäßweite bzw. die Durchblutung nachzuweisen.

Der Papillarmuskel eignet sich sehr gut für die Beurteilung der Wirkung eines Extraktes oder einer Substanz auf die Kontraktionskraft des Herzens (REITER 1966). Günstig an dieser Methode ist, dass es sich um einen isolierten Muskel handelt, der in einem definierten Milieu mit einer bestimmten Frequenz stimuliert werden kann. Damit bestehen Vorteile im Vergleich zur Kontraktionskraftmessung unter Verwendung des perfundierten Herzens nach Langendorff, bei dem die Kontraktionskraft auch indirekt durch Veränderungen der Spontanfrequenz des Sinusknotens und der koronaren Perfusion beeinflusst wird (REITER 1966, SENSCH 1995, MÜLLER 1997).

4.1.2 Fluoreszenzmikroskopische Calcium-Ionenbestimmung

Die fluoreszenzmikroskopische Messung der freien intrazellulären Calcium-Ionenkonzentration trägt dazu bei, einen Einblick in den Mechanismus der vasodilatativen Wirkung des *Hintonia-latiflora*-Extraktes und seiner Inhaltsstoffe zu bekommen. Der Calcium-sensitive Fluoreszenzfarbstoff Fura-2 wurde von GRYNKIEWICZ et al. synthetisiert und die Calcium-Messmethode von diesen Autoren 1985 publiziert. Seitdem hat sich diese Methode sehr gut etabliert (SIMPSON et al. 1990, RECHT et al. 2004). Sie ermöglicht einen Einblick in die Calcium-Veränderungen der einzelnen Zelle und lässt deshalb auch Rückschlüsse auf eine mögliche Beeinflussung der Calcium-Bewegungen zu. In der vorliegenden Arbeit konnten die Erkenntnisse aus den isometrischen Kraftmessungen an isolierten Aortenringen und den In-vivo-Ergebnissen mit Hilfe der fluoreszenzmikroskopischen Calcium-Ionenbestimmung erweitert werden.

Alternativ zur Methode mit Fura-2/AM gibt es die Calcium-Ionenbestimmung mit Aequorin, einem Calcium-sensitiven fluoreszierenden Photoprotein aus einer pazifischen Qualle (*Aequorea forskalea*) (FAGAN et al. 1993, VYSOTSKI et al. 2003). Diese Methode ist allerdings wesentlich aufwendiger und eher geeignet für die Untersuchung von sehr schnell ablaufenden Calcium-Konzentrationsänderungen wie z.B. an Nerven oder Herzmuskelzellen. Im Gegensatz dazu, erweist sich Fura-2 als ideal für Messungen am glatten Muskel. Die Bindungsfähigkeit von Fura-2 für Calcium ist ca. 10 mal höher als die von Aequorin und besser geeignet für Einzelzellmessung (KAMM und GRANGE 1996).

Die verwendeten A10-Zellen sind Aortenzellen aus der Aorta thoracica von embryonalen Ratten (KIMES und BRANDT 1976), die relativ einfach zu züchten sind und häufig für physiologische und biochemische Untersuchungen am glatten Muskel eingesetzt werden (MULDOON et al. 1989, RAATZ NELSON et al. 1997, ISHIBASHI et al. 1999, BHUGRA et al. 2003). Sie sind auch für Calcium-Messungen mit Fura-2 geeignet, da sie gut reprodu-

zierbare Ergebnisse liefern (MONCK et al. 1987, SIMPSON et al. 1990, RAATZ NELSON et al. 1997).

4.2 Aortenkontraktionsergebnisse

Die Effektivität des *Hintonia-latiflora*-Extraktes und seines Leitwirkstoffes Coutareagenin auf den Tonus der glatten Muskulatur der isolierten Aorta wurde unter zwei verschiedenen Bedingungen getestet. Kontraktionen wurden entweder durch Zufügen von Noradrenalin oder durch Erhöhung der extrazellulären Kalium-Konzentration ausgelöst. Durch die Verwendung von Noradrenalin und Kalium als Kontraktions-auslösende Agentien kann grob unterschieden werden, ob die muskelrelaxierende Wirkung eines Extraktes oder eines Wirkstoffes durch eine Blockade von Calcium-Kanälen der Zellmembran oder durch Hemmung der intrazellulären Calcium-Freisetzung oder über eine Verminderung der Calcium-Empfindlichkeit des Aktomyosin-Systems zustande kommt (KAMM und GRANGE 1996, MÜLLER 1997).

Durch Erhöhung der extrazellulären Kalium-Konzentration kommt es zu einer Depolarisation der Muskelzelle, wobei sich Membran-ständige, Spannungs-abhängige L-Typ-Calcium-Kanäle öffnen und deshalb vermehrt Calcium in die Zelle einströmt, das intrazelluläre Calcium ansteigt und eine Kontraktion ausgelöst wird. Bei Blockade dieser Calcium-Kanäle durch den Extrakt oder einen Wirkstoff (z.B. Nifedipin) nimmt der Calcium-Einstrom ab, das intrazelluläre Calcium sinkt und die Zelle relaxiert (CHEN und KWAN 2000).

Die Noradrenalin-induzierte Kontraktion wird über einen vergleichsweise wesentlich komplizierteren Weg in Gang gesetzt. Es erfolgt eine Bindung von Noradrenalin an den α_1 -Adrenozeptor. Dieser bewirkt über eine Koppelung an G-Protein eine Aktivierung der Phospholipase C. Dadurch kommt es zur Bildung von Inositoltriphosphat (IP_3), das an den IP_3 -Rezeptor des endoplasmatischen Retikulums bindet, das wiederum als intrazellulärer Calcium-Speicher fungiert. Der IP_3 -Rezeptor stellt gleichzeitig einen intrazellulären Calcium-Kanal dar, der nach der Bindung von IP_3 geöffnet wird, wodurch die intrazelluläre Calcium-Konzentration steigt (BERRIDGE und IRVINE 1984, SOMLYO 2000). Zusätzlich besteht die Möglichkeit, dass Noradrenalin über das aktivierte G-Protein auch ligandengesteuerte Calcium-Kanäle der Membran öffnet und es auch zu einem Einstrom von Calcium aus dem Extrazellulärraum kommt (BURT 2002). Das durch Calcium-Einstrom bzw. -Freisetzung erhöhte intrazelluläre Calcium führt zu einer vermehrten Bindung von Ca^{2+} an Calmodulin und dieser Komplex aktiviert dann die Myosin-Leichtketten-Kinase (MLCK). Diese wiederum phosphoryliert die

DISKUSSION

regulatorische Leichtkette (RLC) des Aktomyosinsystems, die dann über eine Myosin-ATPase die Kontraktion auslöst (KAMM und GRANGE 1996, BOLZ et al. 2003).

Eine stärkere Hemmung einer Noradrenalin-induzierten Kontraktion spricht dafür, dass die Substanz im Verlauf der Adrenozeptor-G-Protein-IP₃-Kaskade wirkt, also z.B. die IP₃-abhängige Calcium-Freisetzung aus dem endoplasmatischen Retikulum hemmt. Wenn sowohl die Noradrenalin- als auch die Kalium-induzierte Kontraktion etwa gleich stark beeinflusst werden, kann auch eine Verminderung der Calcium-Sensitivität des kontraktiven Systems eine entscheidende Rolle für die Muskelrelaxation spielen. Die Calcium-Sensitivität des Systems kann über verschiedene Wege vermindert werden und dadurch eine Relaxation herbeigeführt werden (PFITZER 2001). Einerseits kann die MLCK phosphoryliert und dadurch die Calcium-Sensitivität vermindert werden, andererseits besteht die Möglichkeit der Minderung der Calcium-Sensitivität durch Steigerung der Aktivität der Myosin-Leichtketten-Phosphorylase (MLCP). Dadurch wird die RLC wieder dephosphoryliert und der Muskel erschlafft, obwohl es zu keiner entsprechenden Senkung der intrazellulären Calcium-Konzentration kommt (KAMM und GRANGE 1996).

Der unterschiedliche Einfluss von Substanzen auf Noradrenalin- oder Kalium-induzierte Kontraktionen wurde auch von anderen Autoren zur Beurteilung der Wirkungsmechanismen von Substanzen genutzt (MAGOS et al. 1995, KIM et al. 1997, MÜLLER 1997, FORD und BROADLEY 1998, CHEN und KWAN 2000).

Die Ergebnisse mit dem *Hintonia latiflora*-Extrakt zeigen, dass der Extrakt eine wesentlich stärkere Wirkung (Relaxation um 99 % bei 60 µg/ml) auf die Noradrenalin-vorkontrahierten Muskeln hat als auf die durch Kalium-vorkontrahierten (Relaxation um 19 % bei 300 µg/ml). Damit kann weitgehend ausgeschlossen werden, dass der Extrakt über eine Verminderung der Calcium-Sensitivität des Aktomyosinsystems relaxierend wirkt, da dieser Mechanismus gleichermaßen die Kalium- wie die Noradrenalin-Wirkung beeinflussen müsste. Aufgrund der wesentlich stärkeren Hemmung der Noradrenalin- im Vergleich zur Kalium-induzierten Kontraktion kann gefolgert werden, dass die Wirkung des *Hintonia latiflora*-Extraktes nicht primär durch eine Blockade von membranären Calcium-Kanälen verursacht wird. Vielmehr kommt eine Hemmung im Bereich der Phosphatidylinositol-Kaskade und damit eine Hemmung der Freisetzung von Calcium aus dem endoplasmatischen Retikulum als Ursache für die relaxierende Wirkung in Frage.

Coutareagenin, die Leitsubstanz des *Hintonia latiflora*-Extraktes wirkt ebenfalls stärker auf die Noradrenalin-induzierte als auf die Kalium-induzierte Kontraktion, erzielt aber auch unter Kalium einen deutlichen relaxierenden Effekt, der aber erst bei sehr hohen Konzentrationen

auftritt. Dies bedeutet, dass auch die Leitsubstanz, ähnlich wie der Extrakt, primär über eine Hemmung der Phosphatidylinositol-Kaskade wirkt.

Es besteht Grund zur Annahme, dass neben Coutareagenin auch noch andere Substanzen des *Hintonia-latiflora*-Extraktes an der Wirkung beteiligt sind. Diese Vermutung wird durch die Tatsache bestätigt, dass der Extrakt im Vergleich zur Reinsubstanz Coutareagenin eine relativ starke Wirkung zeigt, obwohl er nur 12 % Coutareagenin enthält. Die maximale Relaxation wird beispielsweise sowohl unter Coutareagenin als auch unter dem *Hintonia-latiflora*-Extrakt bei einer Konzentration von 60 µg/ml erreicht. Diese 60 µg *Hintonia-latiflora*-Extrakt enthalten aber nur 7,2 µg Coutareagenin. Vergleicht man den EC₅₀-Wert des Extraktes (51,98 µg/ml) mit dem des Inhaltsstoffes Coutareagenin (32,55 µg/ml), findet man, dass die Reinsubstanz nur eine etwa doppelt so starke Wirkung wie der Extrakt besitzt. Wäre Coutareagenin der einzige Wirkstoff des Extraktes, würde man bei 12 % Coutareagenin-Gehalt des Extraktes aber eine 8-fach stärkere Wirkung der Reinsubstanz Coutareagenin erwarten. Dies bestätigt die Annahme, dass im Extrakt noch andere Substanzen synergistisch zu Coutareagenin wirken. Aus der Analyse des Extraktes geht auch entsprechend hervor, dass dieser neben Coutareagenin noch andere Neoflavonoide und zusätzlich noch viele weitere Substanzen enthält. Diese können fördernd oder hemmend zur Wirkung des Extraktes beitragen.

4.3 Ergebnisse der Papillarmuskelkontraktionen

Gegen eine Calcium-Kanal-blockierende Wirkung des *Hintonia-latiflora*-Extraktes spricht auch das Ergebnis der Papillarmuskelkontraktionen. Am Herzen konnte kein negativ inotroper Effekt des *Hintonia-latiflora*-Extraktes beobachtet werden. Im Gegensatz dazu, besitzen Calcium-Kanal-Blocker wie z.B. Verapamil oder Nifedipin, die wie der Extrakt vasodilatierend wirken, am Herzen eine negativ inotrope Wirkung (BAYER et al. 1977). Vergleicht man die Konzentrations-Wirkungskurve für *Hintonia latiflora* mit der Kontrollkurve ohne Extrakt, zeigt sich, dass die übliche Zeit-abhängige Kraftabnahme (durch „Ermüdung“) unter Einwirkung des Extraktes geringer ausfällt. Dies kann sogar für einen leichten positiv inotropen Effekt am Herzmuskel sprechen, der mit einer Calcium-Kanal-blockierenden Wirkung unvereinbar ist.

4.4 Ergebnisse der fluoreszenzmikroskopischen Calcium-Ionenbestimmung

Um zu überprüfen, ob die Wirkung des *Hintonia-latiflora*-Extraktes bzw. der Leitsubstanz am glatten Muskel tatsächlich über eine Beeinflussung des intrazellulären Calciums zustande kommt wurde fluoreszenzmikroskopisch die Veränderung der intrazellulären Calcium-Konzentration durch Coutareagenin bestimmt. In den Untersuchungen wurde Vasopressin verwendet, weil damit sehr gut an gezüchteten, glattmuskulären A10-Zellen Calcium-Transienten (vorübergehende Anstiege des intrazellulären Calciums) ausgelöst werden können (SIMPSON et al. 1990). Vasopressin ist ein Peptid-Hormon mit vasokonstringierenden Eigenschaften aus dem Hinterlappen der Hypophyse, das ähnlich wie Noradrenalin seine Wirkung über G-Protein-gekoppelte Rezeptoren entfaltet. Trotz unterschiedlicher Rezeptoren bewirkt auch diese Substanz eine Calcium-Freisetzung über die Phosphatidylinositol-Kaskade (CAMELO et al. 1988, TAKATA et al. 1990, FUJIHARA et al. 1993, BAUER und PAREKH 2003, LÜLLMANN et al. 2004).

Die fluoreszenzmikroskopischen Calcium-Messungen zeigen eindeutig, dass der *Hintonia-latiflora*-Extrakt eine Verminderung des Calcium-Transienten bewirkt, der durch Vasopressin ausgelöst wurde. Die durch Vasopressin erzielte maximale Calcium-Konzentration während des Transienten wird nach Einwirken des Extraktes stark reduziert (um 72 %). Dies zeigt deutlich, dass die Wirkung des Extraktes über eine Beeinflussung des intrazellulären Calciums abläuft und nicht über eine Minderung der Calcium-Sensitivität des kontraktiven Systems. Im Falle einer Beeinflussung der Calcium-Sensitivität sollte der Calcium-Transient durch Coutareagenin nicht verändert werden. Aufgrund der Tatsache, dass Vasopressin über die Phosphatidylinositol-Kaskade wirkt, ist sehr wahrscheinlich, dass die Minderung des Calcium-Transienten unter Coutareagenin durch Hemmung der intrazellulären Calcium-Freisetzung zustande kommt. Auch andere Studien arbeiten mit der Verminderung des durch Vasopressin-induzierten Transienten durch Testsubstanzen (KAPLAN und DI SALVIO 1996) Weitere Versuche sind nötig, um den genauen Angriffspunkt des Extraktes bzw. von Coutareagenin ausfindig zu machen.

Die Versuche mit Vasopressin zeigen auch, dass die Wirkung des Extraktes bzw. von Coutareagenin nicht spezifisch gegen die Wirkung von Noradrenalin gerichtet ist, sondern dass verschiedene vasokonstringierende Agentien, die über G-Protein-gekoppelte Rezeptoren wirken, beeinflusst werden. Zusätzlich ergibt sich aus den Ergebnissen der Calcium-Messungen an einzelnen Zellen die klare Schlussfolgerung, dass der Extrakt seine Wirkung unabhängig vom Endothel bzw. Faktoren des Endothels wie Stickstoffmonoxid (NO) zeigt.

In vielen anderen Studien wie z. B. von VINET et al. (1991), KIM et al. (2000), SHIN und MORGAN (2003), KWON et al. (2003), wird vermutet, dass eine Vasodilatation über die Bildung von NO oder anderen Faktoren des Endothels verursacht wird.

4.5 Diskussion des In-vivo-Versuchsmodells

Wirkungen des *Hintonia latiflora* auf den lokalen Blutfluss und die Gefäßweite wurden mit Ultraschall bzw. im Doppler-Verfahren an der Aorta abdominalis und der A. carotis communis bestimmt. Aus den bisherigen Untersuchungen, die sich mit der Blutzucker-senkenden Wirkung von *Hintonia latiflora* beim Versuchstier beschäftigten (KAISER und GEYER 1955, SLIJEPČEVIĆ und KRAUS 1997, KOREC et al. 2000), geht hervor, dass die Wirkung des Extraktes verzögert einsetzt und relativ lange anhält. Da anzunehmen war, dass auch die Wirkung auf die Gefäße in einem ähnlichen Zeitraum abläuft, wurde ein Beobachtungszeitraum von etwa 5 Stunden festgelegt. Obwohl, wegen optimaler Ruhigstellung der Tiere, die Durchführung der Messung unter Narkose einfacher gewesen wäre, wurde wegen des langen Zeitraums auf eine Dauernarkose verzichtet und nur eine Kurznarkose für die Applikation des Extraktes bzw. des Lösungsmittels durchgeführt. Der Verzicht auf die Langzeitnarkose war notwendig, um Narkose-induzierte Veränderungen der kardiovaskulären Parameter und der Stoffwechsellage (z.B. des Blutzuckers) zu vermeiden (HENKE et al. 1996, BOLLERHEY 2005). Die Messungen wurden deshalb im Wachzustand der Tiere durchgeführt.

Der Nachteil dieses Verfahrens besteht aber darin, dass die Kaninchen in wachem Zustand vermehrt auf Reize der Umgebung (Geräusche, Temperatur, Untersuchung) reagieren und dadurch Stress-induzierte Änderungen der gemessenen Parameter bei der Interpretation der Ergebnisse mit einbezogen werden müssen.

Für die Versuche wurden weiße Neuseeländer Kaninchen verwendet, da sich diese Tiere aufgrund ihrer Größe für die Ultraschall-Messungen gut eignen. Auch dulden sie, nach einer kurzen Gewöhnungsphase, die notwendigen Manipulationen, so dass eine ruhige und Stress-arme Versuchsdurchführung möglich wird, was bei Wach-Messungen von großer Bedeutung ist (DROLET et al. 2004).

Die Auswahl der geeigneten Blutgefäße für die Ultraschall-Messungen wurde von der Zugänglichkeit der Gefäße mit der Ultraschallsonde bestimmt. Zusätzlich musste die Gefäßlage so sein, dass auch am wachen Tier immer wieder die gleiche Position eingestellt werden konnte, um vergleichbare Ergebnisse zu erzielen.

Durch Kombination der In-vivo-Methode mit der In-vitro-Methode kann die Auswirkung des Einflusses auf den Tonus der glatten Muskulatur auf die Gefäßweite und Blutflussgeschwindigkeit am lebenden Tier beurteilt werden. Auch DROLET et al. (2004) kombinierten Versuche an isolierten Aortenringen mit sonographischen Untersuchungen der Aorta abdominalis an allerdings narkotisierten Kaninchen.

Eine zusätzliche Darstellung von peripheren Gefäßen wäre für die Beurteilung der Hintonia-latiflora-Wirkung sehr wünschenswert gewesen, war aber am wachen Kaninchen in dieser Form nicht möglich. Die Erfassung plethysmographischer Parameter hätte möglicherweise zusätzliche Informationen zur Beurteilung der peripheren Durchblutung erbringen können. Das Anlegen der Mess-Sonde zur Registrierung der plethysmographischen Kurve wurde aber im Wachzustand von den Tieren nicht geduldet.

Als weitere diagnostische Möglichkeiten bietet der Ultraschall die Bestimmung der Wandstärke von Arterien wie z.B. der A. carotis communis (METCALF et al. 2000, BENEDETTO et al. 2001, O'LEARY und POLAK 2002, CHEN et al. 2004). Dieses Verfahren hat aber nur in Langzeitstudien einen Sinn. Damit kann z.B. die Wirksamkeit einer Therapiemaßnahme für die Verhinderung von Diabetes-induzierten Gefäßveränderungen validiert, bzw die arteriosklerotischen Veränderungen besser eingeschätzt werden (O'LEARY und POLAK 2002).

Die Ergebnisse der invasiven Messung des mittleren arteriellen Blutdruckes über einen Verweilkatheter am Ohr, wie sie auch in der vorliegenden Studie durchgeführt wurden, erweisen sich als gut übereinstimmend mit dem Aortendruck (WESSLAU et al. 1984). Am wachen Kaninchen können allerdings Stress-auslösende Faktoren zu einem schwankenden Gefäßtonus der Ohrarterie führen. Um diesen Effekt zu vermeiden, muss der Verweilkatheter möglichst proximal an der Ohrbasis liegen (TALSETH et al. 1981).

Zusätzlich zu den Kreislaufparametern wurde der Blutzucker gemessen, um zu überprüfen, ob unter den eigenen Versuchsbedingungen auch eine Blutzucker-senkende Wirkung des Hintonia-latiflora-Extraktes nachzuweisen ist, wie sie bereits von KAISER und GEYER (1955), SLIJEPČEVIĆ und KRAUS (1997) und KOREC et al. (2000) beobachtet wurden.

4.6 Ergebnisse der Gefäßsonographie

4.6.1 Gefäßsonographie an Aorta abdominalis und A. carotis communis

Ultraschalluntersuchungen werden noch nicht routinemäßig, aber immer häufiger in der Diabetes-, bzw. in der Arteriosklerosediagnostik eingesetzt (PUTTEMANS und NEMRY 1998). Die Ultraschalluntersuchung an der Aorta abdominalis zeigt in der Hintonia-latiflora-Gruppe sowohl im Vergleich mit der Kontroll-Gruppe als auch im Vergleich innerhalb der Gruppe eine halbe Stunde nach Applikation der Substanz eine signifikante Gefäßerweiterung von 100 % auf 105 %, die tendenziell nach 3 und 4 Stunden größer wird (107 %). Im Gegensatz dazu kommt es in der Kontroll-Gruppe zu einer leichten Abnahme des Gefäßdurchmessers (auf 96 %), wobei im weiteren Verlauf der Ausgangswert während der gesamten Versuchsdauer in dieser Gruppe nicht mehr erreicht wird.

Die maximale systolische Blutflussgeschwindigkeit (MSB) steigt in der Hintonia-latiflora-Gruppe zunächst innerhalb von 30 Minuten leicht an und sinkt nach 3 und 4 Stunden tendenziell ab (auf 93 % des Ausgangswertes). In der Kontroll-Gruppe kommt es dagegen zu einem stetigen Anstieg der Blutflussgeschwindigkeit innerhalb von 2 Stunden auf Werte von 114 % des Ausgangswertes, was mit der Abnahme des Gefäßdurchmessers korreliert. Nach 4 Stunden liegt die Blutflussgeschwindigkeit bei 106 %.

Da besonders die Makroangiopathien bei Diabetikern schwer zu beeinflussen sind (UKPDS 1998, CAMERON et al. 2003), könnte dieses Ergebnis als sehr positiv bewertet werden, weil die Gefäßerweiterung möglicherweise einer Makroangiopathie vorbeugen bzw. entgegenwirken könnte. Entsprechend der Ergebnisse der maximalen systolischen Blutflussgeschwindigkeit, der enddiastolischen Blutflussgeschwindigkeit und in Korrelation zur Zunahme des Gefäßdurchmessers zeigt der Resistenz-Index (RI) der Aorta abdominalis eine Stunde nach Applikation eine leichte, nach 3 und 4 Stunden eine deutlichere Abnahme in der Hintonia-latiflora-Gruppe. Im Vergleich dazu zeigt sich in der Kontroll-Gruppe bei einem Messzeitpunkt von einer halben Stunde und bei 3 Stunden jeweils ein leichter Anstieg des RI. 4 Stunden nach Applikation kommt es jedoch zu einem deutlichen Abfall des RI. Die Abnahme des RI in der Hintonia-latiflora-Gruppe deutet auf eine tendenzielle Verminderung der Gefäßspannung und des peripheren Widerstandes hin.

Diese Ergebnisse müssen aber aufgrund der hohen Anfälligkeit auf Stress-induzierte Artefakte vorsichtig interpretiert werden. Dennoch unterstreichen diese in vivo erhobenen Ergebnisse den in vitro gefundenen vasodilatierenden Effekt des Hintonia-latiflora-Extraktes.

Auch in der A. carotis communis kann eine tendenzielle Gefäßerweiterung nachgewiesen werden. Der Gefäßdurchmesser der A. carotis communis der Hintonia-latiflora-Gruppe vergrößert sich bei der Messung nach einer halben Stunde auf ca. 103 %, verengt sich vorübergehend leicht und zeigt in der Messung nach 4 Stunden wieder eine Erweiterung auf ca.

103 %. In der Kontroll-Gruppe verengt sich das Gefäßlumen auf ca. 98 % und nach 4 Stunden auf ca. 97 %. Der Unterschied zwischen den beiden Gruppen ist nicht so deutlich wie bei den Messungen an der Aorta abdominalis, aber die vasodilatierende Tendenz von Hintonia latiflora ist auch an der A. carotis communis deutlich zu erkennen. Die maximale systolische Blutflussgeschwindigkeit (MSB) der A. carotis communis fällt entsprechend der Zunahme des Gefäßdurchmessers bei der Hintonia-latiflora-Gruppe anfangs stark ab (auf ca. 82 %) und steigt anschließend wieder leicht an (auf ca. 89 %). Einen deutlich unterschiedlichen Verlauf zeigt die Kontroll-Gruppe, bei der die MSB anfangs ebenfalls sinkt (auf ca. 90 %), aber im weiteren Versuchsverlauf auf ca. 111 % ansteigt.

Der RI der A. carotis communis sinkt eine halbe Stunde nach Applikation in der Hintonia-latiflora-Gruppe, steigt aber, besonders nach 3 und 4 Stunden deutlich an. Es kommt vorübergehend zu einer verminderten Gefäßspannung und Abnahme des peripheren Widerstandes und anschließend erfolgt möglicherweise eine Gegenregulation der Gefäße. Auch diese Ergebnisse müssen aufgrund der hohen Anfälligkeit auf Stress-induzierte Artefakte vorsichtig interpretiert werden.

Die Ergebnisse der Gefäßsonographie bestätigen die In-vitro-Ergebnisse. Sie zeigen dass eine einmalige orale Verabreichung des Hintonia-latiflora-Extraktes einen vasodilatierenden Effekt mit entsprechender Änderung der Blutflussgeschwindigkeit besitzt, der mit Hilfe der Gefäßsonographie zum Teil signifikant ausfällt, zum Teil nur als Tendenz bestätigt werden kann.

4.6.2 Herz-Kreislauf-Parameter

4.6.2.1 Herzfrequenz

Um die Wirkung des Hintonia-latiflora-Extraktes auf das Herz-Kreislauf-System zu erfassen, wurden Messungen der Herzfrequenz und des Blutdrucks durchgeführt.

Die Herzfrequenz veränderte sich unter Hintonia latiflora ähnlich wie unter Kontrollbedingungen, nur am Ende des Beobachtungszeitraums ergab sich ein gewisser Unterschied. In beiden Gruppen kam es zunächst zu einer Verminderung der Frequenz. Dabei ergab sich in der Hintonia-latiflora-Gruppe eine im Zeitvergleich innerhalb der Gruppe signifikante Senkung der Herzfrequenz vom Ausgangswert (100 %) auf ca. 88 % nach einer Stunde und auf

ca. 90 % nach 3 Stunden nach Applikation. In der Kontroll-Gruppe sank die Herzfrequenz ebenfalls signifikant im Zeitvergleich innerhalb der Gruppe und zwar nach einer halben Stunde auf ca. 88 % des Ausgangswertes. Bei der Messung nach 4 Stunden blieb der Wert in der *Hintonia-latiflora*-Gruppe signifikant auf 88 % des Ausgangswertes erniedrigt, während er in der Kontroll-Gruppe wieder etwas anstieg (auf 94 %). Bei den Messungen der Herzfrequenz muss eine Handling-induzierte Variabilität der Werte mitberücksichtigt werden, da dieser Parameter bei wachen Tieren durch Umwelteinflüsse auf die Tiere verändert werden kann. Anhand der Ergebnisse der Herzfrequenz-Messungen kann deutlich gemacht werden, dass es nach Gabe von *Hintonia-latiflora*-Extrakt trotz der vasodilatierenden Wirkung zu keinem Anstieg der Herzfrequenz kommt. Im Gegenteil bleiben die Werte der *Hintonia-latiflora*-Gruppe am Ende des Messzeitraums tendenziell sogar unterhalb der Werte der Kontrolltiere. Das Ausbleiben einer positiv chronotropen Wirkung unter dem Einfluss des Extraktes könnte besonders bei länger dauernder Anwendung ein Vorteil gegenüber anderen vasodilatierenden Substanzen (z.B. Amrinon oder Nifedipin) sein, weil dadurch ein frequenzbedingter Anstieg des Sauerstoffverbrauchs des Herzens verhindert wird (SHINKE et al. 1999, LÜLLMANN et al. 2004).

4.6.2.2 Mittlerer arterieller Blutdruck

Der mittlere arterielle Blutdruck gibt zusätzlich zur Herzfrequenz Auskunft über den Einfluss von *Hintonia latiflora* auf das Herz-Kreislaufsystem. In beiden Gruppen sinkt der Blutdruck innerhalb der ersten 2 Stunden nach Applikation ab (in der *Hintonia-latiflora*-Gruppe vom Ausgangswert 100 % auf 89 % und in der Kontroll-Gruppe von 100 % auf 87 %. Im Anschluss daran kommt es in beiden Gruppen zu einem Wiederanstieg, der in der *Hintonia-latiflora*-Gruppe stärker ausfällt (Anstieg auf 107 % nach 4 Stunden) als in der Kontroll-Gruppe (Anstieg auf 98 %). Im Gruppenvergleich ergibt sich kein signifikanter Unterschied.

Bei der Interpretation dieser Ergebnisse zeigt sich unter Einbeziehung der Ergebnisse der Herzfrequenz, dass der Blutdruck in der *Hintonia-latiflora*-Gruppe ähnlich wie in der Kontroll-Gruppe möglicherweise als Folge der Herzfrequenz-Minderung zunächst etwas absinkt, dann aber wieder ansteigt. Die (nicht signifikante) etwas stärkere Zunahme des Blutdrucks im Vergleich zur Kontroll-Gruppe bei niedriger Herzfrequenz am Ende des Beobachtungszeitraums kann evtl. durch Gegenregulationsmechanismen im Endstromgebiet bei nachlassender vasodilatierender Wirkung erklärt werden. Ein solcher Effekt geht möglicherweise auch aus der Zunahme des Resistenz-Index der A. carotis hervor. Weitergehende Versuche mit

wiederholter Gabe von *Hintonia-latiflora*-Extrakt sind notwendig, um die Veränderungen dieser Herz-Kreislaufparameter bei länger dauernder Anwendung zu beurteilen.

4.6.3 Blutzucker

Zur Überprüfung, ob auch unter den hier gewählten Versuchsbedingungen eine Blutzucker-senkende Wirkung nachgewiesen werden kann, wurde zusätzlich zu der sonographischen Untersuchung der Gefäße auch der Blutzucker gemessen. In der *Hintonia-latiflora*-Gruppe kommt es zu einer deutlichen Senkung der Blutzuckerwerte innerhalb der ersten 2 Stunden (signifikante Senkung auf 89 % nach 2 Stunden). Nach 3 Stunden lässt die Wirkung nach und nach 4 Stunden nähern sich die Werte (98 %) wieder knapp dem Basalwert an. In der Kontroll-Gruppe kommt es zu leichten, nicht signifikanten Zu- und Abnahmen der Blutglucose-Konzentration, die wahrscheinlich die physiologischen Blutglucoseschwankungen von gesunden, wachen Kaninchen widerspiegeln. Bei der Beurteilung der Ergebnisse ist zu berücksichtigen, dass es sich bei den Tieren um gesunde Kaninchen handelt, bei denen kein Diabetes erzeugt wurde. Deshalb muss bei der *Hintonia-latiflora*-Gruppe auch davon ausgegangen werden, dass es bei der Senkung der Blutglucose physiologischerweise über Ausschüttung von Catecholaminen zur Gegenregulation kommt, so dass die Blutzuckerwerte nicht extrem absinken. Bei zwei Tieren der *Hintonia-latiflora*-Gruppe konnte bei der Messung nach 3 bzw. 4 Stunden ein plötzlicher Anstieg des Blutzuckers festgestellt werden. Als Ursache für diese Abweichung kommen evtl. Stress- oder Hypoglycämie-bedingte Gegenregulation in Frage. Der vermehrte Stress kann zur Ausschüttung von Catecholaminen und Glucocorticoiden und damit zur Erhöhung der Glucose im Blut geführt haben (JACKSON et al. 2004, URESIN et al. 2004). Diese abweichenden Ergebnisse wurden trotzdem in die statistische Auswertung mit einbezogen.

4.7 Schlussfolgerung und Ausblick

Diabetes mellitus betrifft als Zivilisationskrankheit immer mehr Menschen. In den nächsten Jahren werden weiterhin steigende Patientenzahlen erwartet. Die Amerikanische Diabetes Association erwartet in einer Schätzung weltweit 221 Millionen Diabetiker für das Jahr 2010 (PEPPA et al. 2003). Da bei diesen Patienten Gefäßerkrankungen und kardiovaskuläre Erkrankungen die häufigste Belastung bzw. Todesursache darstellen, ist es notwendig zusätzlich zu einer möglichst exakten Blutzuckereinstellung mit Insulin bzw. oralen Antidiabetika Therapiemöglichkeiten zu finden, die vor allem die Sekundärerkrankungen vermindern.

Besonders Typ 2 Diabetes Patienten müssen vor allem ihre Lebensgewohnheiten radikal verändern. Neben einer entsprechenden Änderung der Ernährung ist eine Reduktion des Körpergewichts von entscheidender Bedeutung. Übergewicht und die damit verbundenen pathologischen Begleiterscheinungen steigern das Risiko für kardiovaskuläre Schäden enorm (KASSAB et al. 2003). Zusätzlich zur Änderung der Lebensgewohnheiten und der Therapie mit Insulin bzw. oralen Antidiabetika können noch andere medikamentöse Maßnahmen (wie z. B. die Verabreichung von Sucontral®) ergriffen werden (LENNEKE et al. 2004).

In dieser Arbeit wird ausführlich der Einfluss des *Hintonia-latiflora*-Extraktes auf den Tonus der glatten Gefäßmuskulatur und die Hämodynamik geprüft. Die Ergebnisse in den verschiedenen In-vitro- und In-vivo-Untersuchungen zeigen alle einen mehr oder weniger stark ausgeprägten vasodilatierenden Effekt des Extraktes. Dementsprechend wurde bei Messungen an isolierten Aortenringen eine relaxierende Wirkung gefunden. Mit dieser Versuchsanordnung ließ sich des Weiteren nachweisen, dass der *Hintonia-latiflora*-Extrakt im Vergleich zu der Reinsubstanz Coutareagenin eine relativ starke Wirkung entfaltet. Daraus ergibt sich die Schlussfolgerung, dass noch andere Bestandteile des Extraktes an der Wirkung beteiligt sind. Da mit verschiedenen vasokonstringierenden Substanzen wie Noradrenalin und Kalium gearbeitet wurde, sind Rückschlüsse auf den Wirkungsmechanismus möglich. Weitere Informationen erbrachten die fluoreszenzmikroskopischen Calcium-Messungen an einzelnen Aortenzellen. Hier wurde zusätzlich als Substanz Vasopressin verwendet, das über eine Erhöhung der intrazellulären Calcium-Konzentration ebenfalls eine gefäßverengende Wirkung besitzt (SIMPSON et al. 1990, RAATZ NELSON et al. 1997).

Auch in den In-vivo Experimenten, in Form sonographischer Untersuchungen der Aorta abdominalis und der A. carotis communis, konnte der vasodilatierende Effekt des *Hintonia-latiflora*-Extraktes am wachen, gesunden Kaninchen nachgewiesen werden. Gleichzeitig bestätigten die Versuche am Kaninchen, dass der Extrakt auch am nicht diabetischen Tier eine Blutzucker-senkende Wirkung entfaltet.

Diese umfassenden Untersuchungen geben zusammen ein sehr deutliches Bild von der Wirkung des *Hintonia-latiflora*-Extraktes.

Auf Grund der Tatsache, dass der *Hintonia-latiflora*-Extrakt sowohl blutzuckersenkend wie auch vasodilatierend wirkt, kann eine Behandlung mit diesem Extrakt als zusätzliche Therapiemöglichkeit bei Diabetes mellitus angesehen werden. In erster Linie kommt die Anwendung bei Typ 2 Diabetes in Frage. In orientierenden Untersuchungen (nicht gezeigt) wurde festgestellt, dass orale Antidiabetika vom Sulfonylharnstoff-Typ, die für die Therapie des Typ 2 Diabetes eingesetzt werden, keine Gefäß-erweiternde Wirkung besitzen. Auch in einer Studie von PFISTER et al. (2003) konnte gezeigt werden, dass das orale Antidiabetikum Glibenclamid keinen relaxierenden Effekt auf Phenylephrin-vorkontrahierte glatte Gefäßmuskulatur hatte. LEIBOWITZ und CERASI finden 1996 zwar einen blutzuckersenkenden Effekt der Sulfonylharnstoffe, aber gleichzeitig eine nicht eindeutige Wirkung auf das Myocard. Deshalb scheint es sinnvoll, *Hintonia latiflora* als Adjuvans zu diesen oralen Antidiabetika einzusetzen. Möglicherweise könnten durch diese Kombination Sekundärerkrankungen verhindert bzw. deren Progression verzögert werden.

In weiterführenden Studien sollte versucht werden, den Mechanismus der vasodilatierenden Wirkung von *Hintonia latiflora* näher aufzuklären. Zusätzlich wäre interessant, ob die Blutzucker-senkende und die vasodilatierende Wirkung auf einen gemeinsamen Mechanismus zurückgeführt werden können. Die Auswirkungen einer länger dauernden Behandlung auf die Spätschäden sollten in klinischen Langzeitstudien überprüft werden. Zur Zeit läuft bereits eine derartige Studie von KOREC und KORECOVA (2002), deren Ergebnisse abzuwarten sind. In früheren Studien mit Patienten konnte eine Verbesserung des Allgemeinbefindens (z. B. Abnahme von Müdigkeit, Leistungsschwäche, Juckreiz; siehe z.B. SCHMIDT (1951), KUHR (1953), RITZMANN (1950) nach Gabe des *Hintonia-latiflora*-Extraktes festgestellt werden. Möglicherweise kann für diese Verbesserungen ebenfalls der vasodilatierende Effekt des Extraktes verantwortlich gemacht werden. Die Sekundärerkrankungen des Diabetes mellitus beruhen größtenteils auf einer Schädigung der Gefäße und der daraus resultierenden Minderversorgung verschiedener Gewebe. Durch Erweiterung verengter Gefäße könnte eine bessere Durchblutung dieser Gewebe erreicht und damit die Spätschäden gemildert oder sogar verhindert werden.

5 ZUSAMMENFASSUNG

In dieser Arbeit wird zum ersten Mal nachgewiesen, dass ein Extrakt aus *Hintonia latiflora*, der unter dem Namen Sucontral® als Phytoantidiabetikum Anwendung findet, neben seiner Blutzucker-senkenden Wirkung auch einen vasodilatierenden Effekt besitzt und deshalb möglicherweise Diabetes-assoziierte Gefäßveränderungen günstig beeinflusst.

Diese Gefäß-erweiternde Wirkung wird sowohl *in vitro* an der isolierten Aorta von Meerschweinchen als auch *in vivo* am wachen Kaninchen gezeigt.

An isolierten Aortenringen können Noradrenalin-induzierte (also G-Protein-vermittelte) Kontraktionen durch den *Hintonia-latiflora*-Extrakt nahezu vollständig relaxiert werden (Relaxation um ca. 99 % bei einer Konzentration von 60 µg/ml). Die EC₅₀ liegt bei 51,98 µg/ml. Kontraktionen, die dagegen durch Erhöhung der extrazellulären Kalium-Konzentration erzeugt werden, reagieren wesentlich schwächer auf die Zugabe des Extraktes. Selbst bei der hohen Konzentration von 300 µg/ml kommt es nur zu einer geringen Relaxation von ca.

19 %. Die Kalium-induzierte Kontraktion wird in erster Linie durch eine Kalium-induzierte Depolarisation, eine Aktivierung der membranären Calcium-Kanäle und einen daraus resultierenden erhöhten Calcium-Einstrom in die Zelle ausgelöst. Aufgrund dieser Ergebnisse kommt als Wirkungsmechanismus für die Gefäßrelaxation nicht eine Calcium-Kanal-Blockade, sondern primär eine Hemmung des G-Protein-vermittelten intrazellulären Calcium-Anstiegs in Frage.

Auch ein Inhaltsstoff des Extraktes, das Neoflavonoid Coutareagenin, das hauptsächlich für die Blutzucker-senkende Wirkung des Extraktes verantwortlich gemacht wird, zeigt die vasodilatierende Wirkung (Relaxation bei Noradrenalin-induzierter Kontraktion um ca. 94 % bei einer Konzentration von 60 µg/ml) im *In-vitro*-Testsystem. Der vermutete Wirkmechanismus wird durch fluoreszenzmikroskopische Versuche an gezüchteten Aortenzellen der Ratte mit dem Calcium-Indikator Fura-2 bestätigt. In diesen Versuchen wird Vasopressin verwendet, das ebenfalls über G-Proteine auf die Zelle wirkt. Der dadurch ausgelöste Calcium-Transient wird durch Coutareagenin (60 µg/ml) stark reduziert (um ca. 72 %), was für eine Hemmung des G-Protein-vermittelten intrazellulären Calcium-Anstiegs spricht.

Auch das Ergebnis, dass *Hintonia latiflora* keinen wesentlichen negativen Einfluss auf die Kontraktionskraft des isolierten Herzmuskels zeigt, spricht gegen eine Beeinflussung von Spannungs-abhängigen Calcium-Kanälen und stützt die G-Protein-Hypothese.

Im *In-vivo*-Teil der Studie werden Untersuchungen an wachen Kaninchen durchgeführt, wobei eine *Hintonia-latiflora*-Gruppe und eine Kontroll-Gruppe (n=8) erstellt wird. Nach Bestimmung der Basalwerte erfolgt die einmalige orale Applikation des *Hintonia-latiflora*-Ex-

ZUSAMMENFASSUNG

traktes bzw. die Gabe der Kontrollsubstanz (Lösungsvermittler Macrogol 300®). Sowohl an der Aorta abdominalis wie auch an der A. carotis communis kann sonographisch eine Zunahme des Gefäßdurchmessers bei gleichzeitiger Abnahme der Blutflussgeschwindigkeit unter dem Einfluss des Extraktes nachgewiesen werden. Zusätzlich kann auch eine signifikante Blutzucker-senkende Wirkung in der *Hintonia-latiflora*-Gruppe gezeigt werden. Eine einmalige Applikation ruft also am gesunden und wachen Tier sowohl eine Blutzuckersenkung als auch eine tendenzielle Vasodilatation hervor. Diese Ergebnisse sind bemerkenswert, da in bisherigen Studien meist davon ausgegangen wurde, dass die Effekte des Extraktes erst bei länger dauernder wiederholter Anwendung sichtbar werden. Der gezeigte vasodilatierenden Effekt könnte möglicherweise nützlich sein, um Spätschäden des Diabetes mellitus wie Mikro- und Makroangiopathien zu mindern. Aus diesem Grund könnte es sinnvoll sein, den *Hintonia-latiflora*-Extrakt besonders bei Typ 2 Diabetikern einzusetzen, um Antidiabetika vom Sulfonylharnstoff-Typ einzusparen und gleichzeitig im Hinblick auf Mikro- und Makroangiopathien durch Vasodilatation günstige hämodynamische Bedingungen zu schaffen.

6 SUMMARY

The vasodilating effect of an antidiabetic acting *Hintonia latiflora* extract.

In this study, it is shown for the first time, that an extract from *Hintonia latiflora* which has been used for a long time as phytoantidiabeticum called Sucontral®, is not only able to decrease blood glucose concentration, but also has a vasodilating effect. Therefore it might have a positive influence on diabetes-associated dysfunction of blood vessels.

The vasodilating effect is demonstrated in vitro in isolated aortic rings of guinea pigs as well as in vivo in awake rabbits. The isolated aortic rings which were precontracted with noradrenaline (G-protein mediated) are nearly completely relaxed by *Hintonia latiflora* extract (relaxation by 99 % at a concentration of 60 µg/ml). The EC₅₀ is 51,98 µg/ml.

The influence of the extract on contractions induced by increasing the extracellular potassium concentration is weaker. Even concentrations of 300 µg/ml extract, only result in a mild relaxation by 19 %. The potassium-induced contraction mainly takes place because of an increased influx of calcium via membrane calcium channels as a result of potassium-induced depolarisation.

These findings give way to the conclusion that the vasodilating effect is primarily resulting in the inhibition of G protein-induced increase of intracellular calcium and not in a blockade of calcium channels.

Specifically one content of the extract, the neoflavonoid coumestrol, is mainly responsible for the decreasing effect of the extract on blood glucose and also produces a vasodilating effect (relaxation of noradrenaline-induced contraction by 94 % at a concentration of 60 µg/ml). The assumed mechanism can be confirmed by experiments in aortic rat cells using the calcium indicator fura-2. In these investigations the vasoconstrictive peptide vasopressin is used, which also has an influence via a G protein pathway on the cell. A calcium transient evoked by vasopressin is strongly suppressed by coumestrol (60 µg/ml; relaxation by about 72 %). These results again support the suggestion of inhibition of G protein-induced intracellular calcium increase. Also the fact that *Hintonia latiflora* causes no remarkable negative influence on the isolated papillary muscle argues against an effect on voltage-dependent calcium channels and supports the G protein hypothesis.

The in vivo part of the study contains investigations in awake rabbits. Ultrasound evaluations are performed with one group given the *Hintonia latiflora* extract and the other group given the control substance (n=8).

After determining the basal values, each group of rabbits receives one single oral application of *Hintonia latiflora* extract or control substance (Macrogol 300®). In the abdominal aorta as

SUMMARY

well as in the common carotid artery a dilatation of the vessels and at the same time a lowering of blood flow velocity under the influence of the extract could be demonstrated.

In addition a significant decrease of blood glucose concentration occurred in the *Hintonia latiflora* group. One single application of the extract is able to cause a decrease of blood glucose concentration and a tendency to vasodilation in healthy, awake rabbits. These results are quite remarkable because in previous studies, it was assumed that the effect of *Hintonia latiflora* needs continuing and repeated applications to supply any effect.

The demonstrated vasodilating effect could possibly be useful in reducing late complications such as micro- and macroangiopathy in patients with diabetes mellitus. Therefore, *Hintonia latiflora* extract may be particularly useful in the treatment of type 2 diabetes, in order to reduce the dosage of sulfonylurea and at the same time to improve the hemodynamic conditions due to the vasodilating effect.

7 LITERATURVERZEICHNIS

ADELSTEIN RS, SELLERS JR (1996)

Myosin Structure and Function.

In: Bárány, M. (eds.): Biochemistry of smooth muscle contraction, Academic Press, Inc., San Diego, California: 3-20

ALLOT CP, BARRY CD, BRAMLEY J, JOHN NW, MELLOR PM, THOMSON DS, REILLY CF (1999)

Noninvasive 3-D ultrasound of atherosclerotic plaques in the Watanabe rabbit.

Ultrasound Med Biol 6, 905-914

AMMON HPT (1995)

Pharmakologie der Pankreashormone, Antidiabetika.

In: Estler CJ (Hrsg.): Pharmakologie und Toxikologie, 4. Auflg., Schattauer, Stuttgart: 435-448

APPELTON DJ, RAND JS, SUNVOLD GD (2001)

Insulin sensitivity decreases with obesity, and lean cats with low insulin sensitivity are at greatest risk of glucose intolerance with weight gain.

J Felin Med Surg 3, 211-228

ARODA VR, HENRY RR (2003)

Thiazolidinediones: Potential link between insulin resistance and cardiovascular disease.

Diabet Spectr 16, 120-125

AYO SH, RADNIK RA, GARONI JA, GLASS WF, KREISBERG JI (1990)

High glucose causes an increase in extracellular matrix proteins in cultured mesangial cells.

Am J Path 6, 1339-1348

BAILEY CJ (1992)

Biguanides and NIDDM.

Diabetes Care 15, 755-722

BÁRÁNY, K, BÁRÁNY, M (1996)

Myosin light chains.

In: Bárány, M., (eds.): Biochemistry of smooth muscle contraction, Academic Press, Inc., San Diego, California: 21-35

BARR F (1992)

Grundlagen des diagnostischen Ultraschalls.

In: Barr F (Hrsg): Ultraschalldiagnostik bei Hund und Katze, Gustav Fischer Verlag, Stuttgart: 16

BASTIEN M (1961)

Recherches sur les Copalchis, drogues hypoglycémiantes et en particulier sur le *Coutarea latiflora* D.C. (Rubiaceae)

Diss Pharm, Paris

BAUER J, PAREKH N (2003)

Variations in cell signaling pathways for different vasoconstrictor agonists in renal circulation of the rat.

Kidney Int 63, 2178-2186

BAYER R, RODENKIRCHEN R, KAUFMANN R, LEE JH, HENNEKES R (1977)

The effects of nifedipine on contraction and monophasic action potential of isolated cat myocardium.

NS Arch Pharmacol 301, 29-37

BELL SH (2003)

Heart failure.

Diabetes Care 26, 2433-2441

BENEDETTO AF, MALLAMACI F, TRIPEPI G, ZOCCALI C (2001)

Prognostic value of ultrasonic measurement of carotid intima media thickness in dialysis patients.

J Am Soc Nephrol 12, 2458-2464

BERRIDGE MJ, IRVINE RF (1984)

Inositol triphosphate, a novel second messenger in cellular signal transduction.

Nature 312, 315-321

BHUGRA P, XU Y-J, RATHI S, DHALLA NS (2003)

Modification of intracellular free calcium in cultured A10 vascular smooth muscle cells by exogenous phosphatic acid.

Biochem Pharmacol 65, 2091-2098

BOLLERHEY M (2005)

Sonographische Darstellung des Einflusses von drei verschiedenen Injektionsnarkosen auf die Vasoaktivität und Hämodynamik beim Kaninchen: Propofol versus Ketamin-Xylazin und Medetomidin-Midazolam-Fentanyl.

Diss Vet med, München

BOLLINGER A, PARTSCH H (2003)

Christian Doppler is 200 years young.

Vasa 32, 225-233

BOLTON TB, PRESTWICH SA, ZHOLOS AV, GORDIENKO DV (1999)

Excitation-concentration coupling in gastrointestinal and other smooth muscle.

Annu Rev Physiol 61, 85-115

BOLZ SS, VOGEL L, SOLLINGER D, DERWAND R, DE WIT C, LOIRAND G, POHL U (2003)

Nitric oxide-induced decrease in calcium sensitivity of resistance arteries is attributable to activation of the myosin light chain phosphatase and antagonized by RhoA/ Rho kinase.

Circulation 107, 3081-3087

BRIAN TD (2002)

Pathogenesis of feline diabetes mellitus.

Mol Cell Endocrin 197, 213-219

BROWNLEE M. (1992)

Glycation products and the pathogenesis of diabetic complications.

Diabetes Care 15, 1835-1843

BROZINICK JT, ROBERTS BR, DOHM GL (2003)

Defective signaling through Akt-2 and -3 but not Akt-1 in insulin-resistant human skeletal muscle.

Diabetes 52, 935-941

BURT RP (2003)

Phasic contractions of the rat portal vein depend on intracellular Ca²⁺ release stimulated by depolarization

Am J Physiol Heart Circ Physiol 284, 1808-1817

CALLES-ESCANDON J, CIPOLLA M (2001)

Diabetes and endothelial dysfunction: a clinical Perspective

Endocr Rev 22, 36-52

CAMERON N, COTTER M, INKSTER M, NANGLE M (2003)

Looking to the future: diabetic neuropathy and effects of rosuvastatin on neurovascular function in diabetes models.

Diabet Res Clin Pract 61, 35-39

CARAMELO C, TSAI P, SCHIER RW (1988)

Mechanism of cellular effect of phorbol ester on action of arginine vasopressin and angiotensin II on rat vascular smooth muscle cells in culture.

Biochem J 15, 625-629

CHEN CHX, KWAN CHY (2001)

Endothelium-independent vasorelaxation by leonurine, a plant alkaloid purified from chinese motherwort.

Life Sci 68, 953-960

CHEN X, TIAN H, LIU R (2004)

Association of serum apolipoprotein C III levels and apolipoprotein C III gene Sst I polymorphism with carotid intima-media thickness in Chinese type 2 diabetic patients.

Diabet Res Clin Pract 66, 41-47

CHIESA G, DI MARIO C, COLOMBO N, VIGNATI L, MARCHESI M, MONTEGGIA E, PAROLINI C, LORENZON P, LAUCELLO M, LORUSSO V, ADAMIAN M, FRANCESCHINI G, NEWTON R, SIRTORI CR (2001)

Development of lipid-rich, soft plaque in rabbits, monitored by histology and intravascular ultrasound.

Atherosclerosis 156, 277-287

CHRYSANTHUS CHUKWUMA, SR (1995)

Type II diabetic nephropathy in perspective.

J Diabet Complicat 9, 55-67

LITERATURVERZEICHNIS

CIULLA TA, AMADOR AG, ZINMAN B (2003)

Diabetic retinopathy and diabetic macular edema.

Diabetes Care 26, 2653-2664

CLOSE B, BANISTER K, BAUMANS V, BERNOTH E-M, BROMAGE N, BUNYAN J, ERHARDT W, FLECKENELL P, GREGORY N, HACKBARTH H, MORTON D, WARWICK C (1997)

Recommendation of euthanasia of experimental animals: Part 2.

Lab Anim 31, 2-32

COLWELL JA (1997)

Multifactorial aspects of the treatment of the type II diabetic patient.

Metabolism 46, 1-4

DAVIDSON M, PETERS AL (1997)

An overview of metformin in the treatment of type 2 diabetes mellitus.

Am J Med 102, 99-110

DI SALVIO J, RAATZ NELSON P (1998)

Stimulation of G-protein coupled receptors in vascular smooth muscle cells induces tyrosine kinase dependent increase in calcium without tyrosine phosphorylation of phospholipase C γ -1.

FEBS 422, 85-88

DONGMO A, KAMANYI MA, VIERLING W (2004)

Vasodilating properties of the stem bark extract of *Mitragyna ciliata* in rats and guinea pigs.

Phytother Res 18, 36-39

DROLET M-C, PLANTE E, BATTISTINI B, COUET J, ARSENAULT M (2004)

Early endothelial dysfunction in cholesterol-fed rabbits: A non-invasive in vivo ultrasound study.

Cardiovasc Ultrasound 2, 2-10

EDIC (EPIDEMIOLOGY OF DIABETES INTERVENTIONS AND COMPLICATIONS) (1999)

Design, implementations and preliminary results of a long-term follow-up of the diabetes control and complications trial cohort.

Diabetes Care 22, 99-111

EHRLEIN HJ (2000)

Glatte Muskulatur.

In: v. Engelhardt W, Breves G (Hrsg.): Physiologie der Haustiere, Enke Verlag, Stuttgart: 126-135

ENGLER RL, YELLON DM (1996)

Sulfonylurea K_{ATP} blockade in diabetes and preconditioning in cardiovascular disease.

Circulation 94, 2297-2301

EVANS DH, MCDICKEN WN (2000)

Signal detection and pre-processing: CW and PW Doppler.

In: Evans DH, McDicken WN (eds): Doppler Ultrasound Physics, Instrumentation and Signal Processing. 2. editionage Wiley, West Sussex, England: 97-107

FAGAN TF, OHMIYA Y, BLINKS JR, INOUE S, TSUJI FI (1993)

Cloning, expression and sequence analysis of cDNA for the Ca²⁺-binding photoprotein, mitrocomin.

FEBS 333, 301-305

FEHSKE W (1988)

Physikalisch technische Grundlagen.

In: Fehske W (Hrsg.): Praxis der konventionellen und farbkodierten Doppler-Echokardiographie, Huber Verlag, Bern: 13-41

FLECKENSTEIN A (1990)

Peter Harris award lecture. History and prospects in calcium antagonist research.

J Mol Cell Cardiol 22, 241-251

FLECKENSTEIN A, FLECKENSTEIN-GRÜN G (1988)

Mechanism of action of calcium antagonists in heart and vascular smooth muscle.

Eur Heart J 9, 95-99

FORD WR, BROADLEY KJ (1998)

Effects of adenosine receptor agonists on induction of contractions to phenylephrine of guinea-pig aorta mediated via intra-or extracellular calcium.

Gen Pharmacol 33, 143-150

FÖRSTERMANN U (2001)

Pharmakologie des kardiovaskulären Systems: Die Blutgefäße.

In: Forth W, Henschler D, Rummel W (Hrsg.): Allgemeine und spezielle Pharmakologie und Toxikologie, 8. Aufl., Urban & Fischer, München: 479-499

FOSTER DW (1998)

Diabetes mellitus

In: Fauci AS, Braunwald E, Isselbacher KJ, Wilson JD, Martin JB, Kasper DL, Hauser SL, Longo DL (eds.): Harrison's principles of internal medicine, 2. Aufl., McGraw-Hill, USA: 2060-2080

FRERCKS H-J, RENZ-POLSTER H (2001)

Diabetes mellitus

In: Braun J, Renz-Polster H (Hrsg.): Basislehrbuch Innere Medizin, 2. Aufl., Urban & Fischer, München: 770-811

FRITSCH R, GERWING M (1993)

Ultraschalldiagnostikverfahren.

In: Fritsch R, Gerwing M (Hrsg.): Sonographie bei Hund und Katze, Ferdinand Enke Verlag, Stuttgart: 7-8

FUJIHARA H, FUKUDA S, TANAKA T, KANAZAWA H, FUJIWARA N, SHIMOJI K (1993)

Arginine vasopressin increases perinuclear $[Ca^{2+}]$ in single cultured vascular smooth muscle cells of rat aorta.

J Vasc Res 30, 231-238

FURCHGOTT RF (1983)

Role of endothelium in responses of vascular smooth muscle.

Circ Res 53, 557-573

FURCHGOTT RF, ZAWADSKI JV (1980)

The obligatory role of endothelial cells in the relaxation of arterial smooth muscle by acetylcholine.

Nature 288, 373-376

GÄRTNER R, HAEN E (2001)

Endokrinopharmakologie.

In: Forth W, Henschler D, Rummel W, Förstermann U, Starke K (Hrsg.): Allgemeine Pharmakologie und Toxikologie, 8. Auflg., Urban & Fischer, München: 686-687

GEHRLICHER GmbH, Pharmazeutische Extrakte, (2003), Produktinformation, Eurasburg/Obb.

GEYER H (1955).

Beiträge zur Pharmakognosie, Chemie, und Pharmakologie der Rinde von *Coutarea latiflora* D.C. und zur Kenntnis der Copalchi-Rinden.

Diss Pharm, Tübingen

GILBERT-MCCLAIN LI, VERIN AD, SHI S, IRWIN RP, GARCIA GN (1998)

Regulation of endothelial cell myosin light chain phosphorylation and permeability by vanadate.

J Cell Biochem 70, 141-155

GRAY GA, WEBB DJ (1996)

The endothelin system and its potential as a therapeutic target in cardiovascular disease.

Pharmacol Ther 72, 109-148

GRIER CE, NAMBI A, CROOKE ST (1989)

Molecular mechanisms of homologous and heterologous desensitization mediated by vasopressin in smooth muscle cells.

J Biol Chem 264, 5384-5391

GRYNKIEWICZ G, POENIE M, TSIEN RY (1985)

A new generation of Ca^{2+} indicators with greatly improved fluorescence properties.

J Biol Chemistry 260, 3440-3450

GUERRERO MF, PUEBLA P, CARRÓN R, MARTIN ML, ROMÁN LS (2004)

Vasorelaxant effect of new neo-clerodane diterpenoids isolated from *Croton schiedeamus*.

J Ethnopharmacol 94, 185-189

HAGER'S HANDBUCH (1998)

In: Roth HJ, Schmid W, List PH, Hörhammer L (Hrsg.): Hager's Handbuch der Pharmazeutischen Praxis, Bd 3, Springer-Verlag, Berlin: 323-324

HAGIWARA S, MITSUI M, KARAKI H (1993)

Effects of felodipine, nifedipine and verapamil on cytosolic Ca^{2+} and contraction in vascular smooth muscle.

Eur J Pharmacol 234, 1-7

HANEFELD M (1996)

Diabetes mellitus und Dyslipoproteinämien.

In: Schwandt P, Richter O (Hrsg.): Handbuch der Fettstoffwechselstörungen, Schattauer, Stuttgart: 286-288

HANEFELD M, CAGATY M, PETROWITSCH T, NEUSER D, PETZINA D, RUPP M (2003)

Acarbose reduces the risk for myocardial infarction in type 2 diabetes patients: meta-analysis of seven long-term studies.

Europ Heart J 25, 10-16

HÄNSEL R (1991)

Phytopharmaka

In: Hänsel R (Hrsg.): Phytopharmaka: Grundlagen und Praxis, 2. Aufl., Springer Verlag, Berlin: 1-10

HARRIS HJ, EASTMAN RC, COWIE CC, FEGAL KM, EBERHARDT MS (1997)

Comparison of diabetes diagnostic categories in the U.S. population according to 1997 American Diabetes Association and 1980-1985 World Health Organization diagnostic criteria.

Diabetes Care 20, 1859-1862

HARTSHORNE DJ, GORECKA A (1980)

Biochemistry of contractile proteins of smooth muscle.

In: Bohr DF, Somlyo AP, Sparks HV (eds.): Handbook of physiology, 2. edition, Am. Physiol. Soc. Bethesda, Maryland: 135-161

HASSELBLATT A, PANTEN U (2001)

Glucosestoffwechsel: Insuline; oral wirksame, Blutzucker-senkende Arzneimittel.

In: Forth W, Henschler D, Rummel W, Förstermann U, Starke K (Hrsg.): Allgemeine und spezielle Pharmakologie und Toxikologie, 8. Aufl., Urban & Fischer, München 649-667

HENKE J, KOCH M, BRILL T, BOLKART B, JANCZEWSKI M, ERHARDT W (1996)

Isoflurane anesthesia in rabbits in a closed anesthetic system.

Tierärztl Prax 24, 604-609

HIMPENS B, MISSIAEN L, CASTEELS (1995)

Homeostasis in vascular muscle cells.

J Vasc Res 32, 207-219

HOENIG M (2002)

Comparative aspects of diabetes mellitus in dogs and cats.
Mol Cell Endocrin 197, 221-229

HOOKER CS, CALKINS PJ, FLEISCH JH (1977)

On the measurement of vascular and respiratory smooth muscle response in vitro.
Blood vessel 14, 1-11

HUGHES AD (1995)

Calcium channels in vascular smooth muscle cells.
J Vasc Res 35, 353-370

HUXLEY HE (2004)

Fifty years of muscle and the sliding filament hypothesis.
Eur J Biochem 271 1403-1415

ISHIBASHI T, YOSHIDA Y, SHOICHI I, NISHIO M (1999)

IP₃ production in A10 cells, an established aortic smooth muscle cultured cell line: effects of agonist administration procedure and culture conditions.
Gen Pharmacol 32, 115-121

JACKSON L, WILLIAMS FLR, BURCHELL A, COUGHTRIE MWH, HUME R (2004)

Plasma catecholamines and the counterregulatory response to hypoglycemia in infants.
J Clin Endocrin Metab 89, 6251-6256

JACKSON RA, HAWA MI, JASPAN JB, SIM BM (1987)

Mechanism of metformin action in non-insulin-dependent diabetes.
Diabetes 36, 632-640

JOHNSON JA, MAJUMDAR SR, SIMPSON SH, TOTTH EL (2002)

Decreased mortality associated with the use of metformin compared with sulfonylurea monotherapy in type 2 diabetes.
Diabetes Care 25, 2244-2248

JOOST H-G (2001)

Diabetes mellitus.

In: Lemmer B, Brune K (Hrsg.): Pharmakotherapie, 11. Aufl., Urban & Fischer, München: 362-366

JÖRGENS V, GRÜBER M (1996)

Strategien der Insulintherapie.

In: Jörgens V, Grüber M (Hrsg.): Diabetes in der Praxis, 3. Aufl., Deutscher Ärzte-Verlag, Köln: 33-38

KAISER H, GEYER H (1955)

Zur Pharmakologie der Rinde von *Coutarea latiflora* D.C.
Arch Pharm 288, 595-608

KAMM KE, GRANGE RW (1996)

Calcium sensitivity of contraction.

In: Bárány M (eds.): Biochemistry of smooth muscle contraction, Academic Press Inc., San Diego, California: 355-359

KAPLAN N, DI SALVIO J (1996)

Coupling between [arginine]-vasopressin-activated increase in protein tyrosine phosphorylation and cellular calcium in A7r5 aortic smooth muscle cells.

Arch Biochem Biophys 326, 271-280

KASSAB E, MCFARLANE SI, SOWERS JR (2001)

Vascular complications in diabetes and their prevention.

Vasc Med 6, 249-255

KERN TS, ENGERMAN RL (2001)

Pharmacological inhibition of diabetic retinopathy.

Diabetes 50, 1636-1642

KIM HS, ZHANG Y-H, OH K-W, AHN H-Y (1997)

Vasodilating and hypotensive effects of fangchinoline and tetrandrine on the rat aorta and the stroke-prone spontaneously hypertensive rat.

J Ethnopharmacol 58, 117-123

KIM SO, KANG KW, KIM KW, KIM ND (2000)

Procyanidins in crataegus extract evoke endothelium-dependent vasorelaxation in rat aorta.

Life Sci 67, 121-131

KIMES BW, BRANDT BL (1976)

Characterization of two putative smooth muscle cell lines from rat thoracic aorta.

Exp Cell Res 15, 349-366

KLIP A, LEITNER LA (1990)

Cellular mechanism of action of metformin.

Diabetes Care 13, 696-704

KOCH-WESER J (1963)

Effect of rate changes on strength and time course of contraction of papillary muscle.

Am J Physiol 204, 451-457

KOMAS N, LUGNIER C, STOCLET JC (1991)

Endothelium-dependent and independent relaxation of the rat aorta by cyclic nucleotide phosphodiesterase inhibitors.

Br J Pharmacol 104, 495-503

KOPP H, LUDWIG M (2001)

Dopplersonographie.

In: Kopp H, Ludwig M (Hrsg.): Checkliste Doppler- und Duplexsonographie, 2. Aufl., Thieme Verlag, Stuttgart: 8-14

KOREC R , KORECOVA M (2002)

Clinical trial to investigate the long term effect of Sucontral® on mild and moderate cases of diabetes mellitus (type II), esp. on mature-onset diabetes, intermediate report.

Diabetes Department, Trencin-Hospital, Trencin

KOREC R, SENSCH KH, ZOUKAS T (2000)

Effects of the neoflavonoid coumestrol, one of the antidiabetic active substances of *Hintonia latiflora*, on streptozotocin-induced diabetes mellitus in rats.

Arzneim Forsch 50, 122-128

KRAUS L, NOSTER S (1993)

Hintonia latiflora Rinde.

In: Hager's Handbuch der Pharmazeutischen Praxis, 5. Aufl., Bd 5, Springer-Verlag, Berlin: 443-447

KRENTZ AJ, FERNER RE, BAILEY CJ (1994)

Comparative tolerability profiles of oral antidiabetic agents.

Drug Saf 11, 223-241

KUHR R. (1953)

Orale Diabetestherapie mit einem Euphorbia-extrakt.

Landarzt 29, 1-8

KWON S, LEE WJ, FANG LH, KIM B, AHN HY (2003)

Mitogen-activated protein kinases partially endothelin-1-induced contractions through a myosin light chain phosphorylation-independent pathway.

J Vet Med Sci 65, 225-230

LAIGHT DW, CARRIER MJ, ÄNGÅRD EE (1999)

Endothelial cell dysfunction and the pathogenesis of diabetic macroangiopathy.

Diab Metabol Res Rev 15, 274-282

LANDA E (1913)

Anales del Instituto Medico Nacional

An Inst Mex Nac Mexiko 12, 146-158

LEBOWITZ HE, DOLE JF, PATWARDHAN R, RAPPAPORT EB, FREED MI (2001)

Rosiglitazone monotherapy is effective in patients with type 2 diabetes

J Endocrinol Metabol 86, 280-288

LEIBOWITZ G, CERASI E (1996)

Sulphonylurea treatment of NIDDM patients with cardiovascular disease.

Diabetologia 39, 503-514

LENNECKE K (2003)

Diabetes mellitus Typ II.

In: Lennecke K, Lengeling S, Hagel K, Grasmäder K, Liekweg A (Hrsg.): Therapieprofile, Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft mbH, Stuttgart 148-151

- LIEBICH H-G (1999)
Kreislaufsystem.
In: Liebich H-G (Hrsg.): Funktionelle Histologie der Haussäugetiere, 3. Auflg., Schattauer, Stuttgart: 121-122
- LODISH H, BALTIMORE D, BERK A, ZIPURSKY SL, MARTSUDAIRA P, DARNELL J (1995)
Light microscopy and cell structure.
In: Lodish H, Baltimore D, Berk A, Zipursky SL, Matsudaira P, Darnell J (eds.): Molecular Cell Biology, 3. edition, Scientific American Books, New York: 153-155
- LÖFFLER G, PETRIDES PE (1998)
Endokrine Gewebe II: Die schnelle Stoffwechselregulation.
In: Löffler G, Petrides PE (Hrsg.): Biochemie und Pathobiochemie, 6. Auflg., Springer-Verlag Berlin, 791-796
- LUDVIGSSON J, HANAS R (2003)
Coninuous subcutaneous glucose monitoring improved metabolic control in pediatric patients with type 1 diabetes: a controlled crossover study.
Pediatrics 111, 933-938
- LÜLLMANN H, MOHR P (1999)
Endokrine Drüsen.
In: Lüllmann H, Mohr P (Hrsg.): Pharmakologie und Toxikologie, 14. Auflg., Thieme Verlag, Stuttgart: 380 -385
- LUTZ H (1989)
Gerätetechnik.
In: Lutz H (Hrsg.): Ultraschallfibel Innere Medizin, 2. Auflg., Springer Verlag, Berlin: 9
- MAGOS GA, VIDRIO H, ENRIQUEZ R (1995)
Pharmacology of casimiroa edulis; III. Relaxant and contractile effects in rat aortic rings.
J Ethnopharmacol 47, 1-8
- MATA R, CAMACHO MR, DE CERVERA E, BYES R, LINARES E (1990)
Secondary metabolites from Hintonia latiflora.
Phytochemistry 29, 2037-2040
- METCALF PA, FOLSOM AR, DAVIS CE, KENNETH KW, HEISS G (2000)
Haemostasis and carotid artery wall thickness in non-insulin dependent diabetes mellitus.
Diabet Res Clinic Pract 47, 25-35
- MIYAMOTO K, OGURA Y (1999)
Pathogenetic potential of leukocytes in diabetic retinopathy.
Semin Ophthalmol 14, 233-239
- MONK JR, REYNOLDS EE, THOMAS AP, WILLIAMSON JR (1988)
Novel kinetics of single cell Ca²⁺ transient in stimulated hepatocytes and A10 cells measured using fura-2 and fluorescent videomicroscopy.
J Biol Chem 10, 4569-4575

- MULDOON LL, RODLAND KD, FORSYTHE ML, MAGUN BE (1989)
Stimulation of phosphatidylinositol hydrolysis, diacylglycerol release and gene expression in response to endothelin a potent new agonist for fibroblasts and smooth muscle cells.
J Biol Chem 264, 8529-8536
- MÜLLER B, (1997)
Untersuchung zur Wirkung von Pflanzenextrakten und Pflanzeninhaltsstoffen auf das kardiovaskuläre System durch Kontraktionsmessungen an isolierten Aortenringen und Papillarmuskeln.
Diss Pharm, München
- MÜLLER-WIELAND D, KRONE W (2000)
Diabetes mellitus.
In: Gerok W, Huber C, Meinertz T, Zeidler H (Hrsg.): Die Innere Medizin, Schattauer, Stuttgart, 1014-1043
- NAKAKI T, ROTH BL, CHUANG D-M, COSTA E (1985)
Phasic and tonic components in 5-HT₂-receptor-mediated rat aortic contraction.
J Pharmacol Exp Ther 234, 442-446
- NELSON L, SCARBOROUGH L, CARRIER GO (1984)
Nifedipine and α -adrenoceptors in rat aorta. Role of extracellular calcium in α -1 and α -2 adrenoceptor-mediated contraction.
J Pharmacol Exp Ther 231, 597-602
- NELSON RW (2000)
Diabetes mellitus.
In: Ettinger SJ, Feldman EC (eds.): Textbook of veterinary internal medicine, 5. edition, vol. 2, W.B. Saunders Company, Philadelphia:1438-1460
- NESTO RW, BELL D, BONOW RO, FONESCA V, GRUNDY SM, HORTON ES, WINTER ML, PORTE D, SEMENKOVICH CF, SMITH S, YOUNG LH, KAHN R (2004)
Thiazolidinedione use, fluid retention and congestive heart failure.
Diabetes Care 27, 256-263
- NOSTER S (1992)
Untersuchung der Copalchi-Rinden unter besonderer Berücksichtigung von Coutarea hexandra, Exostema caribaeum, Exostema mexicanum und Hintonia latiflora.
Diss Biol, Hamburg
- O'LEARY DH, POLAK JF (2002)
Intima-media thickness: a tool for atherosclerosis imaging and event prediction.
Am J Cardiol 90, 18-21
- OHTA N, TSAI J-Y, SECCHI EF, KADOR PF, SATO S (1999)
Neutrophils in galactose-fed dogs: suppressed apoptosis and increased adhesion to retinal capillary endothelial cells.
J Diab Complicat 13, 151-158

- PALMER PES (1999)
Unterschiedliche Ultraschall-Modi.
In: Palmer PES (Hrsg.): Einführung in die Sonographie, Verlag Hans Huber, Bern: 4-6
- PANNIRSELVAM M, ANDERSON TJ, TRIGGLE CR (2003)
Endothelial cell dysfunction in type I and II diabetes: the cellular basis of dysfunction.
Drug Dev Res 58, 28-41
- PARK L, RAMAN KG, LEE KJ, LU Y, FERRAN LJ, CHOW WS, STERN D, SCHMIDT AM (1998)
Suppression of accelerated diabetic atherosclerosis by the soluble receptor for advanced glycation endproducts.
Nat Med 4, 1025-1031
- PARTANEN J, NISKANEN L, LEHTINEN J, MERVAALA E, SIITONEN O, UUSITUPA M (1995)
Natural history of peripheral neuropathy in patients with non-insulin-dependent diabetes mellitus.
New Engl J Med. 333, 89-94
- PEARSON PJ, VANHOUTTE PM (1993)
Vasodilator and vasoconstrictor substances produced by the endothelium.
Rev Physiol Biochem Pharmacol 122, 1-67
- PÉCSVARÁDY Z, FISHER TC, DARWIN CH, FABOK A, MAQUEDA TS, SAAD MF, MEISELMANN HJ (1994)
Decreased polymorphnuclear leucocyte deformability in NIDDM.
Diabetes Care 17, 57-63
- PEPPA M, URIBARRI J, VLISSARA H (2003)
Glucose, advanced glycation end products and diabetes complications: what is new and what works.
Clin Diabet 21, 186-187
- PFISTER SL, PRATT PE, KURIAN J, CAMPBELL WB (2003)
Glibenclamide inhibits thromboxane-mediated vasoconstriction by thromboxane receptor blockade
Vasc Pharmacol 40, 285-292
- PFITZER (2001)
Signal transduction in smooth muscle: regulation of myosin phosphorylation in smooth muscle.
J Appl Physiol 91, 497-503
- PHILLIPS LS, GRUNBERGER G, MILLER E, PATWARDHAN R, RAPPAPORT EB, SALZMAN A (2001)
Once- and twice-daily dosing with rosiglitazone improves glycemic control in patients with type 2 diabetes.
Diabetes Care 24, 308-315

- PINTO A, CAPASSO A, SORRENTINO L (1997)
Experimental animal studies on the hypoglycemic effects of copalchi extract.
Arzneim-Forsch/Drug Res 47: 829-833
- POULSEN-NAUTRUP C (2001)
Physikalische Grundlagen, Technische Grundlagen.
In: Poulsen-Nautrup C, Tobias R (Hrsg.): Atlas und Lehrbuch der Ultraschalldiagnostik bei Hund und Katze, Schlütersche, Hannover: 24-48
- PUTTEMANS T, NEMRY C (1998)
Diabetes: The use of color Dopplersonography for the assesment of vascular complications.
Europ J Ultrasound 7, 15-22
- RAATZ NELSON S, CHIEN T, DI SALVO J (1997)
Genistein sensitivity of calcium transport pathways in serotonin-activated vascular smooth muscle cells.
Arch Biochem Biophys 345, 65-77
- RAND JS, FLEEMAN LM, FARROW HA, APPELTON DJ, LEDERER R (2004)
Canine and feline diabetes mellitus: nature or nurture?
J Nutr 134, 2072-2080
- RANG HP, DALE MM, RITTER JM, MOORE PK (2003a)
Chemical mediators and the autonomic nervous system.
In: Rang HP, Dale MM, Ritter JM, Moore PK (eds.): Pharmacology. 5. edition, Churchill Livingstone, Edinburgh: 124-125
- RANG HP, DALE MM, RITTER JM, MOORE PK (2003b)
The endocrine pancreas and the control of blood glucose.
In: Rang HP, Dale MM, Ritter JM, Moore PK (eds.): Pharmacology, 5. edition, Churchill Livingstone, Edinburgh: 380-393
- RECHT PA, TEPEDINO GJ, SIECKE NW, BUCKLEY MT, MANDEVILLE JT, MAXFIELD FR, LEVIN RI (2004)
Oxalic acid alters intracellular calcium in endothelial cells.
Atherosclerosis 173, 321-328
- REHER G (1982)
Untersuchungen der Rinde von *Coutarea latiflora* D.C. (Rubiaceae) und anderer "Copalchi"-Rinden – Isolierung und Charakterisierung neuer Inhaltsstoffe.
Diss Biol, Hamburg
- REITER M (1966).
Der Einfluss der Natrium-Ionen auf die Beziehung zwischen Frequenz und Kraft der Kontraktion des isolierten Meerschweinchenmyokards
Arch Pharmacol 254, 261-286
- RITZMANN H (1950)
Beitrag zur Diabetesbehandlung.
Hippokrates 21, 161-167

RIVELINE JP, DANCHIN N, LEDRU FM VARROUD-VIAL M, CHARPENTIER G (2003)
Sulfonylureas and cardiovascular effects: from experimental data to clinical use.
Diab Metab 29,1-19

RIZVI AA (2004)
Type 2 diabetes: epidemiologic trends, evolving pathogenic concepts and recent changes in
therapeutic approach.
South Med J 97, 1079-1087

ROSENBAUM P, PERES RB, ZANELLA MT, FERREIRA SRG (2002)
Improved glycemic control by acarbose therapy in hypertensive diabetic patients: effects on
blood pressure and hormonal parameters.
Braz J Med Biol Res 35, 877-884

RÜEGG JC (1990)
Muskelphysiologie.
In: Schmidt RF, Thews G (Hrsg.): Physiologie des Menschen, 24. Aufl., Springer Verlag,
Berlin: 83-86

RÜEGG UT, WALLNÖFER A, WEIR S, CAUVIN CJ (1989)
Receptor-operated calcium-permeable channels in vascular smooth muscle.
J Cardiovasc Pharmacol Pharmac 14, 549- 558

SASSY-PRINGENT C, HEUDES D, MANDET C, BELAIR M-F, MICHEL O,
PERDEREAU B, BARIETY J, BRUNEVAL P (2000)
Early glomerular macrophage recruitment in streptozotocin-induced diabetic rats.
Diabetes 49, 466-475

SALSBURG (1971)
The UGDP study.
JAMA 13, 1704-1705

SCHMIDT P (1951)
Bericht über die Behandlung mit dem peroralen Antidiabeticum Sucontral®.
Sonderdruck der Firma Werner Sippel, Konstanz

SEAQUIST ER, GOETZ F, RICH S, BARBOSA J (1989)
Family clustering of diabetic renal disease: evidence for genetic susceptibility and diabetic
nephropathy.
N Engl J Med 320, 1161-1165

SEGARRA G, MEDINA P, VILA JM, MARTINEZ- LEON JB, DOMENECH C, PRIETO F,
LLUCH S (2002)
Relaxation induced by milrinone and rolipram in human penile arteries and veins.
Europ J Pharmacol 444, 103-106

SENSCH O (1995)
Direkte und indirekte Bestimmung der Wirkung von Calcium-Kanalblockern durch Span-
nungs-Klemm- („Patch-Clamp“) Technik, Fluoreszenzmikroskopie und Kontraktionsmes-
sung: Einfluss von Phenylpropan-Derivaten, Sesquiterpenen und einem 1,4-Dihydropyridin
Diss Pharm, München

LITERATURVERZEICHNIS

- SETTER SM, ILTZ JL, THAMS J, CAMPELL RK (2003)
Metformin hydrochloride in the treatment of type 2 diabetes mellitus: A clinical review with a focus on dual therapy.
Clin Ther 25, 2991-3026
- SHIN HM, MORGAN KG (2003)
Vasodilation by banhabackchulchunmatang, a chinese medicine, is associated with modulation of PKC α activation and NO production.
Life Sci 74, 723-732
- SHINKE T, TAEUCHI M, TAKAOKA H, YOKOYAMA M (1999)
Beneficial effects of heart rate reduction on cardiac mechanics and energetics in patients with left ventricular dysfunction.
Jpn Circ J 63, 957-964
- SIMPSON AWM, STAMPFL A, ASHLEY CC (1990)
Evidence for receptor-mediated bivalent-cation entry in A10 vascular smooth cells.
Biochem J 267, 277-280
- SLIJEPČEVIĆ M, KRAUS L (1997).
The diabetic mouse as an experimental model for measuring the blood glucose-lowering effects of plant extracts and insulin preparations.
Acta Therap 23, 47-58
- SOMLYO AP (1997)
Rhomantic interludes raise blood pressure.
Nature 389, 908-911
- SOMLYO AP, SOMLYO AV (1994)
Signal transduction and regulation in smooth muscle.
Nature 372, 231-236
- SOMLYO AP, SOMLYO AV (2000)
Signal transduction by G-proteins, Rho-kinase and protein phosphatase to smooth muscle myosin II.
J Physiol 522, 177-185
- SOWERS JR (2004)
Insulin resistance and hypertension.
Am J Physiol Heart Circ Physiol 286, 1597-1602
- STALLMACH TH, KLÖPFL G, ROTH J, SPINAS GA (2004)
Stoffwechselerkrankungen, Diabetes mellitus
In: Böcker W, Denk H, Heitz PU (Hrsg.): Pathologie, Urban & Fischer, München: 1102-1103
- STEHOUWER CDA, LAMBERT J, DONKER AJM, VAN HINSENBERG VWM (1997)
Endothelial dysfunction and pathogenesis of diabetic angiopathy.
Cardiovasc Res 34, 55-68

- STULL JT, KRUEGER JK, KAMM KE, GAO Z-H, ZHI G, PADRE R (1996)
Myosin Light Chain Kinase.
In: Bárány, M. (eds.): Biochemistry of smooth muscle contraction, Academic Press, Inc., San Diego, California: 119-130
- TABIBIAZAR R, EDELMAN SV (2003)
Silent ischemia in people with diabetes: a condition that must be heard.
Clin Diabet 21, 5-9
- TAKATA S, HIRATA Y, TAKAGI Y, FUKASE M, FUJITA T (1990)
The cellular mechanism of action by vasoconstrictor hormones in cultered rat vascular smooth muscle cells.
Am J Hypertens 3, 227-230
- TALSETH T, MC NAY JL, BALLINGER K, CLEMENTI WA, SHEPERD AMM (1981)
Vasoconstriction limits to the use of the central ear artery pressure in conscious rabbits.
Lab Anim 15, 1-3
- TANG J, MOHR S, DU YD, KERN TS (2003)
Non-uniform distribution of lesions and biochemical abnormalities within the retina of diabetic humans.
Curr Eye Res 27, 7-13
- TERRES J (1913)
Anales del Instituto Medico Nacional
An Inst Mex Nac Mexiko 12, 109-118
- THEWS G, MUTSCHLER E, VAUPEL P (1999a)
Herz.
In: Thews G, Mutschler E, Vaupel P (Hrsg.): Anatomie, Physiologie, Pathophysiologie des Menschen, 5. Auflg., Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft mbH, Stuttgart: 167-171
- THEWS G, MUTSCHLER E, VAUPEL P (1999b)
Pankreashormone und Blutzuckerregulation.
In: Thews G, Mutschler E, Vaupel P (Hrsg.): Anatomie , Physiologie, Pathophysiologie des Menschen, 5. Auflg., Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft mbH, Stuttgart: 512-520
- THRAINSDOTTIR S, MALIK RA, DAHLIN LB, WIKSELL P, ERIKSSON KF, ROSEN I, PETERSSON J, GREEN DA, SUNDKVIST G (2003)
Endoneurial capillary abnormalities presage deterioration of glucose tolerance and accompany peripheral neuropathy in man.
Diabetes 52, 2615-2622
- TSILIBARY EC (2003)
Microvascular basement membranes in diabetes mellitus.
J Pathol 200, 537-546
- UKPDS (UK PROSPECTIVE DIABETES STUDY) (1998)
Intensive blood-glucose control with sulfonylureas or insulin compared with conventional treatment and risk complications in patients with type 2 diabetes (UKPDS 33)
Lancet 352, 837-853

URESIN Y, ERBAS B, OZEK M, OZKOK E, GUROL AO (2004)

Losartan may prevent the elevation of plasma glucose, corticosterone and catecholamine levels induced by chronic stress.

J Ren Angioten Aldost Syst 5, 93-96

VIDA F (1951)

Erfahrungsbericht mit dem peroralen Antidiabeticum Sucontral®.

Med Welt 20, 1623-1624

VINET R, PINARDI G, PENNA M (1991)

Modulation of alpha-adrenergic-induced contractions by endothelium-derived relaxing factor in rat aorta.

Gen Pharmacol 22, 137-142

VINIK AI, MASER RE, MITCHELL BD, FREEMAN R (2003)

Diabetic autonomic neuropathy.

Diabetes Care 26, 1553-1579

VUKSAN V, STAVRO MP, SIEVENPIPER JL, KOO VYY, WONG E, BELJAN-ZDRAVKOVIC U, FRANCIS T, JENKINS AL, LEITER LA, JOSSE RG, XU Z (2000)

American Ginseng improves glycemia in individuals with normal glucose tolerance: effect of dose and time escalation.

J Am Coll Nutr 19, 738-744

VYSOTSKI ES, LIU ZJ, MARKOVA SV, BLINKS JR, DENG L, FRANK LA, HERKO M, MALIKOVA NP, ROSE JP, WANG BCH, LEE J (2003)

Violet bioluminescence and fast kinetics from W92F obelin

Biochem 42 6013-6024

WAHL P (2001)

Stoffwechsel

In: Baenkler HW, Fritze D, Fießel HS, Goeckenjan G et al. (Hrsg.): Innere Medizin, Hippokraties Verlag, Stuttgart: 939-944

WAHLBERG G, ADAMSON U, SVENSON J (2000)

Pyridine nucleotides in glucose metabolism and diabetes: a review.

Diab Metab Res Rev 16, 33-42

WEGENER JW, SCHULLA V, LEE T-S, KOLLER A, FEIL S, FEIL R, KLEPPISCH T, KLUGBAUER N, MOOSMANG S, WELLING A, HOFMANN F (2004)

An essential role of Cav1.2 L-type calcium channel for urinary bladder function.

FASEB 18, 1159-1161

WESSLAU C, BÖTTIGER ST, SCHONERT G, GYMREK G (1984)

Eine einfache Methode zur Blutdruckmessung am nicht narkotisierten Kaninchen.

Z Exp Chir 17, 298-302

WICKLINE SA, SHEPARD RK, DAUGHERTY A (1993)

Quantitative ultrasonic characterization of lesion composition and remodeling in atherosclerotic rabbit aorta.

Arterioscler Thromb 13, 1543-1550

LITERATURVERZEICHNIS

WINTER B (1951)

Zur Behandlung des Diabetes mellitus.

Hippokrates 22, 249-250

WOLF G (2004)

Insulin resistance and obesity: resistin, a hormone secreted by adipose tissue

Nutr Res 62, 389-394

WOJCICKI JM, LADYZYNSKI P (2003)

Toward the improvement of diabetes treatment: recent developments in technical support.

J Artif Organs 6, 73-87

YANAGISAWA M, KURIHARA H, KIMURA S, GOTO K, MASAKI T (1988)

A novel peptide vasoconstrictor, endothelin, is produced by vascular endothelium and modulates smooth muscle Ca^{2+} channels.

J Hypertens 6, 188-191

ZHOU G, MYERS R, LI Y, CHEN Y, SHEN X, FENYK-MELODY J, WU M, VENTRE J, DOEBBER T, FUJII N, MUSI N, HIRSHMANN MF, GOODYEAR LJ, MOLLER DE (2001)

Role of AMP-activated protein kinase in mechanism of metformin action.

J Clin Invest 108, 1167-1174

8 TABELLENVERZEICHNIS

| | |
|--|----|
| Tabelle 1: Einteilung des Diabetes mellitus nach der WHO 1997 | 4 |
| Tabelle 2: Verschiedene Stadien der diabetischen Nephropathie in Abhängigkeit von der Dauer der Erkrankung (nach WAHL 2001) | 18 |
| Tabelle 3: Folgen der diabetischen autonomen Neuropathie (nach Frercks und Renz-Polster 2001) | 19 |
| Tabelle 4: Modifizierte Krebs-Henseleit-Lösung (Konzentration in mM) | 47 |
| Tabelle 5: Pipettierschema Hintonia-latiflora-Extrakt | 53 |
| Tabelle 6: Pipettierschema Coutareagenin | 53 |
| Tabelle 7: Pipettierschema Milrinon | 53 |
| Tabelle 8: Pipettierschema Hintonia latiflora Extrakt | 56 |
| Tabelle 9: Modifizierte Krebs-Henseleit-Lösung (Konzentration in mM) | 59 |
| Tabelle 10: DMEM Zusammensetzung | 64 |
| Tabelle 11: Zusatz zum DMEM-Zellmedium | 64 |
| Tabelle 12: Zusammensetzung der PBS Waschlösung | 64 |
| Tabelle 13: Zusammensetzung der Trypsin/EDTA-Lösung | 65 |
| Tabelle 14: Verwendete Medikamente für den In-vivo-Versuch | 67 |
| Tabelle 15: Versuchsbegleitende Medikamente | 67 |
| Tabelle 16: Versuchsplan für den In-vivo-Versuch | 69 |
| Tabelle 17: Hintonia latiflora Einfluss auf die Noradrenalin-Kontraktion (mN) (Zahlenwerte zur Abbildung 24) | 81 |
| Tabelle 18: Coutareagenin Einfluss auf die Noradrenalin-Kontraktion (mN) (Zahlenwerte zur Abbildung 25) | 82 |
| Tabelle 19: Milrinon Einfluss auf die Noradrenalin-Kontraktion (mN) (Zahlenwerte zur Abbildung 26) | 83 |
| Tabelle 20: Ethanol Einfluss auf die Noradrenalin-Kontraktion (mN) (Zahlenwerte zur Abbildung 27) | 84 |
| Tabelle 21: Hintonia latiflora Einfluss auf die Kalium-Kontraktur (mN) (Zahlenwerte zur Abbildung 28) | 85 |

TABELLENVERZEICHNIS

| | |
|---|-----|
| Tabelle 22: Coutareagenin Einfluss auf die Kalium-Kontraktur (mN) (Zahlenwerte zur Abbildung 29) | 86 |
| Tabelle 23: Hintonia-latiflora-Extrakt Einfluss auf den Papillarmuskel (mN) (Zahlenwerte zur Abbildung 31) | 88 |
| Tabelle 24: Aorta abdominalis Gefäßdurchmesser (mm) (Zahlenwerte zur Abbildung 36) | 93 |
| Tabelle 25: Aorta abdominalis max. systolische Blutflussgeschwindigkeit (cm/s) (Zahlenwerte zur Abbildung 37) | 95 |
| Tabelle 26: Aorta abdominalis enddiastolische Blutflussgeschwindigkeit (cm/s) (Zahlenwerte zur Abbildung 38) | 96 |
| Tabelle 27: Aorta abdominalis Resistenz-Index (Zahlenwerte zur Abbildung 39) | 98 |
| Tabelle 28: A. carotis communis Gefäßdurchmesser (mm) (Zahlenwerte zur Abbildung 40) | 99 |
| Tabelle 29: A. carotis communis max. systolische Blutflussgeschwindigkeit (cm/s) (Zahlenwerte zur Abbildung 41) | 101 |
| Tabelle 30: A. carotis communis enddiastolische Blutflussgeschwindigkeit (cm/s) (Zahlenwerte zur Abbildung 42) | 102 |
| Tabelle 31: A. carotis communis Resistenz-Index (Zahlenwerte zur Abbildung 43) | 104 |
| Tabelle 32: Herzfrequenz (Schläge/min) (Zahlenwerte zur Abbildung 44) | 105 |
| Tabelle 33: Mittlerer arterieller Blutdruck (mmHg) (Zahlenwerte zur Abbildung 45) | 107 |
| Tabelle 34: Blutzucker (mg/dl) (Zahlenwerte zur Abbildung 46) | 108 |

9 ABBILDUNGSVERZEICHNIS

| | |
|---|----|
| Abbildung 1: Biosynthese und Sekretion von Insulin | 6 |
| Abbildung 2: Darstellung der Insulin-Freisetzung aus den β -Zellen der Langerhanschen Inseln des Pankreas (nach AMMON 1995) | 8 |
| Abbildung 3: Stoffwechselweg der Insulinfreisetzung und Wirkmechanismus von Sulfonylharnstoffen (nach HASSELBLATT und PANTEN 2001) | 10 |
| Abbildung 4: Überblick über die Sekundärerkrankungen des Diabetes mellitus (nach FRERCKS und RENZ-POLSTER 2001) | 13 |
| Abbildung 5: <i>Hintonia latiflora</i> Busch in Blüte | 26 |
| Abbildung 6: Gewinnung der <i>Hintonia-latiflora</i> -Rinde | 27 |
| Abbildung 7: Chemische Formel von Coutareagenin, eine der Leitsubstanzen in dem Phytoantidiabetikum Sucontral® | 28 |
| Abbildung 8: Schematische Darstellung der Kontraktion glatter Muskelzellen (nach BÁRÁNY und BÁRÁNY 1996) | 31 |
| Abbildung 9: Schematische Darstellung der Signaltransduktion bei der Kontraktion der Gefäßmuskelzelle (nach MÜLLER 1997) | 34 |
| Abbildung 10: Synthese und Wirkmechanismus von NO (nach MÜLLER 1997) | 36 |
| Abbildung 11: Versuchsanordnung zur Messung der Kontraktionskraft isolierter Aortenringe | 50 |
| Abbildung 12: Typischer zeitlicher Verlauf einer durch Kalium (30 mM) induzierten Kontraktion am Aortenring des Meerschweinchens | 52 |
| Abbildung 13: Typischer Verlauf einer durch Noradrenalin (10 μ M) induzierten Kontraktion am Aortenring des Meerschweinchens | 52 |
| Abbildung 14: Auswertung der Kontraktionskurven von Aortenringen am Beispiel einer Noradrenalin-induzierten Kontraktion | 54 |
| Abbildung 15: Versuchsaufbau für die fluoreszenzmikroskopische Calcium-Messungen | 61 |
| Abbildung 16: Positionierung der Ultraschall-Sonde zur Darstellung der Aorta abdominalis | 73 |
| Abbildung 17: Aorta abdominalis mit Abgang der A. renalis | 73 |

ABBILDUNGSVERZEICHNIS

| | |
|--|----|
| Abbildung 18: Sonographische Darstellung der Aorta abdominalis im B-Mode und zugeschaltetem Doppler zum Auffinden des Gefäßes | 74 |
| Abbildung 19: B-Mode-Darstellung der Aorta abdominalis zum Ausmessen des Gefäßdurchmessers | 74 |
| Abbildung 20: Dopplerspektrum der Aorta abdominalis zur Messung der maximalen systolischen und enddiastolischen Blutflussgeschwindigkeit | 75 |
| Abbildung 21: Positionierung der Ultraschall-Sonde zur Darstellung der A. carotis | 76 |
| Abbildung 22: B-Mode-Darstellung der A. carotis communis zur Ausmessung des Gefäßdurchmessers | 76 |
| Abbildung 23: Dopplerspektrum der A. carotis communis zur Messung der maximalen systolischen und enddiastolischen Blutflussgeschwindigkeit | 77 |
| Abbildung 24: Der Einfluss des Hintonia-latiflora-Extraktes auf Noradrenalin-vorkontrahierte Aortenringe des Meerschweinchens | 80 |
| Abbildung 25: Der Einfluss von Coutareagenin auf die Noradrenalin-vorkontrahierten Aortenringe des Meerschweinchens | 81 |
| Abbildung 26: Der Einfluss von Milrinon auf die Noradrenalin-vorkontrahierten Aortenringe des Meerschweinchens | 82 |
| Abbildung 27: Der Einfluss von Hintonia latiflora, Coutareagenin und Milrinon auf Noradrenalin-vorkontrahierte Aortenringe des Meerschweinchens | 83 |
| Abbildung 28: Der Einfluss von Hintonia-latiflora-Extrakt auf die Kalium-vorkontrahierten Aortenringe des Meerschweinchens | 85 |
| Abbildung 29: Der Einfluss auf Coutareagenin auf die Kalium-vorkontrahierten Aortenringe des Meerschweinchens | 86 |
| Abbildung 30: Kontraktionskurve eines Papillarmuskels | 87 |
| Abbildung 31: Der Einfluss von Hintonia latiflora auf die Kontraktionskraft des Papillarmuskels des Meerschweinchens | 88 |
| Abbildung 32: Zeitverlauf der intrazellulären Calcium-Konzentration nach Zugabe von Vasopressin (2 nM) ohne und mit Anwesenheit von Coutareagenin | 89 |
| Abbildung 33: Der Einfluss von Coutareagenin auf den durch 2 nM Vasopressin induzierten Calcium-Transienten in Fura-2 beladenen A 10-Zellen | 90 |
| Abbildung 34: Aufnahmen der intrazellulären Calcium-Konzentration einer Zelle | 91 |

ABBILDUNGSVERZEICHNIS

| | |
|--|-----|
| Abbildung 35: Farbskala der Calcium-Konzentrationen | 91 |
| Abbildung 36: Sonographische Darstellung des Gefäßdurchmessers der Aorta abdominalis | 93 |
| Abbildung 37: Sonographische Darstellung der maximalen systolischen Blutflussgeschwindigkeit in der Aorta abdominalis | 94 |
| Abbildung 38: Sonographische Darstellung der enddiastolischen Blutflussgeschwindigkeit in der Aorta abdominalis | 96 |
| Abbildung 39: Resistenz-Index der Aorta abdominalis | 97 |
| Abbildung 40: Sonographische Darstellung des Gefäßdurchmessers der A. carotis communis | 99 |
| Abbildung 41: Darstellung der maximalen systolischen Blutflussgeschwindigkeit der A. carotis communis | 100 |
| Abbildung 42: Darstellung der enddiastolischen Blutflussgeschwindigkeit der A. carotis communis | 102 |
| Abbildung 43: Resistenz-Index der A. carotis communis | 103 |
| Abbildung 44: Herzfrequenz | 105 |
| Abbildung 45: Mittlerer arterieller Blutdruck | 106 |
| Abbildung 46: Blutzucker | 108 |

10 ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

| | |
|----------------------|------------------------------------|
| Ach | Acetylcholin |
| ADP | Adenosindiphosphat |
| AGE | Advanced glycation endproducts |
| ATP | Adenosintriphosphat |
| AV-Klappen | Atrioventricular-Klappen |
| B-Mode | B=Brightness, Mode=Verfahren |
| Ca ²⁺ | Calcium |
| CaM | Calmodulin |
| cAMP | Cyclisches Adenosinmonophosphat |
| CGMP | Cyclisches Guanosinmonophosphat |
| cos | Kosinus |
| Cout | Coutareagenin |
| CW-Dopplerverfahren | Continuous Wave Dopplerverfahren |
| DAG | Diacylglycerin |
| DMEM | Dulbeco`s Minimum Essential Medium |
| DMSO | Dimethylsulfoxid |
| ER | Endoplasmatisches Reticulum |
| ET | Endothelin |
| FCS | Fetal calf serum |
| GFR | Glomeruläre Filtrationsrate |
| Glut 4 | Glucosetransporter 4 |
| GSH | Glutathion (reduziert) |
| GSSG | Glutathion (oxidiert) |
| HDL | High density lipoprotein |
| IP ₃ | Inositoltriphosphat |
| K ⁺ | Kalium |
| KCl | Kalium Chlorid |
| kDa | Kilo Dalton |
| KGW | Körpergewicht |
| LDL | Low density lipoprotein |
| L-Typ-Calcium-Kanäle | Long lasting Calcium-Kanäle |
| MAP | Mittlerer arterielle Blutdruck |

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

| | |
|----------------------|---|
| Mg ²⁺ | Magnesium |
| MgATP | Magnesium Adenosintriphosphat |
| MLC | Myosin light chain |
| MLCK | Myosin light chain kinase |
| MLCP | Myosin light chain phosphatase |
| mM | millimolar |
| mN | milliNewton |
| mV | miliVolt |
| nM | nanomolar |
| MSB | Maximale systolische Blutflussgeschwindigkeit |
| NA | Noradrenalin |
| NADP | Nicotin-Adenin-Dinucleotid-Phosphat |
| NADPH | Nicotin-Adenin-Dinucleotid-Phosphat (reduziert) |
| NO | Stickstoffmonoxid |
| PBS | Phosphate buffered solution |
| PKC | Proteinkinase C |
| PLC | Phospholipase C |
| PPAR _γ | Peroxisome-proliverator-activated receptor γ |
| PW-Dopplerverfahren | Pulsed wave Dopplerverfahren |
| RI | Resistenz-Index |
| RLC | Regulatory myosin light chain |
| ROC | Receptor-operated channels |
| RPF | Renaler Plasmafluss |
| SE | Standardfehler |
| sGC | Lösliche Guanylcyclase |
| T-Typ-Calcium-Kanäle | Transient Calcium-Kanäle |
| VOC | Voltage-operated channels |
| VP | Vasopressin |
| WHO | World Health Organisation |

11 DANKSAGUNG

Herrn Univ.-Prof. Dr. med. vet. M. Stangassinger danke ich ganz herzlich für die Übernahme der Arbeit an der Tierärztlichen Fakultät der Ludwig-Maximilian-Universität München.

Ich danke auch Herrn Univ. Prof. Dr. med. B. Gänsbacher dafür, dass ich einen Teil der Arbeit an dem Institut für Experimentelle Onkologie und Therapieforschung der Technischen Universität München durchführen konnte. In diesem Sinne möchte ich mich auch bei Univ. Prof. Dr. med. F. Hofmann bedanken für die Möglichkeit einen Teil der Arbeit am Institut für Pharmakologie und Toxikologie der Technischen Universität München durchführen zu können.

Sehr herzlich bedanke ich mich bei Herrn Prof. Dr. med. vet. W. Erhardt für die hilfreichen Anregungen, die großartige Unterstützung und die Durchsicht der Arbeit.

Mein besonderer Dank gilt Dr. med. vet. Christine Baumgartner für die hervorragende Zusammenarbeit und die umfassende Betreuung.

Ich möchte mich auch bei Frau Dr. med. vet. J. Henke ganz herzlich für die konstruktiven Vorschläge bedanken.

Herrn Univ. Prof. Dr. oec. publ. Dr. med. vet. habil. K. Osterkorn von der tierärztlichen Fakultät der Ludwig-Maximilian-Universität München und Frau R. Busch vom Institut für Medizinische Statistik und Epidemiologie der Technischen Universität München danke ich für die Unterstützung bei der statistischen Auswertung. Ganz herzlich bedanke ich mich bei Herrn Dipl. Phys. A. Stampfl und Frau M. Ellendorf für die großartige Unterstützung, die zahlreichen Anregungen und die große Hilfsbereitschaft beim Aufbau der Zellkultur.

Des Weiteren gilt mein herzlichster Dank Frau U. Kremser für die geduldigen Unterweisungen und hilfreichen Ratschläge.

Frau P. Apostolopoulos gilt mein aufrichtiger Dank für die hervorragende Zusammenarbeit und die wertvollen Hilfestellungen, ebenso auch Frau S. Herzog. Ganz besonderes hilfreich waren auch immer die Anregungen und Geschichten von Herrn Dr. Bruno Sontia.

Bedanken möchte ich mich auch bei Herrn N. Ertl, Herrn P. Kerner und Herrn R. Kliegl für ihre umsichtige und schnelle Hilfe bei technischen Problemen.

Mein Dank gilt auch Herrn Dr. rer. nat. O. Sensch und der Firma Harras Pharma für die Bereitstellung der Versuchssubstanzen und der Beteiligung an den Unkosten.

Einen ganz besonderen Dank möchte ich meiner Familie und meinen Freunden aussprechen, die mich stets so ausdauernd und geduldig ermutigt und unterstützt haben.

