

Pharmakologie und Toxikologie

**DIE ANTAGONISTISCHE WIRKUNG VON *ZINGIBER OFFICINALE*  
ROSC. UND *MENTHA X PIPERITA* L. UND EINIGER IHRER  
INHALTSSTOFFE AM 5-HT<sub>3</sub>-REZEPTORKANALKOMPLEX:  
BEDEUTUNG FÜR ANTIEMESIS, REIZDARMSYNDROM-THERAPIE  
UND INSULINAUSSCHÜTTUNG**

Inaugural-Dissertation  
zur Erlangung des Doktorgrades der Naturwissenschaften  
im Fachbereich Chemie und Pharmazie  
der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät  
der Westfälischen Wilhelms-Universität Münster

vorgelegt von  
Katharina Heimes  
aus Schmallenberg

2009

---

Dekan: Prof. Dr. A. Hensel  
Erster Gutachter: Prof. Dr. E.J. Verspohl  
Zweiter Gutachter: Prof. Dr. A. Hensel

Tag der Disputation: 09.04.2009

Tag der Promotion: 09.04.2009

Nimm Dir Zeit zum Arbeiten - es ist der Preis des Erfolges.  
Nimm Dir Zeit zum Denken - es ist die Quelle der Kraft.  
Nimm Dir Zeit zum Spielen - es ist das Geheimnis ewiger Jugend.  
Nimm Dir Zeit zum Lesen - es ist der Brunnen der Weisheit.  
Nimm Dir Zeit zum Träumen - es bringt Dich den Sternen näher.  
Nimm Dir Zeit zu lieben und geliebt zu werden - es ist das Privileg der Götter.  
Nimm Dir Zeit zu lachen - es ist die Musik der Seele.

(altes irisches Sprichwort)

---

MEINER FAMILIE



## Inhaltsverzeichnis

<b><u>1</u></b>	<b><u>Einleitung</u></b>	<b>1</b>
<b>1.1</b>	<b>Serotonin und Serotoninrezeptoren</b>	<b>1</b>
1.1.1	Serotonin – Charakterisierung	1
1.1.2	Serotoninrezeptoren im Überblick	2
1.1.3	Der 5-HT <sub>3</sub> -Rezeptor	4
1.1.4	Serotonin im Gastrointestinaltrakt	6
<b>1.2</b>	<b>5-HT<sub>3</sub>-Rezeptor-assoziierte Erkrankungen</b>	<b>9</b>
1.2.1	Übelkeit und Erbrechen	9
1.2.2	Reizdarmsyndrom	15
<b>1.3</b>	<b>Ingwer</b>	<b>18</b>
1.3.1	Botanik und Vorkommen von <i>Zingiber officinale</i> ROSCOE	18
1.3.2	Inhaltsstoffe	21
1.3.3	Anwendung und pharmakologische Wirkung	27
1.3.4	Studienlage zur Anwendung von Ingwer in der antiemetischen Therapie	29
<b>1.4</b>	<b>Pfefferminzöl</b>	<b>33</b>
1.4.1	Botanik und Vorkommen von <i>Mentha x piperita</i> L.	33
1.4.2	Inhaltsstoffe	34
1.4.3	Medizinische Anwendung und pharmakologische Wirkung	36
1.4.4	Studienlage zur Anwendung von Pfefferminzöl bei Reizdarmsyndrom	38
<b>1.5</b>	<b>Zielsetzung</b>	<b>40</b>
<b><u>2</u></b>	<b><u>Material</u></b>	<b>41</b>
<b>2.1</b>	<b>Zelllinien</b>	<b>41</b>
2.1.1	N1E-115 Zellen	41
2.1.2	INS-1 Zellen	41
<b>2.2</b>	<b>Drogenmaterial</b>	<b>42</b>
<b>2.3</b>	<b>Chemikalien und Geräte</b>	<b>42</b>
2.3.1	Isolierung und Anreicherung der Sesquiterpenkohlenwasserstoffe	42
2.3.2	Zellkultur	44
2.3.3	Pharmakologische Untersuchungen	46
2.3.4	Sonstige Chemikalien	48

---

2.3.5	Pufferlösungen und Stammlösungen	49
<b>3</b>	<b>Tiere</b>	<b>54</b>
<b>4</b>	<b>Methoden</b>	<b>55</b>
4.1	<b>Isolierung und Anreicherung der Sesquiterpenkohlenwasserstoffe</b>	<b>55</b>
4.1.1	Wasserdampfdestillation	55
4.1.2	Chromatographische Methoden	55
4.1.3	Isolierung von $\alpha$ -Zingiberen	60
4.2	<b>Pharmakologische Untersuchungen</b>	<b>65</b>
4.2.1	Zellkultur	65
4.2.2	[ <sup>14</sup> C]Guanidinium-Influx-Assay	65
4.2.3	Bindungsstudien an N1E-115 Zellen	66
4.2.4	Versuche am Rattenileum	69
4.2.5	Insulinsekretionsversuche und Radioimmunoassay	70
4.2.6	Bindungsstudien an INS-1 Zellen	72
4.3	<b>Statistik</b>	<b>73</b>
<b>5</b>	<b>Ergebnisse</b>	<b>74</b>
5.1	<b>Gewinnung des ätherischen Ingweröls und Isolierung der Sesquiterpenkohlenwasserstoffe</b>	<b>74</b>
5.1.1	Gewinnung und Charakterisierung des ätherischen Ingweröls	74
5.1.2	Chromatographische Isolierung der Sesquiterpene	77
5.1.3	Isolierung von $\alpha$ -Zingiberen	87
5.2	<b>Pharmakologische Untersuchung einiger Inhaltsstoffe des Ingwers und der Pfefferminze</b>	<b>96</b>
5.2.1	[ <sup>14</sup> C]Guanidinium-Influx-Assay	96
5.2.2	Bindungsstudien	106
5.2.3	Versuche am Ileum der Ratte	109
5.2.4	Pharmakologische Untersuchung zum antidiabetischen Wirkungsmechanismus von Ingwerextrakten	113
<b>6</b>	<b>Diskussion</b>	<b>124</b>
6.1	<b>Ingwer</b>	<b>124</b>
6.1.1	Gewinnung des Ingweröls und Isolierung der Sesquiterpenkohlenwasserstoffe	125

---

6.1.2	Pharmakologische Untersuchung zum Antagonismus der Hauptinhaltsstoffe des Ingweröls am 5-HT <sub>3</sub> -Rezeptorkanal	128
6.1.3	Bestimmung der 5-HT <sub>3</sub> -Rezeptorkanal-antagonistischen Wirkung eines Ingwer-Spezialextraktes	132
6.1.4	Wirkung von Ingwerextrakten auf die Serotonin-induzierte Hemmung der Insulinsekretion	134
<b>6.2</b>	<b>Pfefferminzöl</b>	<b>137</b>
6.2.1	Pharmakologische Untersuchung zur antagonistischen Wirkung von Pfefferminzöl und (-)-Menthol am 5-HT <sub>3</sub> -Rezeptorkanal	138
<b><u>7</u></b>	<b><u>Zusammenfassung</u></b>	<b><u>141</u></b>
<b><u>8</u></b>	<b><u>Abbildungsverzeichnis</u></b>	<b><u>145</u></b>
<b><u>9</u></b>	<b><u>Literaturverzeichnis</u></b>	<b><u>147</u></b>





## Abkürzungsverzeichnis

ACh	Acetylcholin
AMPA	$\alpha$ -Amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazol-Propionsäure
BSA	Bovines Serum Albumin
CGRP	calcitonin gene related peptide
CINV	chemotherapy induced nausea and vomiting
DC	Dünnschichtchromatographie/Dünnschichtchromatogramm
DMAPP	Dimethylallylpyrophosphat
DXP	1-Deoxy-D-xylulose-5-phosphat
D-RDS	diarrhöbetontes RDS
DXP	1-Deoxy-D-xylulose-5-phosphat
EC-Zellen	enterochromaffine Zellen
EDTA	Ethylen-diamin-tetraacetat
ENS	Enterisches Nervensystem
EPSP	excitatory postsynaptic potentials
FCPC	Fast Centrifugal Partition Chromatography
g	Erdbeschleunigung
GABA	Gammaaminobuttersäure
GC/MS	Gaschromatographie gekoppelt mit Massenspektrometer
GI-Trakt	Gastrointestinaltrakt
GPCR	G-Protein-Coupled Receptors
GPP	Geranylpyrophosphat
HCG	humanes Choriongonadotropin
HEPES	(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazin-1-ethansulfonsäure und N-(2-Hydroxyethyl)-piperazin-N'-2-ethansulfonsäure)
HMG-CoA	3-Hydroxy-3-methylglutaryl-Coenzym-A
HPLC	High Performance Liquid Chromatography
5-HIAA	5-hydroxyindoleacetic acid
5-HT	5-Hydroxytryptamin, Serotonin
5-HTP-DP	N-Acetyl-5-hydroxytryptophyl-5-hydroxytryptophan
IBS	irritable bowel syndrome
IPAN	intrinsic primary afferent neurons
IPP	Isopent-3-enylpyrophosphat
IUPHAR	International Union of Basic and Clinical Pharmacology
KRH	Krebs-Ringer-HEPES
MAO	Monoaminoxidase
MEP	2-C-Methyl-D-erythritol-4-phosphat
NMDA	N-Methyl-D-aspartat

NMR	nuclear magnetic resonance
O-RDS	obstipationsbetontes RDS
PBS	phosphate buffered saline
PLC	Phospholipase C
PONV	postoperative nausea and vomiting
PTAD	4-Phenyl-1,2,4-triazolin-3,5-dion
RDS	Reizdarmsyndrom
RIA	Radioimmunoassay
SC	Säulenchromatographie
SERT	Serotonin-Reuptake-Transporter
SP	Substanz P
TRIS	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
TSH	Thyreotropin
VIP	Vasoaktives intestinales Peptid
ZNS	Zentrales Nervensystem

# 1 Einleitung

Im Rahmen dieser Arbeit werden einige Inhaltsstoffe des Ingwers (*Zingiber officinale* ROSCOE) und der Pfefferminze (*Mentha x piperita* L.) auf die antagonistische Wirkung am 5-HT<sub>3</sub>-Rezeptor untersucht. Die Ergebnisse sollen Informationen zum Wirkungsmechanismus und Nutzen dieser Arzneipflanzen und ihrer Inhaltsstoffe in der antiemetischen Therapie, der Therapie des Reizdarmsyndroms und in Bezug auf eine mögliche antidiabetische Wirkung liefern. Da der Neurotransmitter Serotonin und der 5-HT<sub>3</sub>-Rezeptor im Mittelpunkt der Untersuchungen stehen, wird einleitend zunächst ein Überblick über das serotonerge System gegeben. Der Schwerpunkt liegt hierbei auf dem 5-HT<sub>3</sub>-Rezeptor und dem Darmnervensystem. Eine Beschreibung der pharmakologischen Wirkungen und der derzeitigen Studienlage zur therapeutischen Anwendung der Arzneipflanzen und ihrer Inhaltsstoffe folgt abschließend.

## 1.1 Serotonin und Serotoninrezeptoren

### 1.1.1 Serotonin – Charakterisierung

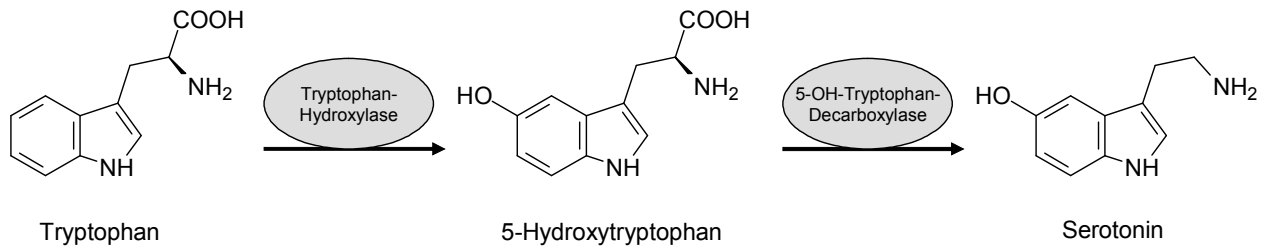
#### Historische Aspekte

Die Erforschung des Serotonins, auch bezeichnet als 5-Hydroxytryptamin (5-HT) oder Enteramin, begann bereits 1868 bei Untersuchungen vasokonstriktorischer Vorgänge<sup>[1]</sup>. Erspamer *et al.*<sup>[2]</sup> isolierten 1940 eine unbekannte Substanz aus enterochromaffinen Zellen des Magen-Darm-Traktes, die sie als Enteramin bezeichneten. Zeitgleich und unabhängig voneinander fanden Page *et al.* eine vasokonstriktorisches, aus Blutplättchen freigesetzte Verbindung, die als „Serum Vasokonstriktor“ beschrieben und somit als Serotonin bezeichnet wurde. Rapport aus der Gruppe von Page gelang zunächst durch aufwendige Isolierungsprozesse aus mehr als 900 Litern Serum die Isolierung des Serotonins und 1948 schließlich die chemische Identifizierung<sup>[3, 4]</sup>. Anfang der 50er Jahre des letzten Jahrhunderts wurde klar, dass es sich bei den untersuchten Wirkstoffen Enteramin und Serotonin um die gleiche Substanz handelt<sup>[1]</sup>.

#### Vorkommen, Biosynthese und Metabolismus

Serotonin ist ein biogenes Amin, das als Neurotransmitter und lokales Hormon an vielen physiologischen Prozessen beteiligt ist. 95 % des Serotonins im menschlichen Körper befinden sich im Magen-Darm-Trakt und 5 % in Neuronen des zentralen Nervensystems (ZNS), hier vor allem im paramedianen Bereich der Raphékerne und der Formatio reticularis<sup>[5]</sup>. Im Blut vorhandenes 5-HT entstammt ebenfalls dem Gastro-

intestinaltrakt, da enterochromaffine Zellen 5-HT an Thrombozyten bei deren Passage der Darmblutgefäße abgeben<sup>[6]</sup>. Serotonin wird aus der essentiellen Aminosäure Tryptophan synthetisiert. Zunächst entsteht unter Beteiligung der Tryptophan-Hydroxylase 5-Hydroxytryptophan, das dann durch die 5-Hydroxytryptophan-Decarboxylase zu Serotonin umgesetzt wird<sup>[7]</sup> (siehe Abb. 1.1). Die Tryptophan-Hydroxylase ist das limitierende Enzym der Serotonin-Biosynthese<sup>[8]</sup>.



**Abb. 1.1 Biosynthese von Serotonin**

5-HT wird hauptsächlich durch die Monoaminoxidase A (MAO-A)<sup>[9]</sup> und die Aldehyddehydrogenase zu 5-Hydroxyindolylessigsäure (5-HIAA) metabolisiert und renal ausgeschieden<sup>[6, 7]</sup>. Die Bestimmung von 5-HIAA im Harn wird zu diagnostischen Zwecken verwendet.

### 1.1.2 Serotoninrezeptoren im Überblick

Serotoninrezeptoren sind sowohl im peripheren als auch im zentralen Nervensystem, aber auch in Geweben des Magen-Darm-Traktes und des Herzkreislaufsystems zu finden. Derzeit werden nach der IUPHAR-Nomenklatur sieben Familien von membranständigen Serotoninrezeptoren unterschieden, die nach den Kriterien Funktion, Struktur und Transduktionsmechanismus weiter in Unterfamilien eingeteilt werden<sup>[10]</sup>. Weitestgehend handelt es sich bei den 5-HT-Rezeptoren um G-Protein gekoppelte Rezeptoren (GPCR), mit Ausnahme der 5-HT<sub>3</sub>-Rezeptoren, die ligandengesteuerte Ionenkanäle darstellen. Serotonin als natürlicher Agonist bindet mit unterschiedlicher Affinität an die jeweiligen Rezeptortypen. In Tab. 1.1 sind die Serotoninrezeptortypen zusammenfassend dargestellt.

Rezeptor-Typ	Signalweg	Vorkommen	Agonist	Antagonist	Therapeutische Anwendung
5-HT <sub>1A</sub>	cAMP↓ (G <sub>1/o</sub> )	ZNS, ENS	8-OH-DPAT Buspiron	WAY 100635 Spiperon	Agonisten: Anxiolytika, Antidepressiva
5-HT <sub>1B</sub>	cAMP↓ (G <sub>1/o</sub> )	ZNS, Gefäßsystem	Sumatriptan L 694247	GR 55562 SB 224289	Agonisten: Migräne- therapeutika
5-HT <sub>1D</sub>	cAMP↓ (G <sub>1/o</sub> )	ZNS, Herz	Sumatriptan PNU 109291	BRL 15572	Agonisten: Migräne- therapeutika
5-ht <sub>1E</sub>	cAMP↓ (G <sub>1/o</sub> )	ZNS	5-CT	Methysergid (unselektiv)	---
5-ht <sub>1F</sub>	cAMP↓ (G <sub>1/o</sub> )	Gehirn, Uterus, Mesenterium	LY 334370	---	Agonisten: Migräne- therapeutika
5-HT <sub>1P</sub> * (P = peripheral)	?	Enterische Neurone	5- und 6-OH- Indalpine	5-HTP-DP	---
5-HT <sub>2A</sub>	PLC↑ (G <sub>q</sub> )	weit verbreitet: zentr.+periph. Gewebe	DOI DOM	Ketanserin MDL 100907 Risperidon	Antagonisten: Antipsychotika
5-HT <sub>2B</sub>	PLC↑ (G <sub>q</sub> )	ZNS, glatte Muskulatur, Endothelzellen	BW 723C86	SB 200646 SB 204741	Antagonisten: therapeut. Ansatz: Migräneprophylaxe
5-HT <sub>2C</sub>	PLC↑ (G <sub>q</sub> )	ZNS, Plexus choroidei	Ro 600175	Mesulergin SB 242084 RS 102221	Antagonisten: therapeut. Ansatz: Anxiolytika
5-HT <sub>3A,3B,3C</sub>	Kanal- öffnung	ZNS, autonome Neurone, ENS; EC-Zellen	SR 57227 m-Chloro- phenylbiguanid	Granisetron Ondansetron Tropisetron	Antagonisten: Antiemetika, RDS- Therapeutika
5-HT <sub>4</sub>	cAMP↑ (G <sub>s</sub> )	ZNS, glatte Gefäßmusk., ENS	BIMU 8, Cisaprid, Tegaserod	GR 113808 SB 204070 RS 100235	Agonisten: Prokinetika, RDS- Therapeutika
5-ht <sub>5A,(5B)</sub>	cAMP↓ (G <sub>1/o</sub> )	ZNS (Maus)	LSD, 5-CT	---	---
5-ht <sub>6</sub>	cAMP↑ (G <sub>s</sub> )	ZNS	EMDT	Ro 04-6790 SB 271046 Clozapin	Antagonisten: Antipsychotika
5-HT <sub>7</sub>	cAMP↑ (G <sub>s</sub> )	ZNS, Gefäße, ENS, glatte Muskulatur	8-OH-DPAT	SB 258719 SB 269970 Clozapin	Antagonisten: Antipsychotika

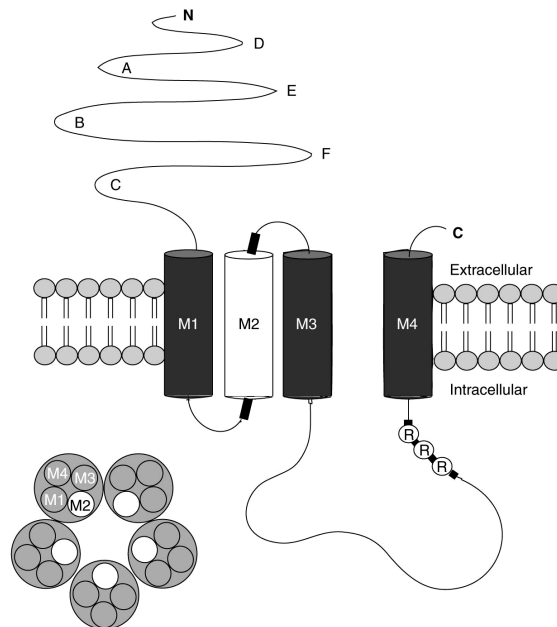
Tab. 1.1 Klassifizierung der Serotoninrezeptoren

Ergänzungen zu Tab. 1.1: Zusammengestellt aus Hoyer *et al.*<sup>[10]</sup> und Kim *et al.*<sup>[7];\*</sup>: Der 5-HT<sub>1P</sub>-Rezeptor ist der einzige 5-HT-Rezeptor, der bisher nicht kloniert wurde. Er wird in der IUPHAR-Nomenklatur der 5-HT-Rezeptoren nicht aufgeführt; 5-HT-Rezeptoren wurden in transfizierten Zellen auf Grundlage der Aminosäuresequenz gefunden; die funktionelle Bedeutung im intakten Gewebe ist noch fraglich.

### 1.1.3 Der 5-HT<sub>3</sub>-Rezeptor

#### Struktur

Der 5-HT<sub>3</sub>-Rezeptor wird aufgrund seiner Struktur und Funktion zur Klasse der „Cys-loop“-Superfamilie der Liganden-gesteuerten Ionenkanäle gezählt, zu der auch nicotinsche Acetylcholinrezeptoren, Glycinrezeptoren und GABA<sub>A</sub>-Rezeptoren gehören. Diese Rezeptoren bestehen aus fünf Untereinheiten, die, symmetrisch in der Zellmembran angeordnet, eine ionenpermeable Pore bilden (siehe Abb. 1.2). Jede Untereinheit besteht aus vier hydrophoben transmembranären Domänen. In der extrazellulären Domäne existieren zwei Cysteinreste im Abstand von 15 Aminosäuren, die eine Disulfidbrücke und somit eine Schleife (loop) bilden. Außerdem befindet sich zwischen der dritten und vierten transmembranären Domäne ein langes intrazelluläres Segment<sup>[11]</sup>.



**Abb. 1.2 Schematische Darstellung einer „Cys-loop“-Rezeptoruntereinheit**

Darstellung nach Thompson und Lummis (2007)<sup>[12]</sup>: Links unten ist ein Querschnitt der aus fünf Untereinheiten gebildeten Pore dargestellt. Die M2-Einheit liegt jeweils an der Innenseite der Pore und enthält die für die Kanalpassage und Ionenselektivität verantwortlichen Regionen. Die sechs extrazellulären Schleifen (A–F) enthalten die Ligandenbindungsstellen. Die mit R-R-R gekennzeichnete Region beeinflusst die Ionen-Leitfähigkeit<sup>[12, 13]</sup>.

Die extrazelluläre Domäne ist der Angriffspunkt für Agonisten und kompetitive Antagonisten. Bisher wurden die Aminosäuresequenzen von drei 5-HT<sub>3</sub>-Rezeptor-Untereinheiten identifiziert. Der 5-HT<sub>3</sub>-Rezeptor kann als homooligomerer (fünf 5-HT<sub>3A</sub>-Untereinheiten) oder als heterooligomerer Ionenkanal (Untereinheiten 5-HT<sub>3A</sub> und 5-HT<sub>3B</sub>) aufgebaut sein. Die Coexpression von 5-HT<sub>3B</sub>- mit 5-HT<sub>3A</sub>-Untereinheiten verändert Rezeptorkinetik, Spannungsabhängigkeit und Affinität von Rezeptoragonisten und -antagonisten an den Homopentameren<sup>[14]</sup>. Gene, die auf die Existenz von 5-HT<sub>3C</sub>-, 5-HT<sub>3D</sub>- und 5-HT<sub>3E</sub>-Untereinheiten hinweisen, wurden bereits gefunden, aber bisher noch nicht charakterisiert<sup>[15]</sup>. Der 5-HT<sub>3</sub>-Rezeptor wird durch Bindung von einem oder mehreren Serotoninmolekülen aktiviert. Der genaue Mechanismus der Kanalaktivierung ist bisher nicht bekannt, da die Struktur des Rezeptors noch nicht vollständig aufgeklärt werden konnte<sup>[16]</sup>.

## Lokalisation

5-HT<sub>3</sub>-Rezeptoren sind auf peripheren und zentralen Neuronen, aber auch auf Monozyten, Lymphozyten, Makrophagen und intestinalen enterochromaffinen Zellen lokalisiert. Peripher befinden sich 5-HT<sub>3</sub>-Rezeptoren auf prä- und postganglionären Neuronen des autonomen Nervensystems und auf Neuronen des sensorischen und des enterischen Nervensystems. Im ZNS sind 5-HT<sub>3</sub>-Rezeptoren vor allem vom Cortex über Hippocampus, Nucleus accumbens, Amygdala, Substantia nigra bis zur ventralen tegmentalen Area nachgewiesen worden. Besonders hoch ist die Rezeptordichte im Hirnstamm und hier vor allem in Arealen, die mit dem Brechreflex assoziiert sind, wie Area postrema, Nucleus tractus solitarii und dorsaler Motorkern des Vagus. In den meisten Hirnarealen sind 5-HT<sub>3</sub>-Rezeptoren vorwiegend präsynaptisch lokalisiert, mit Ausnahme des Hippocampus, wo die Rezeptoren auf den somatodendritischen Zellen postsynaptisch zu finden sind<sup>[5, 17]</sup>. Bezüglich der Lokalisation der 5-HT<sub>3B</sub>-Rezeptor-Untereinheiten ist bemerkenswert, dass diese unter anderem in anatomischen Arealen vorkommen, die bei Arzneistoff-induzierter Emesis von Bedeutung sind. Eine kausale Verbindung zwischen heteromeren 5-HT<sub>3</sub>-Rezeptoren und der Wirkung von antiemetischen Pharmaka konnte aber bisher nicht nachgewiesen werden<sup>[12]</sup>.

## Funktion

Die Aktivierung des 5-HT<sub>3</sub>-Rezeptors führt zu einem Natriuminflux, der eine rasche, kurze Depolarisation der Zelle bewirkt. Auf neuronaler Ebene bewirkt die Aktivierung präsynaptischer 5-HT<sub>3</sub>-Rezeptoren, gefolgt von einer raschen Depolarisation peripherer oder zentraler Neurone, einen schnellen Anstieg der zytosolischen Ca<sup>2+</sup>-Konzentration durch Induktion des Ca<sup>2+</sup>-Influsses und Mobilisierung von Calcium aus intrazellulären

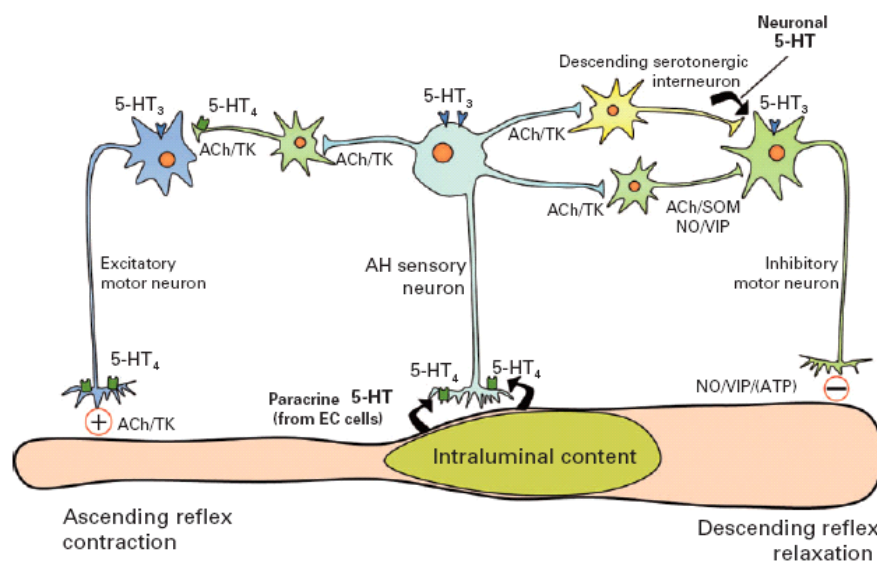
Speichern. Auf Grund dessen kommt es zur Freisetzung unterschiedlicher Neurotransmitter und Neuropeptide wie Dopamin, Cholecystokinin, Acetylcholin, GABA, Substanz P oder Serotonin selbst. Postsynaptische Aktivierung führt zur Depolarisation durch Natriuminflux und Kaliumefflux<sup>[17]</sup>. Die bisher geklärten Funktionen beschränken sich auf die Entstehung von Angst und Emesis. An der Entstehung der Emesis sind vor allem die in der Area postrema lokalisierten 5-HT<sub>3</sub>-Rezeptoren beteiligt; eventuell spielen auch Kontraktionen der glatten Muskulatur des Magen-Darm-Traktes hier eine Rolle<sup>[18]</sup>. 5-HT<sub>3</sub>-Rezeptoren sind an der Informationsweiterleitung im Gastrointestinaltrakt beteiligt und spielen eine bedeutende Rolle im ENS, wo sie Darmmotilität und Peristaltik regulieren<sup>[15]</sup>. Des Weiteren wurde beschrieben, dass die Aktivierung von 5-HT<sub>3</sub>-Rezeptoren an peripheren Afferenzen durch Weiterleitung der Signale zur Nozizeption führt<sup>[17, 19]</sup>. Die Stimulation von spinalen 5-HT<sub>3</sub>-Rezeptoren im Dorsalhorn führt dagegen durch Aktivierung des absteigenden schmerzhemmenden Systems zu antinozizeptiven Effekten in Schmerzmodellen<sup>[17]</sup>.

#### 1.1.4 Serotonin im Gastrointestinaltrakt

Serotonin spielt im enterischen Nervensystem sowohl als Neurotransmitter als auch als parakrines Signalmolekül eine wichtige Rolle<sup>[20]</sup>. 90 % des im GI-Trakt enthaltenen Serotonins sind in den enterochromaffinen (EC-) Zellen und 10 % in Neuronen des enterischen Nervensystems (ENS) enthalten. Beide Systeme sind imstande, Serotonin zu synthetisieren und zu speichern. Da im gastrointestinalen Lumen und der epithelialen Oberfläche keine Nervenendigungen lokalisiert sind, agieren die EC-Zellen als Signalüberträger. Sie geben vorwiegend an ihrer basolateralen Oberfläche konstitutiv schon viel, bei aktivierenden Signalen wie z.B. Dehnungsreizen aber große Mengen an Serotonin in die Lamina propria ab. Von hier hat das sezernierte Serotonin Zugang zu den Nervenzellen. Das hohe Ausmaß der Serotoninausschüttung ist notwendig, damit genügend Neurotransmitter die innervierten Areale erreicht. Da es sich bei Serotonin um eine Substanz mit teilweise negativen Effekten handelt, muss die Menge an Serotonin im Gewebe in tolerablen Grenzen gehalten werden. Abbauende Enzyme wie die MAO sind nur intrazellulär lokalisiert. Genau wie im ZNS exprimieren die enterischen Neurone und Enterozyten spezifische Serotonin-Wiederaufnahmetransporter (SERT = Serotonin-Reuptake-Transporter), die mit hoher Affinität und Na<sup>+</sup>-abhängig 5-HT durch die serotonergen Axonmembranen bzw. Zellmembranen transportieren. Dieser Transport wird durch Fluoxetin (Selektiver Serotonin Reuptake Inhibitor) und trizyklische Antidepressiva gehemmt, wodurch gastrointestinale Nebenwirkungen dieser Stoffklassen erklärt werden können<sup>[20-22]</sup>.



Serotonin induziert langsame erregende postsynaptische Potentiale (sog. slow EPSPs = excitatory postsynaptic potentials) in enterischen Neuronen und spielt auch eine untergeordnete Rolle als Transmitter bei schnellen EPSPs. Serotonin aktiviert sowohl intrinsische exzitatorische als auch inhibitorische enterische Neurone. Die Stimulierung von aufsteigenden cholinergen Neuronen mit resultierender Acetylcholin- und Substanz P-Ausschüttung führt zur Kontraktion der glatten Muskulatur. Andererseits kann die Aktivierung inhibitorischer absteigender Neurone zur NO-, VIP- und ATP-Freisetzung und damit zur Relaxation glatter Muskelzellen führen (siehe Abb. 1.3). Der resultierende peristaltische Reflex bedingt den Transport des Darminhalts in oro-aboraler Richtung<sup>[23]</sup>.



**Abb. 1.3 Schematische Darstellung der Beteiligung von 5-HT<sub>3</sub>- und 5-HT<sub>4</sub>-Rezeptoren an der Darm-Peristaltik**

Darstellung nach Tonini und Pace<sup>[24]</sup>; (AH = after hyperpolarisation; TK = Tachykinin; SOM = Somatostatin; EC = enterochromaffin).

Serotonin wirkt durch Aktivierung von sekretorischen Neuronen und Enterozyten prosekretorisch und ist über die Aktivierung extrinsischer sensorischer Neurone und vagaler Afferenzen an der Entstehung von Übelkeit und Schmerz beteiligt<sup>[20, 25, 26]</sup>.

### Funktion wichtiger Serotoninrezeptoren im ENS

Die vielfältigen Effekte des Serotonins im Gastrointestinaltrakt können nur durch Besetzung unterschiedlicher Serotoninrezeptoren vermittelt werden. Die im Magen-Darm-Trakt am meisten untersuchten Rezeptoren sind 5-HT<sub>1</sub>-, 5-HT<sub>2</sub>-, 5-HT<sub>3</sub>- und 5-HT<sub>4</sub>-Rezeptor-Subtypen. Neben diesen sind auch 5-HT<sub>1P</sub>- und 5-HT<sub>7</sub>-Rezeptoren im Gastro-

intestinaltrakt lokalisiert<sup>[24]</sup>. Die Funktionen dieser Rezeptoren werden im Folgenden erläutert.

Das ZNS benötigt zur Steuerung periphere Sensoren, die über dorsale und craniale Nervenzellen Informationen an das Gehirn weitergeben. Im ENS übernehmen sogenannte intrinsische primäre afferente Neurone (IPANs) diese Funktion. IPANs übertragen Informationen von Sensoren wie den EC-Zellen sowohl zum Plexus submucosus als auch zum Plexus myentericus. Erhöht sich der intraluminale Druck, wird Serotonin aus EC-Zellen freigesetzt. Durch Stimulation von 5-HT<sub>1P</sub>-Rezeptoren werden submucosale IPANs aktiviert, aus denen vor allem ACh und CGRP freigesetzt werden. Dies initiiert vor allem die langsamen EPSPs. Eine therapeutische Anwendung von 5-HT<sub>1P</sub>-Rezeptor-Agonisten oder 5-HT<sub>1P</sub>-Rezeptor-Antagonisten wird aufgrund der Gefahr von lebensbedrohlichen Diarrhöen bzw. Darmverschlüssen kritisch betrachtet<sup>[20-22]</sup>. Eine weitere Rolle kommt im ENS den 5-HT<sub>4</sub>-Rezeptoren zu. 5-HT<sub>4</sub>-Rezeptoren sind auf EC-Zellen, Enterozyten, glatten Muskelzellen und präsynaptisch auf Neuronen des ENS und ZNS lokalisiert<sup>[26]</sup>. Die Aktivierung von 5-HT<sub>4</sub>-Rezeptoren im Intestinum erhöht die Freisetzung von ACh aus myenterischen und von ACh und CGRP aus submucosalen IPANs. Eine Aktivierung von 5-HT<sub>4</sub>-Rezeptoren resultiert in einer Verstärkung der 5-HT<sub>1P</sub>-Rezeptor-induzierten Reflexe und damit einem prokinetischen Effekt. 5-HT<sub>4</sub>-Rezeptor-Agonisten sind aber nicht wie 5-HT<sub>1P</sub>-Rezeptor-Agonisten imstande, peristaltische und sekretorische Reflexe auszulösen oder Nozizeptoren zu aktivieren, wodurch sie therapeutisch als Prokinetika anwendbar sind<sup>[21, 22]</sup>. Die Stimulierung von 5-HT<sub>2A</sub>-Rezeptoren auf der glatten Muskulatur führt am Ileum des Meerschweinchens zu einer Kontraktion<sup>[10]</sup>, während ebenfalls auf der glatten Muskulatur lokalisierte 5-HT<sub>7</sub>-Rezeptoren am Meerschweinchenileum eine Relaxation bewirken<sup>[27]</sup>.

5-HT<sub>3</sub>-Rezeptoren befinden sich auf den EC-Zellen des Darms und den sensorischen Afferenzen des ENS. Durch ihre Aktivierung werden schnelle exzitatorische Potentiale an den Neuronen des Plexus myentericus induziert und es kommt zur Flüssigkeits- und Elektrolytsekretion ins Intestinum. Hieraus resultiert eine Verkürzung der gastrointestinalen Transitzeit<sup>[5]</sup>. Obwohl das ENS autonom funktionieren könnte, gibt es Verbindungen zwischen ENS und ZNS, die aus extrinsischen vagalen und spinalen Afferenzen bestehen. Die neuronale Aktivierung dieser Afferenzen erfolgt vor allem durch 5-HT<sub>3</sub>-Rezeptoren, die somit an Emetogenese und Weiterleitung der Nozizeption beteiligt sind<sup>[22, 26]</sup>.

## 1.2 5-HT<sub>3</sub>-Rezeptor-assoziierte Erkrankungen

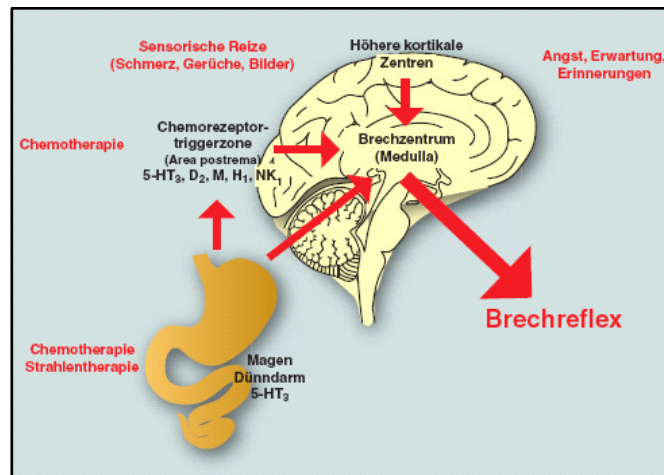
### 1.2.1 Übelkeit und Erbrechen

#### Pathophysiologie

Der Brechreflex ist ein wichtiger Abwehrmechanismus, der den Organismus vor dem Einfluss toxischer Substanzen schützen soll. Für die Auslösung des Brechreflexes sind anatomisch drei Systeme von Bedeutung: das Brechzentrum im Stammhirn, die Area postrema (Chemorezeptor-Trigger-Zone) am Boden des IV. Ventrikels und viszerale afferente Neurone aus dem Gastrointestinaltrakt. Das Brechzentrum selbst ist kein anatomisch abgegrenztes Gebiet, sondern in vielen Arealen verstreut und erhält Signale aus dem Magen-Darm-Trakt, von intrakraniellen Druckrezeptoren, dem Cortex, dem vestibulären Labyrinth und der Area postrema. Die Area postrema ist sowohl über den Liquor als auch über das Blut zu erreichen, da sie außerhalb der Blut-Hirn-Schranke liegt. Bei entsprechenden Signalen im GI-Trakt leiten die afferenten Bahnen des N. vagus und des N. splanchnicus diese entweder direkt oder indirekt über die Area postrema ins Brechzentrum. Über Erregung sympathovagaler und motorischer Kerngebiete kommt es dann zu vegetativen Reaktionen wie Kaltschweißigkeit, Speichelbildung und perioraler Blässe. Durch Anspannung der Bauchmuskulatur und des Zwerchfells, Glottisschluss und Entspannung des unteren Ösophagus sphinkters wird letztendlich der Brechreflex ausgelöst<sup>[28-32]</sup>. Das Erbrechen ist ein vegetativer Reflex, welcher zum Beispiel durch Reizung der hinteren Rachenwand auch ohne vorherige Übelkeit ausgelöst werden kann. Im Gegensatz dazu setzt Übelkeit kortikales Bewusstsein voraus und stellt somit ein anderes Phänomen dar<sup>[32]</sup>.

#### Chemotherapie-induzierte Übelkeit und Erbrechen (CINV)

Patienten in der Onkologie sind besonders anfällig für das Auftreten von Übelkeit und Erbrechen. Dies kann durch Tumoren oder Metastasen in Leber und Gehirn, aber auch durch andere Auslöser wie Analgetika, Antiinfektiva, Strahlentherapie und Kachexie bedingt sein. In besonderem Ausmaß leiden Patienten bei Anwendung einer Chemotherapie an Übelkeit und Erbrechen. Es handelt sich hierbei zwar nicht um die gefährlichste unerwünschte Wirkung, für die Betroffenen aber ist sie sehr belastend und führt zu einem zusätzlichen Verlust der Lebensqualität<sup>[29]</sup>. Faktoren, die ein Auftreten des CINV (chemotherapy induced nausea and vomiting) induzieren oder begünstigen, sind in Abb. 1.4 übersichtlich dargestellt.



**Abb. 1.4** Auslösende Faktoren für CINV nach Nemeč (2006)<sup>[29]</sup>

Bei der Verabreichung von Zytostatika kommt es zur Zerstörung von enterochromaffinen Zellen im Gastrointestinaltrakt und damit zur massiven Freisetzung von Serotonin. Über die darauf folgende Aktivierung von 5-HT<sub>3</sub>-Rezeptoren an den vagalen afferenten Neuronen wird das Signal an das Brechzentrum geleitet und die Chemorezeptor-Trigger-Zone aktiviert. Gleichzeitig kommt es auch in der Area postrema zu einer lokalen Freisetzung von Serotonin. Beide Effekte führen zur Auslösung des Brechreflexes. Sowohl peripher als auch zentral lokalisierte 5-HT<sub>3</sub>-Rezeptoren spielen dabei eine zentrale Rolle. Die Chemorezeptor-Trigger-Zone ist sowohl durch Chemo- als auch durch neurogene Reize und damit auch durch Zytostatika selbst stimulierbar. Durch die zytotoxischen Substanzen werden Transmitter wie Serotonin, Dopamin, Substanz P, ACh und Histamin freigesetzt, die zu Übelkeit und Erbrechen führen. Getriggert wird das Erbrechen auch durch sensorische Reize wie Schmerz und Gerüche sowie durch Emotionen wie Angst und negative Erwartungshaltung<sup>[12, 29, 30]</sup>.

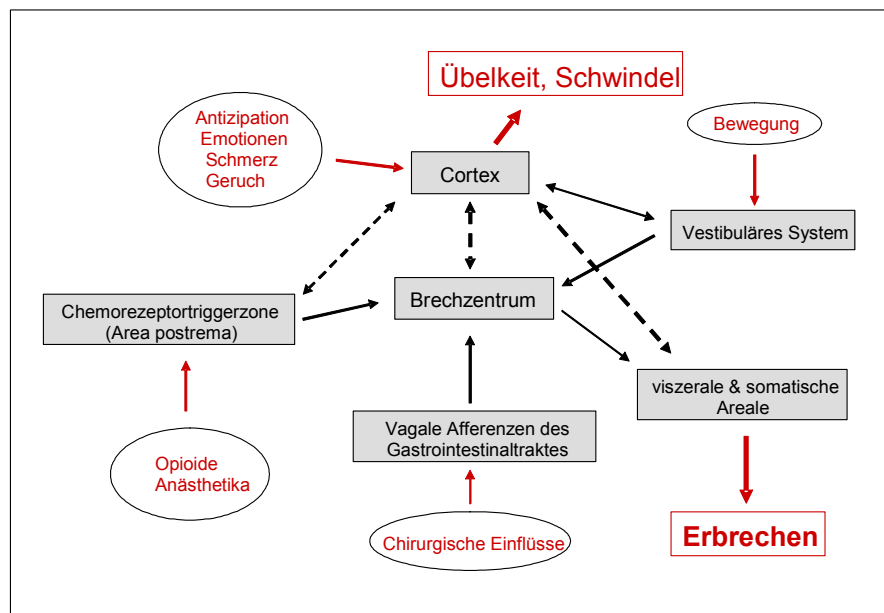
### Therapie mit 5-HT<sub>3</sub>-Rezeptor-Antagonisten und ihre Grenzen

In der Therapie des akuten CINV bei moderater bis hoch emetogener Chemotherapie ist die Behandlung mit 5-HT<sub>3</sub>-Rezeptor-Antagonisten der Goldstandard. Sie werden je nach emetogenem Risiko in Kombination mit Corticosteroiden und NK-1-Rezeptor-Antagonisten angewendet<sup>[33, 34]</sup>. Allerdings sind 5-HT<sub>3</sub>-Rezeptor-Antagonisten unwirksam in der Therapie der antizipatorischen Emesis und wenig effektiv bei Auftreten der verzögerten Emesis-Form<sup>[31]</sup>. Dies kann zumindest für die Cisplatin-Therapie dadurch erklärt werden, dass das CINV biphasisch verläuft. Die akute Reaktion, die 1–3 h nach Zytostatika-Gabe einsetzt, wird vor allem durch die Ausschüttung von Serotonin vermittelt. Dies wurde durch Untersuchungen der Konzentration des Serotonin-Metaboliten 5-HIAA im Urin nach Cisplatin-Gabe bestätigt. Während der ersten 12 h nach Cisplatin-Gabe ist

die 5-HIAA-Konzentration stark erhöht; nach 24 h erreicht sie wieder Normalwerte<sup>[35]</sup>. Die verzögerte Form des CINV, die nach mehr als 24 h nach Zytostatika-Gabe auftritt, ist bedingt durch Ausschüttung von Substanz P, Histamin, Dopamin und ACh<sup>[29]</sup>. Bei anderen hoch-emetogenen Therapien ist die Symptomatik von Übelkeit und Erbrechen monophasisch<sup>[29]</sup>. Aufgrund der 5-HT<sub>3</sub>-Rezeptorkanal-antagonistischen Wirkung von Ingwerextrakten wird auch der Einsatz dieses pflanzlichen Arzneimittels in der Therapie des CINV diskutiert. Die Studienlage wird in Kapitel 1.3.4 beschrieben.

### **Postoperative Übelkeit und Erbrechen (PONV)**

Die Inzidenz für postoperative Nausea und Emesis liegt bei 25–30 %. Die Symptome sind in der Regel vorübergehend und nur in sehr seltenen Fällen mit ernsthaften Komplikationen verbunden. Allerdings wird das PONV (postoperative nausea and vomiting) von den Patienten mindestens als gleich belastend empfunden wie postoperative Schmerzen. Im Gegensatz zum CINV ist die Pathophysiologie des PONV kaum geklärt. Abb. 1.5 zeigt mehrere Hypothesen zur Pathophysiologie und veranschaulicht die Komplexität dieser Form der Nausea und Emesis.



**Abb. 1.5 Hypothetisches Modell der Pathophysiologie der postoperativen Nausea und Erbrechen**

Noch nicht eindeutig bewiesene Verbindungen sind durch gestrichelte Pfeile gekennzeichnet.

Cortex und Brechzentrum werden vermutlich durch mehrere extrinsische Faktoren stimuliert. Durch chirurgische Eingriffe, eventuell verbunden mit der Freisetzung von Transmittern wie Serotonin, werden vagale Afferenzen erregt, die die Signale ans

Brechzentrum leiten<sup>[36]</sup>. Des Weiteren könnte auch eine vermehrte Freisetzung von Catecholaminen durch Ketamin und eventuell auch durch Lachgas zur Übelkeit führen. Neben der Anästhesie als Hauptgrund spielt aber auch das Auftreten eines postoperativen Ileus für die Entstehung des PONV eine Rolle. Es handelt sich hierbei um eine vorübergehende Hemmung des gastrointestinalen Transports, bedingt durch perioperative Catecholaminausschüttung, Opioidenfluss, Sympathikusaktivierung und Freisetzung von Mediatoren wie CGRP, NO, VIP und Substanz P. Dieser Ileus kann auch von einer Entzündung der Darmwand begleitet sein<sup>[37]</sup>.

### **Bedeutung der Therapie mit 5-HT<sub>3</sub>-Rezeptor-Antagonisten beim PONV**

Die Therapie der postoperativen Übelkeit und des Erbrechens wird meist bei Bedarf durchgeführt. 5-HT<sub>3</sub>-Rezeptor-Antagonisten gehören aufgrund ihres günstigen Nebenwirkungsprofils zu den am häufigsten eingesetzten Antiemetika. Im Vergleich zur CINV sind zur Behandlung der PONV geringere Dosen notwendig. Dies bestätigt die Annahme, dass Serotonin bei der Pathophysiologie der PONV eine geringere Rolle spielt. Als klassische Antiemetika werden außerdem Metoclopramid und Droperidol (zentrale D<sub>2</sub>-Rezeptor-Antagonisten), Dimenhydrinat als H<sub>1</sub>-Rezeptor-Antagonist und Dexamethason eingesetzt. Selten kommen auch Triflupromazin, Scopolamin, Midazolam oder nicht-medikamentöse Maßnahmen wie Akupunktur, Laserstimulation und Akupressur zum Einsatz<sup>[32, 36-38]</sup>.

### **Kinetosen / Reiseübelkeit**

Bedingt durch die modernen Fortbewegungsmittel und Fortschritte in der Computerindustrie ist der Alltag mit einer steigenden Bewegungskomplexität verbunden. Das Risiko für das Auftreten von Schwindel, Übelkeit und Erbrechen, eventuell in Verbindung mit Kopfschmerzen, Blässe und Schweißausbrüchen wird begünstigt. Dieser als Kinetose bezeichnete Symptomenkomplex entsteht dadurch, dass von verschiedenen Sensoren wie Auge und Vestibularapparat diskordante Informationen zum ZNS gelangen. Über den Hypothalamus werden die vegetativen Reaktionen ausgelöst<sup>[39]</sup>. Viele Neurotransmitter sind an den vestibulären Vorgängen beteiligt. In den Vestibularkernen agiert vor allem Glutamat an exzitatorischen Aminosäurerezeptoren wie AMPA-Rezeptoren ( $\alpha$ -Amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazol-Propionsäure-Rezeptor). Neben AMPA-Rezeptoren wurden auch NMDA- und metabotrope Rezeptoren in den Vestibularkernen gefunden. ACh ist in primären Afferenzen der Vestibularkerne lokalisiert. In Studien an Katzen führte die Verabreichung von ACh zu einer Stimulation der Vestibularnerven. Eine weitere regulatorische Substanz in den Vestibularkernen ist Histamin. Sowohl H<sub>1</sub>- als auch H<sub>2</sub>-Rezeptoren sind in den Vestibularkernen lokalisiert.

Inhibitorische Einflüsse werden in den Vestibularkernen durch GABA über Interaktion mit GABA<sub>A</sub>- und GABA<sub>B</sub>-Rezeptoren vermittelt. In einigen vestibulären Afferenzen wurden NK<sub>1</sub>-Rezeptoren gefunden, wobei die Funktion von Substanz P im Vestibularapparat noch ungeklärt ist. Außerdem sind weitere Rezeptoren wie D<sub>2</sub>-, 5-HT<sub>1A</sub>- und 5-HT<sub>2</sub>-, α<sub>2</sub>- und β<sub>1</sub>-Rezeptoren in den Vestibularkernen lokalisiert<sup>[40]</sup>. Der 5-HT<sub>3</sub>-Rezeptor spielt in der Pathophysiologie dieser Art von Übelkeit nach heutigem Wissensstand nur eine geringe oder keine Rolle.

### **Bedeutung der Therapie mit 5-HT<sub>3</sub>-Rezeptor-Antagonisten bei Kinetosen**

Weder D<sub>2</sub>-, noch 5-HT<sub>3</sub>-Rezeptor-Antagonisten sind in der Therapie der Kinetosen effektiv<sup>[40, 41]</sup>. Zur Behandlung eingesetzte Arzneistoffgruppen sind dagegen Antihistaminika (z.B. Dimenhydrinat), Anticholinergika (Scopolamin TTS-Pflaster), Benzodiazepine, Neuroleptika, Sympathomimetika (Amphetamin, Ephedrin), Calcium-Kanal-Modulatoren (Cinnarizin, Flunarizin) und Phenytoin. Betahistin kann, prophylaktisch angewendet, die Reizschwelle erhöhen oder die Wiederadaptation verkürzen<sup>[42]</sup>. Das Ingwerpräparat Zintona<sup>®</sup> ist außerdem als pflanzliches Präparat zur Behandlung von Kinetosen einsetzbar. Ob die antagonistische Wirkung der Ingwerinhaltsstoffe am 5-HT<sub>3</sub>-Rezeptorkanal für die Wirksamkeit verantwortlich ist oder ob hier andere Mechanismen eine Rolle spielen, ist bisher nicht geklärt. Die Studienlage zur Anwendung von Ingwer bei Kinetosen wird in Kapitel 1.3.4 erörtert.

### **Übelkeit und Erbrechen in der Schwangerschaft**

Beschwerden wie Übelkeit und Erbrechen in der Schwangerschaft belasten in den westlichen Industrieländern 50–90 % der Schwangeren. Eine Emesis gravidarum tritt bei einem Drittel der Schwangerschaften auf, während sich die für Mutter und Fötus lebensbedrohliche Hyperemesis gravidarum bei etwa 0,3–2 % manifestiert. Die unkomplizierte Emesis gravidarum äußert sich meist als morgendliche Übelkeit, ist normalerweise auf die ersten 20 Schwangerschaftswochen limitiert und harmlos. Die Pathophysiologie ist bis heute nicht geklärt. Unterschiedliche, während der Schwangerschaft gebildete Hormone (z.B. HCG, Estrogen und Progesteron) werden als Auslöser diskutiert. Außerdem könnten Effekte von TSH, Infektionen mit *Helicobacter pylori*, genetische und psychosoziale Einflüsse an der Entstehung des Schwangerschaftserbrechens beteiligt sein<sup>[38, 43, 44]</sup>. Auch gastrointestinale Auslöser wie eingeschränkte Magen-Darm-Motilität oder Unregelmäßigkeiten in der Peristaltik werden diskutiert<sup>[38]</sup>. Eine Beteiligung von Serotonin in der Pathophysiologie wurde bisher nicht festgestellt. Sowohl bei schwangerschaftsbedingtem Erbrechen<sup>[35]</sup> als auch bei der Hyperemesis

gravidarum<sup>[45]</sup> waren keine erhöhten Konzentrationen des Serotonin-Metaboliten 5-HIAA im Harn messbar.

### **Bedeutung der Therapie mit 5-HT<sub>3</sub>-Rezeptor-Antagonisten bei Schwangerschaftserbrechen**

Leichte Formen der schwangerschaftsbedingten Übelkeit sind häufig durch Änderung der Ernährungsgewohnheiten, Akupressur und seelische Unterstützung zu mildern. Als Alternative oder Ergänzung zur medikamentösen Therapie wird Ingwer, angewendet als Tee, ganze Droge oder in Ginger Ale, empfohlen. Auch Kapseln mit Ingwerextrakt sind erhältlich. Im Rahmen dieser Arbeit wird auf die Studienlage zum Einsatz von Ingwer in Kapitel 1.3.4 eingegangen. Erfolgt auf diese Maßnahmen keine Besserung, bleibt nur die medikamentöse Therapie (Antihistaminika, Metoclopramid, Phenothiazine, Vitamin B<sub>6</sub>). Die Datenlage zur Anwendung von 5-HT<sub>3</sub>-Rezeptor-Antagonisten ist begrenzt. In Einzelfällen konnte jedoch bei Hyperemesis gravidarum nach Versagen konventioneller Therapiemethoden eine gute Wirksamkeit von 5-HT<sub>3</sub>-Rezeptor-Antagonisten beobachtet werden. Dabei traten bei Mutter und Fötus keine unerwünschten Nebenwirkungen auf<sup>[46, 47]</sup>. Eine prospektive, doppelblinde Studie mit 30 schwangeren Frauen führte zu dem Ergebnis, dass Ondansetron dem Phenothiazin Promethazin therapeutisch nicht überlegen, aber ähnlich effektiv ist<sup>[48]</sup>. Diese kleinen Studien oder Einzelfälle geben nicht genügend Sicherheit bezüglich der Teratogenität. In Studien an trächtigen Ratten und Kaninchen traten bei intravenös verabreichten Dosen bis 4 mg/kg Ondansetron pro Tag keine teratogenen Effekte auf<sup>[49]</sup>.



## 1.2.2 Reizdarmsyndrom

### Pathophysiologie

Das Reizdarmsyndrom (RDS) ist durch abdominelle Schmerzen und abdominelles Unbehagen mit veränderten Stuhlgewohnheiten charakterisiert, die nicht durch mechanische, biochemische oder inflammatorische Ursachen erklärbar sind. Zur Diagnose dienen die international anerkannten Rome-II-Kriterien. Man unterteilt das RDS je nach dominierenden Symptomen in drei Gruppen: Das diarrhöbetonte RDS (D-RDS), das obstipationsbetonte RDS (O-RDS) und das schmerzbetonte RDS. Die Pathophysiologie ist bisher kaum geklärt. Verschiedene Pathomechanismen wie gastrointestinale Motilitätsstörungen, Störungen der viszeralen Sensibilität und psychosomatische Störungen scheinen eine Rolle zu spielen<sup>[50]</sup>. Die gestörte viszerale Sensibilität äußert sich durch erhöhtes Schmerzempfinden betroffener Patienten auf Druckreize im Dickdarm<sup>[51]</sup> und verstärktes Empfinden von Kontraktionen<sup>[52]</sup> und Gasbildung<sup>[53]</sup>. Mit Ösophagus<sup>[54]</sup>, Magen<sup>[55]</sup>, Duodenum<sup>[56]</sup> und Ileum<sup>[57]</sup> ist bei RDS-Patienten der gesamte GI-Trakt von der viszeralen Hypersensibilität betroffen. Serotonin spielt möglicherweise in diesem Zusammenhang eine Rolle. Die viszerale Sensibilität wird zu einem Teil über serotonerge Stimulationen von intrinsischen und extrinsischen Neuronen des ENS (unter Beteiligung von 5-HT<sub>3</sub>-Rezeptoren) vermittelt. Eine Funktion von 5-HT<sub>3</sub>-Rezeptoren an der viszeralen Sensibilität konnte durch Untersuchung der Expression des „immediate early genes“ *c-fos* belegt werden. Dieses wird in bestimmten Arealen innerhalb des Dorsalhorns nach viszeraler Stimulation exprimiert, so dass es als Marker für die neuronale Aktivierung nach viszeraler Nozizeption herangezogen werden kann. Kozlowski *et al.* zeigten 2000, dass der 5-HT<sub>3</sub>-Rezeptor-Antagonist Alosetron an narkotisierten Ratten die spinale *c-fos*-Expression nach kolorektaler Distension konzentrationsabhängig inhibiert<sup>[58]</sup>.

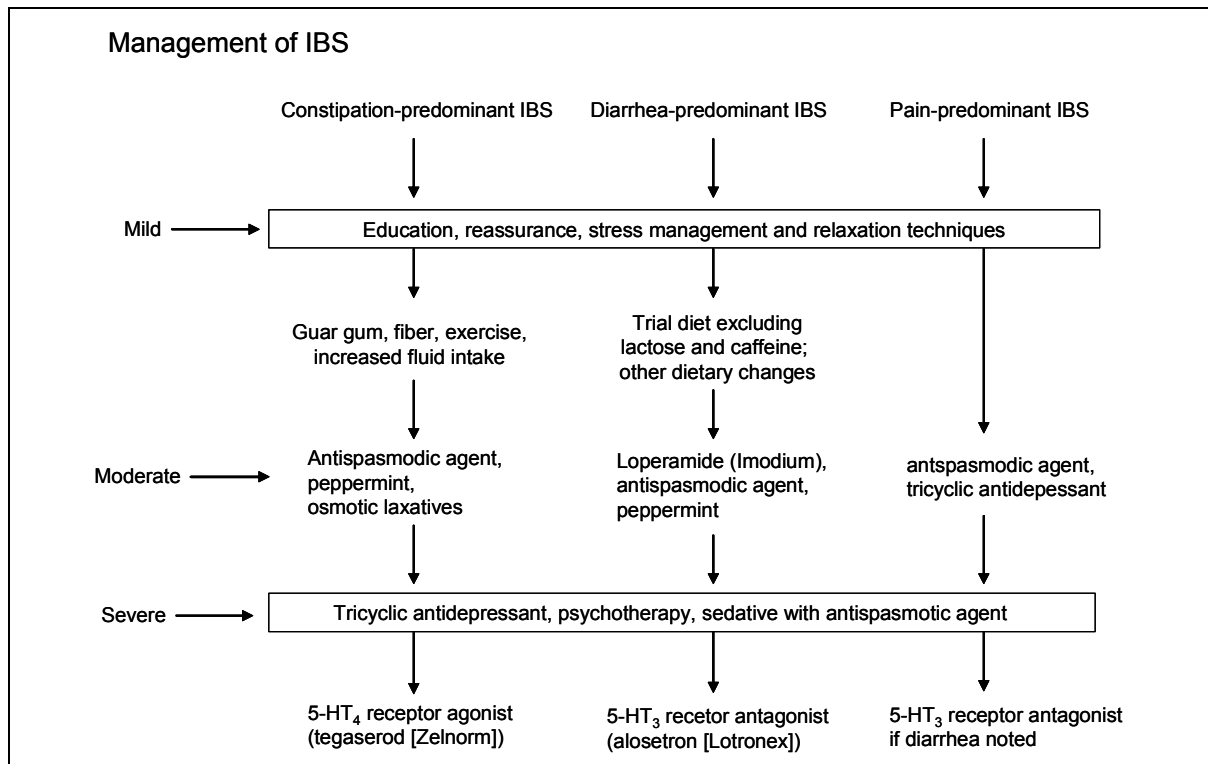
In Studien konnte belegt werden, dass der Serotonin-Stoffwechsel bei RDS-Patienten verändert ist. So zeigten einige Studien, dass Synthese, Freisetzung und Wiederaufnahme von Serotonin bei RDS-Patienten verändert sind. Vermutlich führt ein Überschuss an Serotonin zu Diarrhö, während verminderte Serotoninspiegel obstipierende Effekte haben. Bei Patienten mit D-RDS wurde eine statistisch signifikant erhöhte Anzahl an EC-Zellen gefunden, was in einer erhöhten Serotoninfreisetzung resultiert<sup>[24]</sup>. Dies konnte in einer anderen Studie nicht bestätigt werden<sup>[59]</sup>. Bei der Bestimmung von Plasmaserotonin vor und nach Nahrungsaufnahme konnte gezeigt werden, dass Patienten mit D-RDS unter beiden Bedingungen einen signifikant höheren 5-HT-Spiegel aufweisen als die Kontrollgruppe. O-RDS-Patienten zeigten kaum oder keine veränderten Serotoninspiegel<sup>[60, 61]</sup>. Nur Patienten mit O-RDS, nicht aber mit D-RDS, wiesen einen erhöhten Serotoningehalt in Thrombozyten auf. Dies führt zu der Annahme,

dass D-RDS durch eine verminderte Serotoninaufnahme und O-RDS durch eine verminderte Serotoninfreisetzung bedingt sein könnte<sup>[61]</sup>. Außerdem wurde in rektalen Biopsieproben sowohl von O-RDS- als auch von D-RDS-Patienten eine signifikante Verminderung an mucosalen Serotoninkonzentrationen, Tryptophanhydroxylase 1-mRNA, SERT-mRNA und SERT-Immunoreaktivität nachgewiesen<sup>[59]</sup>. Eine Verminderung der SERT wurde sowohl bei D-RDS- als auch bei O-RDS-Patienten gefunden. Dies stellt die Hypothese, dass ein Überschuss an Serotonin mit Diarrhö verbunden ist, wiederum in Frage. Im Tiermodell an SERT-knockout-Mäusen wurde jedoch ebenso beobachtet, dass die Tiere unregelmäßig alternierend an Diarrhö und Obstipation litten<sup>[62]</sup>. Die Autoren vermuten, dass die gesteigerte Motilität und Diarrhö aufgrund der größeren Serotoninmenge durch Potenzierung der peristaltischen Reflexe ausgelöst wird. Aufgrund der Überstimulierung kommt es zu einer Desensibilisierung der 5-HT-Rezeptoren, die das vorübergehende Auftreten von Obstipation erklärt. An der Regulation von gastro-intestinaler Sekretion und Motilität sind besonders 5-HT<sub>3</sub>- und 5-HT<sub>4</sub>-Rezeptoren beteiligt<sup>[26]</sup>.

### **Bedeutung der Therapie mit 5-HT<sub>3</sub>-Rezeptor-Antagonisten bei RDS**

5-HT<sub>3</sub>-Rezeptor-Antagonisten sind effektiv in der Behandlung des diarrhöbetonten Reizdarmsyndroms. Der in den USA zur Behandlung des RDS zugelassene 5-HT<sub>3</sub>-Rezeptor-Antagonist Alosetron verlangsamt den Darmtransit, erhöht die Flüssigkeitsabsorption und verringert die viszerale Schmerzen. Auch für Ondansetron und Granisetron sind positive Effekte auf die Entwicklung des Krankheitsbildes beschrieben worden<sup>[23]</sup>, die Zulassung für die Indikation RDS haben sie jedoch nicht. Als unerwünschte Wirkung kann bei Einnahme von 5-HT<sub>3</sub>-Rezeptor-Antagonisten aufgrund der Inhibierung 5-HT<sub>3</sub>-Rezeptor-induzierter Effekte innerhalb des ENS Obstipation eintreten. Die Anwendung ist somit auf die diarrhöbetonte RDS-Form beschränkt. Alosetron musste in den USA 2002 vorübergehend aus dem Handel genommen werden, da Fälle von schwerer Obstipation, ischämischer Colitis und sogar Todesfälle aufgetreten waren. Derzeit wird es nur nach strenger Indikationsstellung angewendet. Auch der in den USA und Kanada zur RDS-Behandlung eingesetzte 5-HT<sub>4</sub>-Rezeptor-Agonist Tegaserod wurde 2007 wegen seltener, aber schwerer kardiovaskulärer Nebenwirkungen vom Markt genommen. Eventuell könnte die Kombination von 5-HT<sub>3</sub>-Rezeptor-Antagonisten mit 5-HT<sub>4</sub>-Rezeptor-Agonisten Erfolg bringen<sup>[12]</sup>. Allerdings wurde auch der unselektive 5-HT<sub>3</sub>-Antagonist/5-HT<sub>4</sub>-Agonist Cisaprid wegen Induktion ventrikulärer Arrhythmien und Todesfälle im Jahr 2000 in vielen europäischen Ländern aus dem Handel genommen. Mit Renzaprid und Cilansetron befinden sich weitere Derivate in der klinischen Entwicklung<sup>[63]</sup>. Die Entwicklung von wirksamen Serotoninrezeptor-Modulatoren mit günstigem Nebenwirkungsprofil erweist sich somit als schwierig. Abb. 1.6 zeigt eine Übersicht der

Therapieoptionen bei unterschiedlichen RDS-Formen. Gerade weil die Erforschung klar definierter Wirkstoffe mit gutem Nebenwirkungsprofil problematisch verläuft, sind pflanzliche Arzneimittel für die RDS-Therapie von großer Bedeutung. Pfefferminze bzw. Pfefferminzöl ist in der Behandlung der moderaten Form des D-RDS und des O-RDS ein anerkanntes Adjuvans.



**Abb. 1.6 Algorithmus zur RDS-Therapie**

Entnommen aus Hadley und Gaarder (2005)<sup>[64]</sup>; Tegaserod ist derzeit nicht im Handel; (IBS = irritable bowel syndrome).

Die Studienlage zur Anwendung von Pfefferminzöl wird in Kapitel 1.4.4 diskutiert.

## 1.3 Ingwer

### 1.3.1 Botanik und Vorkommen von *Zingiber officinale* ROSCOE



**Abb. 1.7** *Zingiber officinale* ROSCOE aus Köhler's Medizinal-Pflanzen<sup>[65]</sup>

Dargestellt sind die blühende Pflanze und sterile Scheinstengel; links neben der Pflanze: detaillierte Abbildungen der Blütenbestandteile; auf der rechten Seite: Quer- und Längsschnitt des Fruchtknotens.

#### Die Stammpflanze

Die Ingwerpflanze (*Zingiber officinale* ROSCOE) (Abb. 1.7) gehört zur Familie der Zingiberaceae und ist neben mehr als 50 weiteren Arten der Gattung *Zingiber* BOEHM. zugeordnet. Innerhalb dieser Gattung hat nur das Rhizom der Art *Z. officinale* ROSC. aufgrund seiner vielfältigen medizinischen Anwendungen Eingang in die Arzneibücher gefunden. Es ist das am gründlichsten untersuchte Pflanzenorgan dieser Gattung. Man unterscheidet innerhalb der Art *Z. officinale* ROSCOE zwei Varietäten: *Z. officinale* var. *macrorhizomum* MAKINO und *Z. officinale* var. *rubens* MAKINO. Die als Kintoki-Ingwer in Japan bekannte var. *rubens* MAKINO zeigt ein vom offizinellen Ingwer abweichendes Inhaltsstoffspektrum, vor allem wegen ihres Gehaltes an Diterpenlactonen (Galanolacton)<sup>[66]</sup>. Die Ingwerpflanze ist eine ausdauernde Staude mit einem kräftigen, fleischigen, horizontal im Boden kriechenden Wurzelstock. Dieser ist in knollenförmige

Abschnitte unterteilt und verzweigt sich in einer Ebene in Seitensprosse, die sich weiter verzweigen. Aus dem Wurzelstock treibt jährlich ein 1–2 m hoher steriler Scheinstengel, der aus umeinander gerollten Blattscheiden besteht. Neben diesem sprießen aus dem Rhizom blütentragende Sprosse, die bis zu 30 cm hoch wachsen und dicht mit scheidigen Blättern besetzt sind<sup>[67]</sup>. *Zingiber officinale* ROSCOE ist in Südostasien beheimatet. Das genaue Herkunftsland ist nicht bekannt. Der industriell verwendete Ingwer stammt ausschließlich aus Kulturen in Gebieten der Tropen, die der Pflanze günstige Wachstumsbedingungen wie hohe Temperaturen, Luftfeuchtigkeit und genügend Niederschläge bieten. Hauptanbaugebiete sind Indien, China, West-Malaysia und Nigeria. Ingwer wird außerdem in Australien, Jamaika und zahlreichen weiteren Staaten mit entsprechendem Klima angebaut<sup>[66, 68]</sup>.

## Die Droge

*Zingiberis rhizoma* ist weltweit offizinell. Die klassische Droge für pharmazeutische Zwecke ist der getrocknete Ingwerwurzelstock. Als Arzneibuchware wird geschälter oder ungeschälter, ungebleichter Ingwer (bevorzugt die Jamaika-Provenienz) gefordert. Die Droge (siehe Abb. 1.8) besteht aus dem in nur einer Ebene sympodial verzweigten, seitlich flachgedrückten Rhizom mit quer verlaufender Segmentierung. An den Abbruchstellen hinterlassen die Sprosse vertiefte Stängelnarben. Aus den Bruchflächen ragen kurze steife Leitbündelfragmente heraus<sup>[66]</sup>.



**Abb. 1.8** *Zingiberis rhizoma* (Ingwerwurzelstock)

Der Geschmack wird als aromatisch, mehr oder weniger scharf und leicht bitter charakterisiert. Der Geruch ist aromatisch und enthält bei indischer, chinesischer und australischer Ware eine zitronige Note<sup>[69]</sup>. Das Präparat Zintona<sup>®</sup> enthält die pulverisierte Droge<sup>[68]</sup>.

## Ernte und Weiterverarbeitung

In tropischen Gebieten wird Ingwer mit Beginn der Frühjahrsregenfälle und in Australien auf bewässerten Feldern von September bis Oktober gepflanzt und nach 8–9 Monaten geerntet. Kurz nach der Ernte werden die Rhizome von Stengeln und Wurzeln befreit und gewaschen („grüner Ingwer“) und je nach Wetterbedingungen 7–10 Tage in der Sonne getrocknet. Die Weiterverarbeitung der Handelssorten verläuft unterschiedlich. „Bedeckter“ oder „Schwarzer Ingwer“ wird nicht geschält, wird mit kochendem Wasser gebrüht und schnell getrocknet. Der geschälte „weiße Ingwer“ ist häufig gebleicht und wird zur Schönung und zum Schutz vor Insektenbefall häufig mit Kreide oder Kalk eingerieben. Ein Schälen oder Anritzen des Ingwerrhizoms nach der Ernte dient der schnelleren Trocknung, führt aber durch Verlust des ätherischen Öls zu einer Beeinträchtigung der aromatischen Qualität<sup>[68, 70]</sup>. Die Handelssorten unterscheiden sich durch ihren Gehalt an ätherischem Öl, Scharfstoffen und anderen Inhaltsstoffen. In Tab. 1.2 sind die wichtigsten Handelssorten beschrieben.

Herkunft	Verarbeitung	Inhaltsstoffe	Aroma
Jamaica	ganz geschält, nie gekalkt od. gebleicht, hellbraun	0,6–1 % äth. Öl ca. 0,8 % Gingerol	angenehm aromatisch, milde Schärfe
Australien	hellbraun, geschält oder nicht geschält	keine Angabe	sehr zitronig und scharf
Indien (Bengal)	nur seitlich geschält, grau-braun	2–3 % äth. Öl 0,6–1,8 % Gingerol	aromatisch und scharf
Indien (Cochin)	geschält/ungeschält, oft gekalkt (weiß)	1,4 % äth. Öl 0,6 % Gingerole	brennend scharf, blumig-zitronenartig
Malabar (Cochin u. Calicut)	geschält, meist gekalkt (weiß)	keine Angabe	zitronenähnlich, süß, erdig
Japan	stark gekalkt und geschönt, teilweise von Zingiber mioja	1,2 % äth. Öl	Bergamotte-ähnlich, minderwertige Qualität
China	ungeschält, tlw. von anderen Arten, blassbraun, oft kandiert od. in Sirup eingelegt	keine Angabe	starker Geruch und Geschmack, blumig-zitronig, milde Schärfe
Westafrika	ungeschält/halb geschält, ungekalkt, dunkle Farbe	1,6 % äth. Öl ca. 1,5 % Gingerol	campherartig, aromatisch-herber Geruch, sehr scharf

**Tab. 1.2 Unterschiedliche Handelssorten des Ingwers**

Modifiziert nach folgenden Literaturquellen:<sup>[67, 68, 70]</sup>

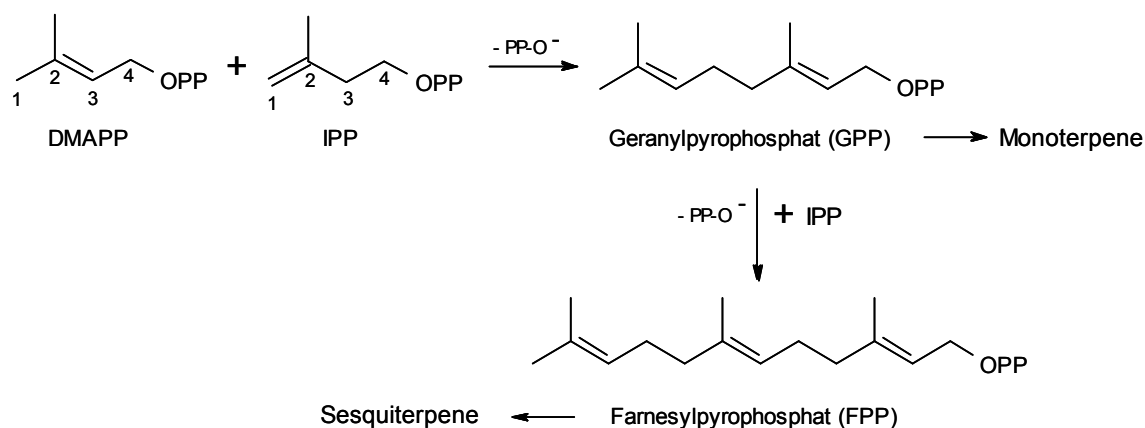
Jamaika-Ingwer (traditionelle Arzneibuchware) wird neben Cochin-Ingwer, bengalischem und australischem Ingwer als besonders hochwertig angesehen. Er ist aber wegen der aufwendigen Verarbeitung kaum noch zu erhalten, da die Korkschicht in Handarbeit vorsichtig abgeschabt statt weggeschnitten wird, um die Exkretzellen innerhalb der Rinde nicht zu verletzen. Ingwer wird vor allem aus China, Indien und Westafrika importiert<sup>[67, 70]</sup>.

### 1.3.2 Inhaltsstoffe

Gemahlener Ingwerwurzelstock enthält je nach Herkunft 3–6 % Fett, 9 % Eiweiß, 60–70 % Kohlenhydrate, 3–8 % Rohfasern, bis zu 8 % Asche, 9–12 % Wasser und 2–3 % ätherisches Öl<sup>[68]</sup>. Das EuAB 6 gibt in der Monographie zu *Zingiberis rhizoma* einen Mindestgehalt an ätherischem Öl von  $15 \text{ ml} \times \text{kg}^{-1}$  an. Durch Perkolation von grob gemahlenem Ingwer mit Ethanol oder Aceton bei Raumtemperatur kann ein zähflüssiger, dunkler, goldbrauner Balsam (Oleoresin) gewonnen werden. Das Ingwerrhizom enthält ca. 5–8 % dieses Balsams. Hauptbestandteile des Oleoresins sind 20–25 % ätherisches Öl und 25–30 % Scharfstoffe<sup>[70]</sup>.

#### Das ätherische Öl

Das Ingwerrhizom kann bis zu 3 % ätherisches Öl enthalten. Dieses ist in Exkretzellen gespeichert, die in der Rinde und zum Teil in der Korkschicht liegen. Beim Schälen der Droge geht das ätherische Öl leicht verloren<sup>[68]</sup>. Zur Gewinnung des Ingweröls mittels Wasserdampfdestillation werden daher vor allem ungeschälte Handelssorten verwendet. Auch die Kork- und Rindenabfälle, die beim Schälen des Ingwerwurzelstocks anfallen, könnten zur Destillation verwendet werden. Probleme hierbei sind allerdings, dass nicht genügend Abfälle anfallen, da Ingwerrhizome selten vollständig geschält werden und dass eine Destillation schnell erfolgen muss, um ein vorzeitiges Entweichen des ätherischen Öls zu verhindern<sup>[71]</sup>. Als Bestandteile ätherischer Ingweröle kommen niedermolekulare, lipophile und wasserdampflichtige Terpene vor. Diese Eigenschaften zeigen in erster Linie Mono- und Sesquiterpene<sup>[72]</sup>. Diese gehören zur Gruppe der Isoprenoide und sind Naturstoffe, die durch Vervielfachung von  $\text{C}_5$ -Isopreneinheiten (2-Methylbutadien) aufgebaut werden und somit einem gemeinsamen Biogeneseweg entstammen. Die Grundeinheit Isopentenylpyrophosphat (IPP) wird entweder über den Acetat-Mevalonat-Biosyntheseweg aus drei Molekülen Acetyl-CoA unter Beteiligung der HMG-CoA-Reduktase oder über den alternativen DXP/MEP-Biosyntheseweg (DXP = 1-Deoxy-D-xylulose-5-phosphat; MEP = 2-C-Methyl-D-erythritol-4-phosphat) aus Pyruvat und D-Glycerinaldehyd-3-phosphat gebildet. Durch eine Isomerase wird IPP in das stabilere Dimethylallylpyrophosphat (DMAPP) umgelagert. IPP und DMAPP sind die biogenetischen Vorstufen bei der Bildung der Terpene (Abb. 1.9).

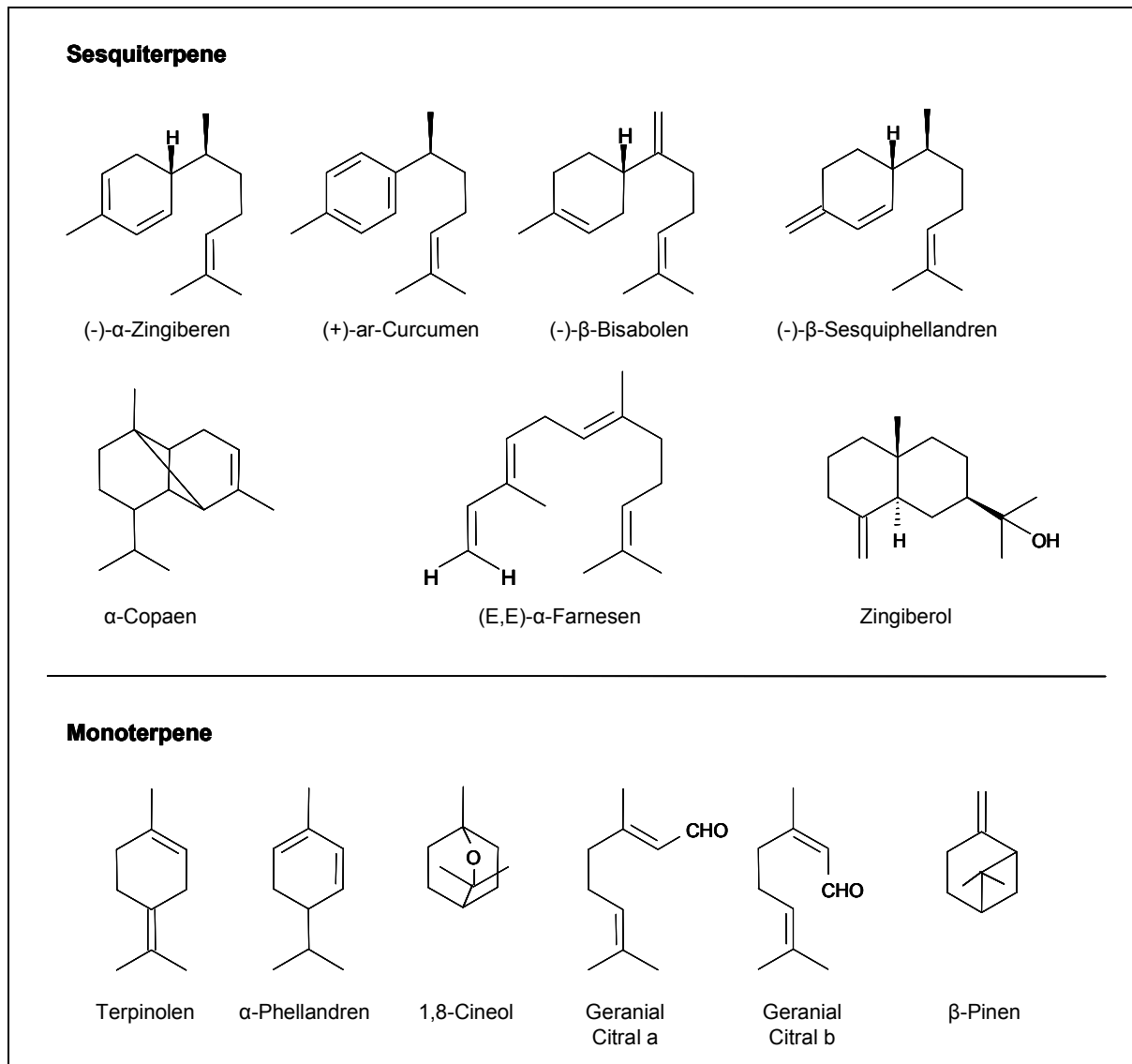


**Abb. 1.9 Kondensation von DMAPP und IPP zu  $\text{C}_{10}$ - und  $\text{C}_{15}$ -Einheiten**

DMAPP lässt sich leicht nukleophil substituieren; als Nucleophil dient die Doppelbindung des IPP. Durch 1,4-Verknüpfung (Kopf-Schwanz-Kondensation) entsteht Geranylpyrophosphat, das zum acyclischen Monoterpenalkohol Geraniol bzw. Nerol metabolisiert werden kann. Weitere Hydroxylierungen, Dehydrierungen und C-C-Verknüpfungen führen zur großen Mannigfaltigkeit monozyklischer und bicyklischer Monoterpene. Durch 1,4-Verknüpfung mit einer weiteren IPP-Einheit gelangt man zu den isomeren Farnesylpyrophosphaten ( $\text{C}_{15}$ -Einheit), welche die Vorstufe zu den Sesquiterpenen darstellen. Die vielen zyklischen Sesquiterpenderivate kommen zustande durch unterschiedliche Geometrie der olefinischen Doppelbindungen in den verschiedenen Farnesylpyrophosphat-Isomeren in Verbindung mit der variablen Vorfaltung der  $\text{C}_{15}$ -Kette auf Enzymoberflächen<sup>[72]</sup>.

Im ätherischen Ingweröl wurden über 160 Komponenten nachgewiesen. Die Zusammensetzung des ätherischen Öls ist je nach Herkunft starken Schwankungen unterworfen. Hauptbestandteile in vielen Ingwerölen sind die monozyklischen Sesquiterpenkohlenwasserstoffe vom Bisabolantyp wie  $\alpha$ -Zingiberen,  $\alpha$ -Curcumen,  $\beta$ -Sesquiphellandren,  $\beta$ -Bisabolen und das azyklische (E,E)- $\alpha$ -Farnesen. Sie sind prägende Aromastoffe. Weitere Bestandteile sind oxidierte Sesquiterpene wie trans- $\beta$ -Sesquiphellandrol und Zingiberol, ein Isomerengemisch aus cis- und trans- $\beta$ -Eudesmol, die wesentliche Geruchskomponenten darstellen<sup>[69]</sup>. Zahlreiche Monoterpene wie zum Beispiel 1,8-Cineol (Eucalyptol), Limonen,  $\alpha$ -Pinen, Linalool, Borneol,  $\beta$ -Pinen, Camphen, Geraniol,  $\alpha/\beta$ -Phellandren und Terpinolen sind ebenfalls zu finden. Die Strukturformeln der wichtigsten Terpene im Ingweröl sind in Abb. 1.10 dargestellt.





**Abb. 1.10** Chemische Struktur einiger Terpene des Ingweröls

Die Zusammensetzung ätherischer Ingweröle ist je nach Herkunft des Ingwers sehr unterschiedlich. Während ätherische Ingweröle aus Indien und Sri Lanka als Hauptinhaltsstoffe Sesquiterpenkohlenwasserstoffe mit variierenden Anteilen der einzelnen Derivate enthalten, sind in ätherischen Ölen des australischen Ingwers monoterpene Derivate wie Camphen, Phellandren, 1,8-Cineol und Citral vorherrschend<sup>[66, 69, 73]</sup>. Das Monoterpene Citral führt zu einem citrusbetonten Aroma des ätherischen Öls, das besonders bei Ingweröl aus australischem Ingwer, Jamaika-Ingwer und Ingwer der Fiji-Inseln ausgeprägt ist. Australisches Ingweröl enthält zwischen 10 und 35 % und ätherisches Öl des Fiji-Ingwers bis zu 57 % Citral<sup>[74]</sup>, während andere Handelssorten zum Beispiel aus Indien nur 1–3 % Citral enthalten<sup>[71, 75]</sup>. Bei der Untersuchung der Zusammensetzung ätherischer Öle von diploiden und tetraploiden Klonen von in Australien angebautem *Zingiber officinale* ROSCOE konnten Wohlmut *et al.*<sup>[76]</sup> sogar 50–

70 % Citral in nahezu allen untersuchten Ingwerölen finden. In dieser Untersuchung wurde festgestellt, dass sich die Konzentration an Citral invers zur Konzentration der Sesquiterpenkohlenwasserstoffe, ebenso wie zur Konzentration von Borneol verhält. Außerdem wurde eine inverse Beziehung zwischen den Konzentrationen von Geraniol/Geranylacetat und (E,E)- $\alpha$ -Farnesen beobachtet. Eine Erklärung hierfür könnte sein, dass Mono- und Sesquiterpene aus dem gleichen Biogeneseweg stammen und somit bei der Biosynthese miteinander konkurrieren. Der Neral/Geraniol-Quotient in den ätherischen Ingwerölen lag in dieser Studie relativ konstant bei 0,6, während der Quotient bei analysierten Ingwerölen anderer Herkunft zwischen 0,3 und 0,9 variierte<sup>[76]</sup>.

### Die Scharfstofffraktion

Die Scharfstofffraktion des Oleoresins besteht zu 20–25 % aus der homologen Reihe der Gingerole (Abb. 1.11). Es handelt sich um Phenylpropanderivate, die sich biogenetisch aus Ferulasäure und Malonsäure sowie einer Fettsäure herleiten.

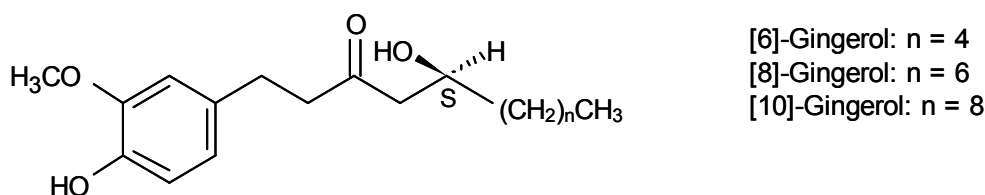


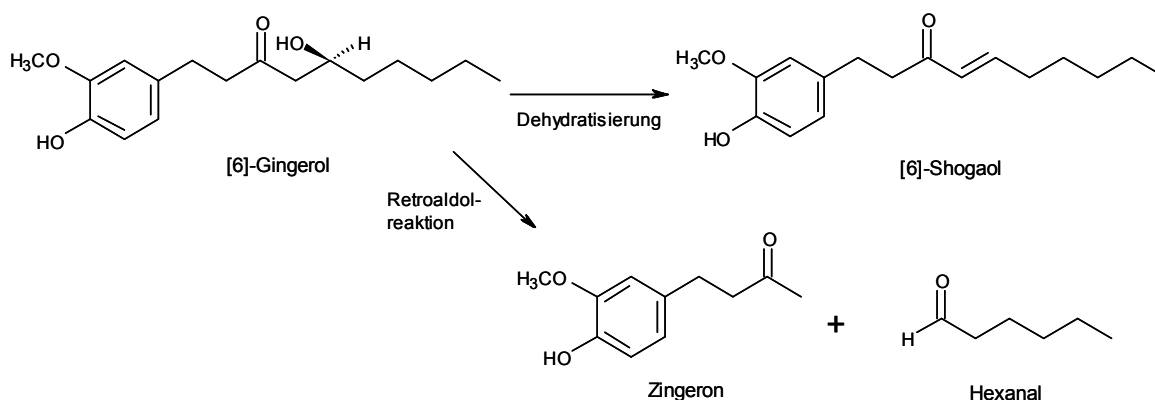
Abb. 1.11 Homologe Reihe der Gingerole

[6]-Gingerol als Hauptvertreter stellt innerhalb der Gingerole das scharfe Prinzip dar, während [8]- und [10]-Gingerol praktisch keine Scharfwirkung erzeugen. Kurz- oder langkettige Gingerole und strukturanaloge Verbindungen wie Methylgingerole, Gingerdirole, Acetate dieser Verbindungen sowie das Sulfonsäurederivat des [6]-Gingerols kommen in geringeren Mengen vor. Die deutlich schärferen Shogaole und das Zingeron (Vanillylacetone) sind Artefakte, die bei Trocknung und Lagerung aus Gingerolen durch Dehydratisierung gebildet werden (siehe Abb. 1.12). Des Weiteren konnten Methylshogaole, Paradole (im Vergleich zu den Shogaolen fehlt die Doppelbindung in der Seitenkette) in Spuren, Gingerdione und Dehydrogingerdione sowie Diarylheptanoide (Curcuminoide) nachgewiesen werden<sup>[66, 69]</sup>.

### Einfluss von Verarbeitung und Lagerung auf das Inhaltsstoff-Spektrum des Ingwerwurzelstocks und des ätherischen Ingweröls

Thermische Belastungen während der Verarbeitung und Lagerung können zu Umsetzungsreaktionen der Inhaltsstoffe des Ingwerwurzelstocks führen. Im Vordergrund steht

hierbei die Reaktion von Gingerolen zu Shogaolen und zu Zingeron (siehe Abb. 1.12). Die gebildeten Shogaole stellen in Analogie zu den Gingerolen eine homologe Reihe dar. Sie sind deutlich schärfer als die Gingerole. [6]-Shogaol entsteht durch Dehydratisierung aus [6]-Gingerol und ist dementsprechend der Hauptvertreter innerhalb der Shogaole. In frischem Ingwer oder frischen Oleoresinen sind nur geringe Mengen an Shogaolderivaten zu finden.

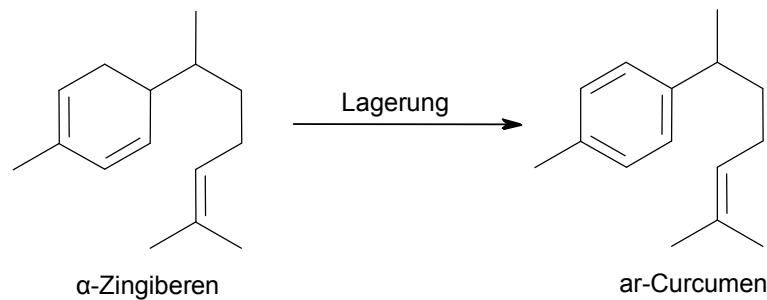


**Abb. 1.12 Umsetzung von [6]-Gingerol durch thermische Belastung oder Lagerung**

Der Shogaol-Gehalt ist somit ein nützlicher Index zur Beurteilung der Frische des Ingwers und ermöglicht Aussagen über die Trocknung, Aufarbeitung und das Alter der Droge. Ein hoher Gehalt an Shogaolen muss aber nicht ein qualitätsminderndes Kriterium sein, da neben den Gingerolen auch die Shogaole an der pharmakologischen Wirkung von Ingwerextrakten beteiligt sind<sup>[77]</sup>. Die Umsetzung des [6]-Gingerols zu Zingeron deutet im Gegensatz dazu auf minderwertige Ware hin, da Zingeron keine Scharfwirkung mehr besitzt<sup>[72, 78]</sup>.

Die variable Zusammensetzung des ätherischen Ingweröls ist nicht nur von der Herkunft des Ingwers, sondern auch von der Art des eingesetzten Ingwerwurzelstocks (frisch oder getrocknet) und den Herstellungsbedingungen abhängig. Hierbei sind besonders Trocknungsprozesse und Lagerung des Ingwers, Destillationsmethode und -Bedingungen, Lagerung des Ingweröls, aber auch Variationen in analytischen Methoden von Bedeutung<sup>[76]</sup>. Die angegebene Destillationszeit zur Gewinnung von Ingweröl variiert zwischen wenigen Stunden und 20 bis 30 Stunden. Besonders die terpenoiden Alkohole und Ester, die an der Aromabildung des Ingwers beteiligt sind, sind anfällig für Umsetzungsreaktionen während der Destillation. Angaben zur optimalen Destillationszeit unter Erhalt der genuinen Inhaltsstoffe gibt es nicht<sup>[71]</sup>. Während der Lagerung nimmt die Viskosität des ätherischen Öls zu<sup>[71]</sup>. Außerdem kommt es zu Veränderungen in der

Zusammensetzung. Am bedeutsamsten sind hierbei die Reaktionen in der Gruppe der Sesquiterpene. Während  $\alpha$ -Zingiberen in frisch destillierten Ingwerölen die Hauptkomponente darstellt, steigt in gelagerten Ölen der Gehalt an ar-Curcumen an (Abb. 1.13)<sup>[71, 75]</sup>.



**Abb. 1.13 Umsetzung von  $\alpha$ -Zingiberen zu ar-Curcumen während der Lagerung des ätherischen Öls**

Auch für  $\beta$ -Sesquiphellandren wurde die Umsetzung zu ar-Curcumen während der Lagerung beschrieben. Da ar-Curcumen das einzige dominierende Sesquiterpen mit positiver optischer Drehung ist, könnte die Bestimmung der optischen Rotation als Hinweis für die Frische des Ingweröls verwendet werden. Ganz zuverlässig ist diese Methode jedoch nicht, da neben der Reaktion zu ar-Curcumen während der Lagerung weitere Veränderungen im ätherischen Öl ablaufen können wie Polymerisationsreaktionen, die ebenfalls die optische Drehung verändern<sup>[71]</sup>. Germer *et al.*<sup>[78]</sup> beobachteten in der Stabilitätsuntersuchung eines ätherischen Ingweröls bei 8 °C über einen Zeitraum von 8 Monaten eine deutliche Abnahme des  $\alpha$ -Zingiberen-Gehalts. In gleichem Ausmaß nahm der Gehalt an ar-Curcumen zu. Eine Umsetzung von  $\beta$ -Sesquiphellandren zu ar-Curcumen konnte in dieser Untersuchung nicht nachgewiesen werden. Die Reaktion von  $\alpha$ -Zingiberen zu ar-Curcumen ist damit die entscheidende Umsetzung während der Lagerung des Ingweröls. Die Gehaltsbestimmung dieser Komponenten kann für die Beurteilung der Frische des ätherischen Öls hilfreich sein.

Auch der Gehalt des Monoterpens Citral ist starken Schwankungen unterworfen. Neben dem Aspekt der Herkunft (siehe oben) wird der Citral-Gehalt durch weitere Faktoren beeinflusst. Ingweröl aus frischem, früh geerntetem Ingwer weist einen höheren Citral-Gehalt auf als Ingweröl, das aus getrockneten Rhizomen gewonnen wird. Des Weiteren spielt die Art der Trocknung eine Rolle. Es konnte gezeigt werden, dass geschnittener und schnell getrockneter Ingwer mehr Citral enthält als der in der Sonne getrocknete Ingwer<sup>[71]</sup>. Ebenso wiesen durch Extraktion mittels überkritischer Flüssigkeit gewonnene Extrakte von frischem australischem Ingwer einen höheren Citral-Gehalt auf als Extrakte von getrocknetem Ingwer. In weiteren Untersuchungen wurde gezeigt, dass durch die

Trocknung der Rhizome von Nigeria- und Sri Lanka-Ingwer vor der Destillation 40–74 % des enthaltenen Citrals verloren gehen. Diese Ergebnisse lassen schlussfolgern, dass der Citral-Gehalt in vielen Ingwerölen höher ist, wenn zur Destillation frische oder bei kühlen Temperaturen getrocknete Ingwerrhizome verwendet werden<sup>[76]</sup>. Daher sind auch die in der Literatur angegebenen Daten zum Citral-Gehalt von Ingwerölen unterschiedlicher Herkunft kritisch zu betrachten, da der Gehalt an Citral im ätherischen Öl häufig nur begrenzt auf den tatsächlichen Citral-Gehalt im ätherischen Öl des Rhizoms schließen lässt.

### 1.3.3 Anwendung und pharmakologische Wirkung

#### Medizinische und sonstige Verwendung des Ingwers

Ingwerrhizom in gemahlener Form ist ein beliebtes Küchengewürz in Süßwaren, eingemachten Früchten, Suppen, Reisspeisen und Fleischgerichten, und ist ferner Bestandteil von Curry und anderen Gewürzmischungen. Ingwerextrakt wird in der Getränkeindustrie zur Herstellung von Tincturae aromatica, Likören und des alkoholfreien „Ginger Ale“ verwendet. Appetitanregende Ingwer-Schokoladenstäbchen und kandierter Ingwer sind weit verbreitet<sup>[67]</sup>. Volksmedizinisch wird Ingwer seit 2500 Jahren in China und Indien zur Behandlung von Kopfschmerzen, Übelkeit, Rheuma und Erkältungen eingesetzt. Die traditionelle chinesische Medizin charakterisiert Ingwer als scharf und heiß und er dient zur „Erwärmung“ des Körpers, zur Behandlung kalter Extremitäten, zur Kreislaufanregung, Verringerung von Blässe und zur Stärkung nach Blutverlust<sup>[79]</sup>. Das chinesische Arzneibuch setzt den gewaschenen und getrockneten Ingwer (ganjiang) bei Kältegefühl, Magen- und Unterleibsschmerzen, Erbrechen und Durchfall, kalten Gliedmaßen, Keuchatmung und Husten ein. Der geröstete Ingwer (paojiang) wird bei Unterleibsschmerzen mit Erbrechen und Durchfällen, Nasenbluten und übermäßigen Uterusblutungen eingesetzt<sup>[80]</sup>. In Arzneibüchern und der traditionellen Medizin werden weitere Einsatzgebiete wie Dyspepsie, Flatulenz, Koliken, Krämpfe und Appetitlosigkeit genannt<sup>[81]</sup>. Von Fischern der karibischen Inseln wird Ingwer seit Jahrhunderten zur Vorbeugung der Seekrankheit eingesetzt<sup>[67]</sup>.

#### Pharmakologische Wirkung des Ingwers

Aufgrund der Vielzahl an bereits isolierten Inhaltsstoffen des Ingwers gibt es unzählige Studien zur pharmakologischen Wirkung von Trockenrückständen unterschiedlicher Ingwerextrakte und isolierten Ingwerinhaltsstoffen. Diese Wirkungen sind in Reviews zum Thema Ingwer ausführlich beschrieben<sup>[66, 82]</sup>. Einige dieser pharmakologischen Effekte werden im Folgenden aufgegriffen. In *in vitro*- und *in vivo*-Studien durch

Mascolo *et al.*<sup>[83]</sup> zeigte ein ethanolicer Ingwerextrakt anti-inflammatorische, analgetische, antipyretische, antibakterielle und blutzuckersenkende Wirkungen. Die antiinflammatorische Wirkung konnte durch *in vitro*-Effekte der isolierten Substanzen belegt werden. Gingerole, Shogaole und Diarylheptanoide hemmen die Prostaglandin-Synthetase und die 5-Lipoxygenase<sup>[84, 85]</sup>. Für [8]-Gingerol, [8]-Shogaol und [8]-Paradol konnte zudem eine Hemmung der Cyclooxygenasen 1<sup>[86]</sup> und 2<sup>[87]</sup> nachgewiesen werden. Diese Ergebnisse belegen den volksmedizinischen Einsatz des Ingwers bei rheumatischen Erkrankungen. Muskarinische, Ca<sup>2+</sup>-antagonistische Effekte und spezifische Hemmung der Butyrylcholinesterase durch einen Ingwerextrakt könnten den Einsatz bei Demenz erklären<sup>[88]</sup>. Als die wirkbestimmenden Substanzen des Ingwers werden in den meisten Fällen die Scharfstoffe und deren Derivate diskutiert. In einer *in vivo*-Studie an Mäusen zu analgetischen und antipyretischen Wirkungen der Scharfstoffe erwiesen sich die Shogaole potenter als die Gingerole<sup>[89]</sup>, so dass eine Alterung der Droge nicht unbedingt von Nachteil ist.

Der Hauptfokus der Studien ist auf die antiemetische Wirkung des Ingwerrhizoms gelegt. In tierexperimentellen *in vivo*-Studien konnten Ingwerextrakte, Gingerole und Shogaole das durch zytotoxische Substanzen ausgelöste Erbrechen mildern oder aufheben. Eine Auflistung dieser Studien findet man bei Abdel-Aziz (2004)<sup>[90]</sup>. Der genaue Wirkungsmechanismus zum antiemetischen Effekt des Ingwers ist nicht bekannt, allerdings wird ein antiserotonerger Effekt als Grund für die antiemetische Wirkung in Lehrbüchern angenommen. In einer *in vitro*-Studie von Yamahara *et al.* (1989) am isolierten Meerschweinchenileum wirkten ein acetonischer Extrakt und [6]-, [8]- und [10]-Gingerol antispasmodisch auf die Serotonin-induzierte Kontraktion<sup>[91]</sup>. Im gleichen Testsystem zeigte auch Galanolacton antiserotonerge Wirkungen. Durch Zugabe des unselektiven 5-HT<sub>1/2/5/7</sub>-Rezeptor-Antagonisten Methysergid wurde die 5-HT<sub>3</sub>-Rezeptor-antagonistische Wirkung des Galanolactons belegt<sup>[92]</sup>. Durch Abdel-Aziz *et al.* wurde der antagonistische Effekt am 5-HT<sub>3</sub>-Rezeptorkanalsystem von Ingwerextrakten, Gingerolen, Shogaolen und dem ätherischen Öl durch Kationeninflux-Versuche und Kontraktionsversuche am Meerschweinchenileum (mit SR57227A als selektivem 5-HT<sub>3</sub>-Agonist) gezeigt<sup>[77, 93]</sup>. Neben der antiserotonergen Wirkung trägt auch der direkte Effekt der Substanzen im Gastrointestinaltrakt zur antiemetischen Wirkung bei. Auch hier spielt vermutlich die antiserotonerge Aktivität neben anderen wie z.B. anticholinergen Mechanismen eine Rolle. So konnte ein acetonischer Ingwerextrakt eine Serotonin-induzierte Diarrhö bei Mäusen signifikant hemmen<sup>[94]</sup>. In *in vivo*-Versuchen an Mäusen steigerten der Trockenrückstand eines acetonischen Ingwerextraktes sowie [6]-, [8]- und [10]-Gingerol und [6]-Shogaol die Magen-Darm-Motilität signifikant<sup>[95, 96]</sup>.

## **Anwendung und pharmakologische Wirkung des ätherischen Öls und seiner Hauptbestandteile**

Ingweröl findet seine Hauptverwendung in der Getränke-, Süßwaren- und Parfümindustrie. Das ätherische Ingweröl weist aber durchaus pharmakologische Wirkqualitäten auf, die zum Gesamteffekt eines Extraktes beitragen könnten. So konnte Riyazi im Kationeninflux-Versuch an N1E-115 Zellen eine 5-HT<sub>3</sub>-Rezeptorkanal-antagonistische Wirkung sowohl für das ätherische Öl, als auch für die Monoterpene Terpinolen,  $\beta$ -Pinen,  $\alpha$ -Phellandren und das Sesquiterpen  $\alpha$ -Copaen belegen. Die Monoterpene zeigten außerdem einen antispasmodischen Effekt auf die Serotonin-induzierte Kontraktion am isolierten Rattenileum<sup>[97]</sup>. An der elektrisch stimulierten glatten Muskulatur des Ileums und der Trachea des Meerschweinchens wirkt das ätherische Öl tonussenkend<sup>[98]</sup>. Als Hauptbestandteil des ätherischen Melissenöls inhibierte Citral in einer Studie am isolierten Rattenileum die durch KCl, ACh und 5-HT induzierten Kontraktionen konzentrationsabhängig und in gleichem Maße wie das Öl selbst<sup>[99]</sup>. Bezüglich der ulcusprotektiven Wirkung eines acetonischen Ingwerextraktes wurde neben [6]-Gingerol auch  $\alpha$ -Zingiberen als wirksam erkannt. Beide Substanzen verminderten die bei Wistar-Ratten durch HCl in Ethanol induzierten Läsionen der Magenschleimhaut signifikant<sup>[100]</sup>. Des Weiteren wurden neben [6]-Shogaol auch die Komponenten des ätherischen Ingweröls  $\beta$ -Sesquiphellandren,  $\beta$ -Bisabolen und  $\alpha$ -Curcumen als antiulcerative Prinzipien isoliert<sup>[101]</sup>. Diese Ergebnisse lassen vermuten, dass das ätherische Öl besonders bei Anwendung von Ingwerextrakten zur Linderung gastro-intestinaler Beschwerden zur Wirkung beiträgt.

### **1.3.4 Studienlage zur Anwendung von Ingwer in der antiemetischen Therapie**

Neben den *in vitro*-Untersuchungen zum antiemetischen Wirkungsmechanismus von Ingwerinhaltsstoffen wurden *in vivo*-Studien zur Wirksamkeit des Ingwers bei unterschiedlichen Formen der Nausea und Emesis durchgeführt. In den Studien wurden 250 mg bis 2 g Ingwer eingesetzt.

#### **Ingwer bei Chemotherapie-induziertem Erbrechen und Übelkeit (CINV)**

Zur Wirksamkeit von Ingwer in der Therapie des CINV sind bisher nur zwei klinische Studien durchgeführt worden. In einer doppelblinden, placebokontrollierten Studie mit 41 Leukämie-Patienten verminderte Ingwer im Vergleich zu Placebo statistisch signifikant das Auftreten von Übelkeit und Erbrechen<sup>[102]</sup>. In einer Studie von Meyer *et al.*<sup>[103]</sup> wurde bei 11 Patienten der Effekt einer Prämedikation mit 530 mg Ingwer-Pulver auf die durch

extrakorporale Chemotherapie mit Psoralen und Bestrahlung verursachte Übelkeit bewertet. Bei einem Vergleich des Ausmaßes der ausgelösten Übelkeit wurde in der Ingwergruppe eine Verminderung der Beschwerden auf ca. ein Drittel der Gruppe ohne Prämedikation beobachtet. Diese Studien deuten auf eine gute Wirksamkeit von Ingwer in der Behandlung des CINV hin, die durch weitere Studien noch belegt werden muss.

### **Ingwer bei postoperativer Übelkeit und Erbrechen (PONV)**

In zwei doppelblinden Studien an Patientinnen mit gynäkologischen Eingriffen und einem erhöhten PONV-Risiko war die Wirkung von Ingwer vergleichbar mit 10 mg Metoclopramid<sup>[104, 105]</sup>. In der Placebogruppe wurden in beiden Studien mehr zusätzliche Antiemetika gefordert als in den beiden Behandlungsgruppen. Das Auftreten von Übelkeit war in der Ingwergruppe signifikant seltener als in den Vergleichsgruppen. In einer anderen doppelblinden Studie mit Patientinnen mit Unterbauch-Laparoskopie konnte durch Therapie mit Ingwer keine antiemetische Wirkung erzielt werden<sup>[106]</sup>. Ebenso wurde in der durch Arfeen *et al.* mit 108 Patientinnen mit laparoskopischen Eingriffen durchgeführten Studie gezeigt, dass 0,5–1 g präoperativ verabreichter Ingwer die Inzidenz des PONV nicht reduziert<sup>[107]</sup>. Nach Auswertung dieser Studien lässt sich keine abschließende Beurteilung treffen. Ebenso kommen auch zwei Meta-Analysen zur Wirksamkeit von Ingwer bei PONV zu unterschiedlichen Ergebnissen. Die 2004 durch Morin *et al.*<sup>[108]</sup> veröffentlichte Meta-Analyse kommt zu dem Ergebnis, dass Ingwer für die Vermeidung der PONV keine klinische Relevanz hat. Im Gegensatz dazu ziehen Chaiyakunapruk *et al.*<sup>[109]</sup> in ihrer 2006 veröffentlichten Meta-Analyse den Schluss, dass Ingwer in Dosen ab 1 g in der PONV-Prävention effektiver ist als Placebo. Ob Ingwer nun wirklich eine entsprechende Wirksamkeit aufweist, bleibt unklar.

### **Ingwer bei Kinetosen / Reiseübelkeit**

In sechs klinischen Studien wurde der Effekt von Ingwer bei Kinetosen untersucht<sup>[110-115]</sup>. In vier dieser Studien<sup>[110-113]</sup> wurden die Symptome einer Kinetose experimentell erzeugt, während in den beiden anderen Studien<sup>[114, 115]</sup> realitätsnahe Trigger wie z.B. eine Schiffsreise verwendet wurden. In der auf See durchgeführten Studie von Grontved *et al.*<sup>[114]</sup> an 80 Marinekadetten bewirkte 1 g Ingwer eine Abschwächung der Symptome Übelkeit, Erbrechen, Schwindel und Kaltschweißigkeit. Statistisch signifikant war dieses Ergebnis jedoch nur im Hinblick auf die Anzahl der Erbrechenepisoden und der Kaltschweißigkeit. In einer weiteren Studie mit Touristen auf einer Walsafari in Norwegen<sup>[115]</sup> zeigten 250 mg Ingwer prophylaktisch angewendet eine ähnlich gute antiemetische Wirksamkeit wie die Vergleichsmedikamente Cinnarizin allein, Cinnarizin mit Domperidon, Cyclizin, Dimenhydrinat mit Coffein und Meclozin mit Coffein. Nachteil



dieser Studie ist, dass eine Placebogruppe fehlt. In zwei der Studien mit experimentell erzeugten Kinetosen<sup>[111, 113]</sup> (z.B. durch Drehstuhlexperimente) konnte eine antiemetische Wirksamkeit des Ingwers nachgewiesen werden. In zwei ähnlichen Studien mit hoher methodischer Qualität<sup>[110, 112]</sup> zeigte Ingwer keinen relevanten antiemetischen Effekt. Trotz einiger Studien mit negativem Resultat ist eine Tendenz zur antiemetischen Wirkung des Ingwers bei Kinetosen erkennbar. Auch hier fehlen weitere Studien und vor allem solche mit realitätsnahen Triggerfaktoren.

### **Ingwer bei Schwangerschaftserbrechen**

In vier placebokontrollierten Studien wurde der Effekt von Ingwer bei Emesis und Hyperemesis gravidarum an insgesamt 136 Patientinnen getestet; weitere 74 Patientinnen erhielten Placebo<sup>[116-119]</sup>. In der placebokontrollierten Doppelblindstudie von Vutyavanich *et al.*<sup>[117]</sup> erhielten 70 Schwangere mit Übelkeit und Erbrechen über 4 Tage 1 g Ingwer pro Tag. Ingwer verminderte sowohl die Stärke von Übelkeit und Erbrechen als auch die Anzahl der Brechepisoden signifikant. In einer weiteren Studie mit Crossover-Design an 30 Schwangeren mit Hyperemesis gravidarum wurde die tägliche Dosis von 1 g Ingwer über vier Tage mit einem Placebo verglichen<sup>[116]</sup>. Nach 2 Tagen Auswaschphase wurden die Gruppen gewechselt. Bei einer Selbsteinschätzung des Therapieerfolgs bevorzugten 70,4 % der Schwangeren die Ingwermedikation, 14,8 % Placebo und 14,8 % gaben keine Präferenz an. Der Unterschied war signifikant ( $p < 0,003$ ). Die Bevorzugung der Ingwertherapie wurde der Verminderung von Erbrechen und Übelkeit zugeschrieben. Der Nachweis der antiemetischen Wirksamkeit des Ingwers bei Emesis gravidarum wurde durch zwei weitere Studien belegt. Keating und Chez<sup>[118]</sup> untersuchten in ihrer kontrollierten klinischen Studie an 26 Schwangeren im ersten Trimester den Effekt eines Ingwersirups (entsprechend 1 g Ingwer pro Tag) über zwei Wochen. 67 % der Frauen in der Verumgruppe, die zu Beginn der Studie täglich erbrachen, zeigten nach dem 6. Beobachtungstag keine Erbrechenepisoden mehr, im Vergleich zu 20 % in der Verumgruppe. In der aktuellsten Studie aus dem Jahr 2003<sup>[119]</sup> wurde die Wirksamkeit von 1,5 g Ingwer mit 30 mg Vitamin B<sub>6</sub> pro Tag über einen Zeitraum von drei Tagen verglichen. Die Gruppen bestanden aus je 64 Frauen. In beiden Behandlungsgruppen nahmen die Anzahl der Erbrechenepisoden und die Stärke der Übelkeit signifikant ab. Zwischen den Gruppen wurde kein signifikanter Unterschied beobachtet.

In allen vier durchgeführten klinischen Studien wurde somit die Wirksamkeit des Ingwers belegt. Klinische Studien mit einem negativen Ergebnis zum Einsatz von Ingwer liegen nicht vor; man muss dabei jedoch beachten, dass Negativ-Ergebnisse eventuell nicht veröffentlicht wurden. In den vier Studien wurden keine Missbildungen beobachtet. Eine Patientin erlitt in der 12. Schwangerschaftswoche eine Fehlgeburt; die Autoren sehen

aber keinen Zusammenhang mit der Medikation und beurteilen die Verträglichkeit von Ingwer als gut. Hingegen wird in der Monographie „Zingiberis rhizoma“ der Kommission E aus dem Jahr 1988 Schwangerschaftserbrechen als Kontraindikation angegeben. Eine genaue Begründung erfolgt jedoch nicht<sup>[120]</sup>. Zur endgültigen Widerlegung dieser Einschränkung durch die Kommission E bedarf es weiterer klinischer Studien.

Insgesamt ist kritisch anzumerken, dass in allen klinischen Untersuchungen nicht reproduzierbar herzustellende Ingwer-Pulver verwendet wurden und niemals eine die Wirkung hauptsächlich tragende und identifizierte Einzelsubstanz; dies wird weiterhin zur kontroversen Beurteilung beitragen.

### **Mechanismus der antiemetischen Wirkung des Ingwers**

Ernst und Pittler<sup>[121]</sup> kommen in ihrem Review zur Wirksamkeit von Ingwer bei Übelkeit und Erbrechen zu dem Schluss, dass Ingwer ein vielversprechendes Antiemetikum ist, dass die Daten für sichere Aussagen jedoch nicht ausreichen. Der antiemetische Wirkungsmechanismus ist bisher unklar. Zum einen scheint die zuvor beschriebene 5-HT<sub>3</sub>-Rezeptorkanal-antagonistische Wirkung der Ingwerinhaltsstoffe von Bedeutung zu sein. Dies gilt besonders für das CINV, da 5-HT<sub>3</sub>-Rezeptoren in der Pathogenese eine große Rolle spielen. In diesem Zusammenhang sind eventuell sowohl zentrale als auch periphere antagonistische Wirkungen am 5-HT<sub>3</sub>-Rezeptorkanalssystem von Bedeutung<sup>[122]</sup>. Bei den weiteren Formen von Übelkeit und Erbrechen, die nicht direkt mit 5-HT<sub>3</sub>-Rezeptoren assoziiert sind, könnten antiserotonerge Effekte der Ingwer-Inhaltsstoffe im Magen-Darm-Trakt zur antiemetischen Wirkung beitragen (siehe pharmakologische Wirkungen des Ingwers). Sowohl beim PONV als auch beim Schwangerschaftserbrechen werden in der Pathogenese gastrointestinale Störungen genannt. Die noch nicht eindeutig charakterisierte Wirkung des Ingwers bei Kinetosen scheint ebenfalls vorwiegend durch Wirkungen auf den Magen-Darm-Trakt bedingt zu sein. In der 1989 durch Holtmann *et al.*<sup>[123]</sup> durchgeführten Studie wurde gezeigt, dass Ingwer keinen Effekt auf experimentell erzeugten Schwindel und Nystagmus ausübt. Die Autoren schließen, dass die antiemetischen Wirkungen des Ingwers weder das vestibuläre noch das okulomotorische System betreffen.

## 1.4 Pfefferminzöl

### 1.4.1 Botanik und Vorkommen von *Mentha x piperita* L.



**Abb. 1.14** *Mentha x piperita* L. aus Köhler's Medizinal-Pflanzen<sup>[65]</sup>

Abgebildet ist die blühende Pflanze mit detaillierten Darstellungen der einzelnen Blütenbestandteile. Die Pflanze mit ausgeprägt vierkantigem Stengel und dekussierter Blattstellung wird etwa 60 cm hoch. Die blassroten Blüten erscheinen in ährigen Quirlen<sup>[124]</sup>.

#### Die Stammpflanze

*Mentha x piperita* L. aus der Familie der Lamiaceae (siehe Abb. 1.14) ist keine natürlich vorkommende, taxonomisch eindeutig definierte Art. Sie entstand wahrscheinlich erst im 17. Jahrhundert durch spontane Kreuzung von Wasserminze (*Mentha aquatica* L.) und grüner Minze (*Mentha spicata* L.), die ihrerseits ein Bastard zwischen *Mentha longifolia* und *Mentha rotundifolia* ist. Die Pfefferminze ist somit ein Tripelbastard. Der englische Biologe John Ray entdeckte den Tripelbastard in einem englischen Garten und gab ihm wegen seines scharfen Geschmacks den Namen „peppermint“ (1696)<sup>[125]</sup>. Die Vermehrung kann nur vegetativ durch Kopfstecklinge (Stolone) erfolgen. Durch Anbau und Selektionierung von *Mentha x piperita* L. wurden *Mentha*-Typen entwickelt, die einen hohen Ölgehalt und ein mentholreiches ätherisches Öl enthalten. Die heute kultivierten Pfefferminzsorten lassen sich zwei Gruppen zuordnen. Die Mitcham-Minzen („black mint“;

als *Mentha piperita* (L.) HUDS. var. *officinalis* SOLE forma *rubescens* CAMUS klassifiziert) sind durch ihre violett angelaufenen Blattnerven und Stängel gekennzeichnet. Sie stehen den Wasserminzen näher, sind ertragreich, winterhart und liefern eine ölreiche Droge mit meist über 1,7 % (ml/100 g) ätherischem Öl. Die Pfälzer Pfefferminzen („white mint“; als *Mentha piperita* (L.) HUDS. var. *officinalis* SOLE forma *pallescens* CAMUS klassifiziert) sind grünblättrig und ähneln stärker der grünen Minze. Sie enthalten aufgrund einer verminderten Anzahl an Drüsenschuppen weniger ätherisches Öl, sind aber im Geschmack milder und deshalb bei Verwendung als Teeaufguss der Mitcham-Minze vorzuziehen. Während sich Kulturen der Mitcham-Minzen in allen gemäßigten Klimazonen der Erde befinden, werden die Pfälzer Minzen nur in bestimmten Regionen angebaut<sup>[72]</sup>.

## Die Droge

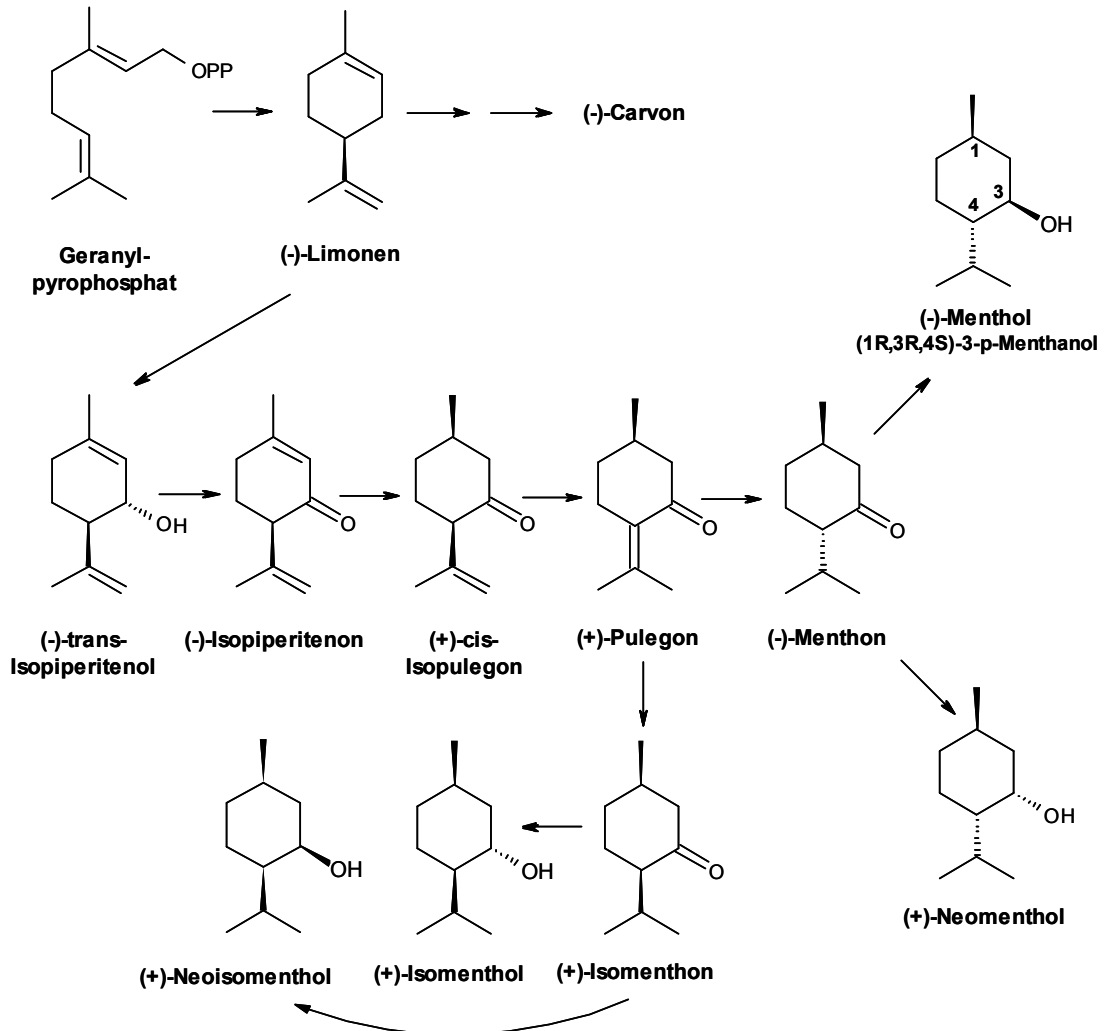
Pfefferminzblätter (*Menthae piperitae folium*) sind in der Monographie des EuAB 6 als getrocknete ganze oder geschnittene Blätter von *Mentha x piperita* L. definiert<sup>[126]</sup>. Die Droge besteht aus grünen bis bräunlich-grünen, dünnen, brüchigen, eiförmig bis lanzettlich geformten, 3–9 cm langen Blättern mit scharf gesägtem Rand. Die fiedrige, manchmal violett überlaufene Nervatur (Micham-Minze, beste Qualität) tritt besonders auf der Unterseite hervor<sup>[66]</sup>. Unter der Lupe kann man die Drüsenhaare als gelbe Punkte erkennen. Pfefferminzblätter riechen charakteristisch nach Menthol, schmecken würzig-aromatisch und haben einen kühlenden Nachgeschmack<sup>[124]</sup>.

## 1.4.2 Inhaltsstoffe

### Ätherisches Öl

*Mentha x piperita* L. enthält 0,5–4 % ätherisches Öl mit (-)-Menthol als charakteristischer Hauptkomponente. Das ätherische Öl wird in den für Lamiaceen typischen Drüsenschuppen (bestehend aus 8 sezernierenden Zellen), die zwischen Kutikula und Zellmembran liegen, gebildet und gespeichert<sup>[124]</sup>. Das EuAB 6 fordert 12 ml ätherisches Öl pro kg Droge (aus ganzen Blättern bestehende Droge) bzw. 9 ml pro kg geschnittener Droge. Pfefferminzöl (*Menthae piperitae aetheroleum*) ist ebenfalls im Europäischen Arzneibuch monographiert. Es wird durch Wasserdampfdestillation aus frischen, blühenden oberirdischen Teilen von *Mentha x piperita* L. gewonnen<sup>[126]</sup>. Pfefferminzöl ist eine farblose bis schwach gelbliche oder grüngelbliche Flüssigkeit mit dem typischen Geruch nach Pfefferminz. Die Inhaltsstoffe können je nach Varietät, Herkunft, Alter der Blätter, Klima, Licht, Wasser- und Nährsalzangebot variieren<sup>[66]</sup>. Pfefferminzöl aus *Mentha x piperita* L. besitzt einen hohen Gehalt an C-3-oxidierten monozyklischen Monoterpenen. Die Biosynthese dieser Derivate ist in Abb. 1.15

dargestellt. Die Zyklisierung zwischen Geranylpyrophosphat und (-)-Limonen wird katalysiert durch die (-)-Limonen-Synthase, das wichtigste Monoterpen-Cyclase-Enzym in *Mentha*-Arten<sup>[127]</sup>.



**Abb. 1.15 Biosynthese der C-3-oxidierten p-Menthanderivate des Pfefferminz- und Minzöls**

Modifiziert nach Croteau<sup>[127]</sup>; (-)-Carvon ist ein C-6-oxidiertes p-Menthanderivat und Hauptbestandteil des Krauseminzöls.

Die Hauptkomponenten Menthol, Menthon und Menthylacetat machen zusammen 50–70 % des Pfefferminzöls aus<sup>[66]</sup>. (-)-Menthol kann sowohl frei als auch an Essig- oder Isovaleriansäure (Estermenthol) gebunden vorliegen<sup>[72]</sup>. Das EuAB 6 fordert einen Gehalt an frei vorliegendem (-)-Menthol von 30–55 %. Des Weiteren sind in der Monographie Mengenangaben für die Inhaltsstoffe Limonen, Cineol, Menthon, Menthofuran, Isomenthon und Menthylacetat festgelegt<sup>[126]</sup>. Durch fraktionierte Vakuumdestillation können störende Bestandteile wie Menthofuran verringert oder eliminiert werden (rektifizierte Öle). Das Verhältnis von freiem zu verestertem Menthol, die Menge an

Begleitstoffen (wie Jasmon) und eine möglichst geringe Konzentration an Menthofuran sind wichtige Kriterien zur Qualitätsbestimmung des Pfefferminzöls<sup>[72]</sup>. Auf Verfälschungen mit Minzöl (aus *Mentha canadensis* L.) deuten Pulegon-Gehalte über 0,2 % und mit Krauseminzöl (aus „*crispa*“-Variationen von *Mentha spicata* L., *Mentha aquatica* L. und *Mentha longifolia* NATH.) Carvon-Gehalte über 1 % hin<sup>[126]</sup>. Neben Monoterpenen sind auch Sesquiterpenderivate wie (-)- $\beta$ -Caryophyllen und (-)-Caryophyllenepoxid im Pfefferminzöl enthalten. Charakteristisch ist das Vorkommen kleiner Mengen (+)-trans-Sabinenhydrat und (+)-Viridiflorol<sup>[72]</sup>. Zur Gewinnung von (-)-Menthol im großen Maßstab werden anstelle der teuren Pfefferminzöle vom Piperita-Typ Minzöle verwendet.

### Weitere Inhaltsstoffe

In Pfefferminzblättern sind außerdem 3,5–4,5 % Labiatengerbstoffe, 8,6–17,8 % Flavonoidglykoside (Eriocitrin als Hauptkomponente), Flavonoidaglyka mit unterschiedlichem Methylierungsgrad, Triterpensäuren, Sterole, Lipide, Carotinoide und mineralische Bestandteile enthalten<sup>[72]</sup>.

## 1.4.3 Medizinische Anwendung und pharmakologische Wirkung

### Pfefferminzblätter

Pfefferminztee ist indiziert bei akuter und chronischer Gastritis und Enteritis, bei kolikartigen Beschwerden des Magen-Darm-Traktes, der Gallenblase und -wege und bei Blähungen. Extrakte von Pfefferminzblättern sind in zahlreichen Kombinationspräparaten enthalten, die als Carminativa, Cholagoga und Sedativa Verwendung finden<sup>[124]</sup>. Die choleretische Wirkung wird auf den Gehalt an Menthol im ätherischen Öl der Pflanze zurückgeführt<sup>[66, 128]</sup>. Auch die spasmolytische Aktivität der Flavonoide sowie reflektorisch über Geruchs- und Geschmacksreize sekretionsfördernde Effekte des ätherischen Öls tragen zur choleretischen Wirkung bei<sup>[72]</sup>. Die leicht sedierende Wirkung eines wässrigen Extraktes von Pfefferminzblättern konnte im Tierversuch an der Maus bestätigt werden<sup>[129]</sup>. Hall *et al.* zeigten, dass Menthol, Menthon und ähnliche Derivate stereoselektiv die ionotropen Kanäle von GABA<sub>A</sub>- und Glycin-Rezeptoren modulieren. Ob dies mit den neuroaktiven Eigenschaften dieser Substanzen und des Pfefferminztees zusammenhängt, muss noch geklärt werden<sup>[130]</sup>. Die antispasmodische Wirkung eines ethanolischen Pfefferminzextraktes wurde am Meerschweinchenileum unter Verwendung der Spasmogene Acetylcholin und Histamin belegt<sup>[131]</sup>. In der Volksmedizin wird Pfefferminztee zudem bei Übelkeit, Erbrechen, Erkältungskrankheiten und Dysmenorrhoe angewendet.

## Pfefferminzöl

Pfefferminzöl ist ein beliebtes Geruchs- und Geschmackskorrigens in der Lebensmittel-, der kosmetischen und der pharmazeutischen Industrie. In der Pharmazie eignet es sich besonders zur Überdeckung des Geschmacks von metallisch oder salzig schmeckenden Präparaten<sup>[66]</sup>. Pfefferminzöl und seine Hauptkomponente Menthol weisen ähnliche physiologische, pharmakologische und toxikologische Eigenschaften auf. Zur innerlichen Anwendung bei krampfartigen Beschwerden des GI-Traktes und der Gallenwege, Katarrhen der oberen Luftwege und Mundschleimhautentzündungen wird Pfefferminzöl wegen seines angenehmeren Geschmacks bevorzugt. Äußerlich anzuwendende Arzneiformen zur Behandlung von Muskel- und Nervenschmerzen enthalten meist Menthol. Topisch angewendet erweitert Menthol die Blutgefäße und verursacht ein Kältegefühl, wodurch in Konzentrationen von 0,1–1 % Menthol Juckreiz (z.B. bei Urticaria und Pruritus) und Schmerzen vermindert werden<sup>[72]</sup>. Die Kälteempfindung kommt durch Aktivierung von TRPM8-Rezeptoren zustande<sup>[132]</sup>. Menthol wirkt in Konzentrationen über 1,25 % hautreizend<sup>[72]</sup>. In der Volksheilkunde wird Pfefferminzöl äußerlich bei Migräne- und Spannungskopfschmerz angewendet.

Pfefferminzöhlaltige, magensaftresistent formulierte Arzneizubereitungen (z.B. Colpermin<sup>®</sup>) sind zur Behandlung des Reizdarmsyndroms zugelassen. Die Dosierungsempfehlung liegt bei dreimal täglich 0,2–0,4 ml Pfefferminzöl. Die magensaftresistente Darreichungsform dient der gezielten Freisetzung des ätherischen Öls im Dünndarm und der Vermeidung von Reizungen der Ösophagus- und Magenschleimhaut. Die in zahlreichen *in vitro*-Studien untersuchte pharmakodynamische Hauptwirkung des Pfefferminzöls ist der konzentrationsabhängige antispasmodische Effekt auf die glatte Muskulatur des Gastrointestinaltrakts. Für diese Wirkung des Pfefferminzöls wird zu einem Teil der Calcium-Kanal-modulierende Effekt des Menthols verantwortlich gemacht. Menthol antagonisiert den Einstrom von extrazellulären Calciumionen durch spannungsabhängige Ionenkanäle<sup>[128]</sup>. Der modulierende Effekt des Pfefferminzöls an Calcium-Kanälen wurde unter anderem durch Hills und Aaronson (1991) anhand von elektrophysiologischen Untersuchungen mittels Patch-Clamp-Technik und durch pharmakologische Experimente an isolierten Geweben des Kaninchens und Meerschweinchens nachgewiesen<sup>[133]</sup>. In Bindungsstudien und <sup>45</sup>Ca<sup>2+</sup>-Aufnahme-Experimenten in tierischen neuronalen, intestinalen und cardialen Geweben wiesen sowohl Menthol als auch Pfefferminzöl Calcium-Kanal-modulierende Effekte auf<sup>[134]</sup>. Die Übertragbarkeit der *in vitro*-Daten auf den menschlichen Darm wird aufgrund der schleimhautreizenden Wirkung des Pfefferminzöls kontrovers diskutiert<sup>[135]</sup>. Der spasmolytische Effekt des Pfefferminzöls auf den Ösophagussphinkter ermöglicht den Einsatz des Öls im Rahmen von endoskopischen Eingriffen<sup>[136, 137]</sup>, führt aber bei Einnahme von magensaftlöslich verkapseltem Pfefferminzöl auch zu einem Reflux. In

Kombination mit Kümmelöl (Enteroplant<sup>®</sup>) wird Pfefferminzöl, magensaftresistent verkapselt, zur Therapie der funktionellen Dyspepsie eingesetzt<sup>[138]</sup>. Pfefferminzöl bewirkt sowohl bei gesunden Patienten<sup>[139]</sup> als auch bei Patienten mit funktioneller Dyspepsie<sup>[140]</sup> eine Beschleunigung der Magenentleerung. Menthol weist darüber hinaus carminative und das Aufstoßen fördernde Wirkqualitäten auf, was die Symptomatik von Magen-Darm-Erkrankungen abschwächt.

#### 1.4.4 Studienlage zur Anwendung von Pfefferminzöl bei Reizdarmsyndrom

Zur Wirksamkeit von Pfefferminzöl in der Behandlung des Reizdarmsyndroms wurden 13 doppelblinde, plazebokontrollierte Studien durchgeführt<sup>[141, 142]</sup>. In 9 der 13 Studien konnte durch Pfefferminzöl eine statistisch signifikante Verbesserung der Symptome erzielt werden. Die größte dieser plazebokontrollierten Studien von Liu *et al.*<sup>[143]</sup> (1997) umfasste 110 Patienten mit IBS-Symptomen. Die Patienten nahmen 3–4 x täglich 15–30 min vor dem Essen eine Kapsel Colpermin oder Plazebo über einen Zeitraum von 4 Wochen ein. In der Colpermin-Gruppe trat bei 79 % der Patienten eine Verringerung der Symptomstärke ein (vs. 43 % in der Plazebogruppe). 83 % der Colpermin-einnehmenden Patienten hatten weniger abdominelle Verspannungen (vs. 29 %), 83 % eine verringerte Stuhlgangsfrequenz (vs. 32 %), 73 % weniger „Magenknurren“ (vs. 31 %) und 79 % berichteten von einer verringerten Flatulenz (vs. 22 % in der Plazebogruppe). Die Verringerung der IBS-Symptomatik war in der Gruppe mit Pfefferminzöl signifikant besser als in der Plazebogruppe ( $p < 0,05$ ). Die aktuellste plazebokontrollierte Studie von Cappello *et al.*<sup>[142]</sup> (2007) umfasste 57 Patienten, bei denen durch Voruntersuchungen Erkrankungen wie Laktoseintoleranz, Zöliakie und zu starke/falsche Bakterienbesiedlung im Dünndarm (SIBO = small intestine bacterial overgrowth) ausgeschlossen worden waren. Die Patienten erhielten 4 Wochen lang zweimal täglich eine Dosis Pfefferminzöl (Mintoil<sup>®</sup>) oder Plazebo mit Minzaroma. 75 % der Patienten der Mintoil-Gruppe erfuhren nach 4 Wochen eine 50 %ige Verringerung ihrer RDS-Symptomatik (gemessen an einer Einordnung der Symptomatik durch eine Zahlenskala zum Studienbeginn und nach vier Wochen) im Vergleich zu 38 % in der Plazebogruppe ( $p < 0,009$ ). In einer randomisierten, plazebokontrollierten Studie mit 42 Kindern (ab 8 Jahre) mit Reizdarmsyndrom berichteten 76 % der Kinder der Pfefferminzölgruppe nach 2 Wochen von einer Verbesserung der RDS-Symptomatik, verglichen mit 19 % in der Plazebogruppe ( $p < 0,001$ )<sup>[144]</sup>. In therapeutischen Dosen sind die unerwünschten Wirkungen bei Therapie mit Pfefferminzöl nicht schwerwiegend. Vorübergehend kann Sodbrennen, anales/perianales Brennen und Unwohlsein auftreten. Anticholinergika, 5-HT<sub>3</sub>-Rezeptor-Antagonisten und 5-HT<sub>4</sub>-Rezeptor-Agonisten zeigen in Studien keine deutlichere Verbesserung als



---

Pfefferminzöl und die Plazebowerte ähneln denen der Pfefferminzstudien. Da sie außerdem erheblich stärkere Nebenwirkungen verursachen, sollten sie vorwiegend zur Behandlung der schwerwiegenden RDS-Symptomatik eingesetzt werden. Pfefferminzöl stellt in der Therapie des moderaten RDS durchaus eine Alternative dar<sup>[141]</sup>.

## 1.5 Zielsetzung

Im Mittelpunkt der hier gezeigten Ergebnisse zu pharmakologischen Untersuchungen steht die antagonistische Wirkung von Komponenten des Ingwers und der Pfefferminze am 5-HT<sub>3</sub>-Rezeptorkanal. Ingwer wird seit vielen Jahrhunderten zur Behandlung von Übelkeit und Erbrechen eingesetzt. Die Wirksamkeit von Ingwerinhaltsstoffen wird dem Antagonismus am 5-HT<sub>3</sub>-Rezeptorkanal zugesprochen, ohne dass schlüssige Untersuchungen vorliegen. Das ätherische Ingweröl weist einen antagonistischen Effekt am 5-HT<sub>3</sub>-Rezeptorkanal-Komplex auf, der vermutlich zur Gesamtwirkung des Ingwers beiträgt. Ein Ziel der Arbeit war es daher, die Hauptbestandteile ätherischer Ingweröle zunächst zu isolieren und anschließend im [<sup>14</sup>C]Guanidinium-Assay auf ihre 5-HT<sub>3</sub>-antiserotonerge Wirkung zu untersuchen, um dann ihren Anteil an der Gesamtwirkung des Ingweröls zu bestimmen. Da die Zusammensetzung ätherischer Ingweröle sehr unterschiedlich sein kann, sollen die Ergebnisse Informationen dazu liefern, welche Inhaltsstoffe für die antiemetische Wirkung von Bedeutung sind. Zusätzlich zur Untersuchung des ätherischen Ingweröls wurde die antiserotonerge Wirkung eines mit Scharfstoffen angereicherten Ingwer-Spezialextraktes im Vergleich zu einem Ingwer-Spissumextrakt im [<sup>14</sup>C]Guanidinium-Assay und am isolierten Ileum der Ratte getestet. Die Ergebnisse sollten zeigen, ob eine künstliche Steigerung des Scharfstoff-Gehalts zu einem stärkeren antiserotonergen Effekt von Ingwerextrakten führt.

Ein weiteres Ziel dieser Arbeit war es zu testen, ob die in der Literatur beschriebene Hemmung der Insulinsekretion durch Serotonin an INS-1 Zellen eintritt und antiserotonerg wirkende Ingwerextrakte eine Wirkung auf die verminderte Insulinsekretion besitzen. Die Verwendung chemischer 5-HT-Rezeptor-Antagonisten sollte zeigen, welche Rezeptor-subtypen an der Hemmung der Insulinsekretion durch Serotonin beteiligt sind, um so auf den Wirkungsmechanismus der Ingwerextrakte rückschließen zu können.

Das ätherische Öl von *Mentha x piperita* L. wird in der Therapie des Reizdarmsyndroms eingesetzt. Als Wirkungsmechanismus wird bisher ein Calcium-Kanal-modulierender Effekt des Öls und seines Hauptinhaltsstoffs (-)-Menthol an der glatten Muskulatur des Magen-Darm-Traktes diskutiert. Die hierdurch bedingten spasmolytischen Effekte vermindern die Symptomatik des RDS. Serotonin scheint an der Pathogenese des Reizdarmsyndroms unter anderem über die Wirkung an 5-HT<sub>3</sub>-Rezeptoren beteiligt zu sein. In den pharmakologischen Untersuchungen sollte daher untersucht werden, ob die Wirksamkeit des Pfefferminzöls und von Menthol auch auf einem Antagonismus am 5-HT<sub>3</sub>-Rezeptorkanalsystem beruht.

## 2 Material

### 2.1 Zelllinien

Die Kultivierung der verwendeten Zelllinien erfolgte im Brutschrank bei 37 °C in einer Atmosphäre von 95 % Luft und 5 % CO<sub>2</sub> in 75 cm<sup>2</sup> Zellkulturflaschen. Eingefrorene Zelllinien wurden in einem Kryobehälter in flüssigem Stickstoff gelagert.

#### 2.1.1 N1E-115 Zellen

Für die [<sup>14</sup>C]Guanidinium-Influx-Versuche und die Bindungsstudien wurden die 1972 durch Amano *et al.*<sup>[145]</sup> etablierten Neuroblastomazellen des Klons N1E-115 der Maus verwendet. Diese Zellen exprimieren den ligandengesteuerten 5-HT<sub>3</sub>-Rezeptor<sup>[146, 147]</sup>. Elektrophysiologische Studien zeigten, dass durch die Aktivierung des 5-HT<sub>3</sub>-Rezeptors an N1E-115 Zellen die Membranpermeabilität für Natrium- und Kaliumionen erhöht wird und somit ein Einstrom dieser Kationen in die Zelle erfolgt<sup>[148, 149]</sup>. Neben 5-HT<sub>3</sub>-Rezeptoren werden auch weitere Ionenkanalrezeptoren wie der tetrodotoxinsensitive, spannungsabhängige Natrium-Kanal exprimiert. Diese Zelllinie wurde uns freundlicherweise von Prof. Dr. Bönisch, Institut für Pharmakologie und Toxikologie der Universität Bonn, zur Verfügung gestellt.

#### 2.1.2 INS-1 Zellen

Bei der 1992 von Asfari *et al.*<sup>[150]</sup> etablierten INS-1 Zelllinie handelt es sich um eine Röntgenstrahlen-induzierte permanente Ratteninsulinoma-Zelllinie. Im Rahmen dieser Arbeit wurden diese Zellen für die Insulinsekretionsversuche und Bindungsstudien verwendet. Das permanente Wachstum der Zellen wird durch den Zusatz von Mercaptoethanol zum Kulturmedium beschleunigt. Auf einen dem physiologischen Bereich (2,8–11 mM) ähnelnden Glucosestimulus von 2,8–20 mM erfolgt eine Insulinsekretion. Die INS-1 Zelllinie weist ähnliche Charakteristika wie native β-Zellen auf mit Ausnahme der etwas abweichenden Glucoseempfindlichkeit und eignet sich daher zu pharmakologischen Untersuchungen von Modulatoren der Insulinsekretion.

## 2.2 Drogenmaterial

Zingiberis officinalis rhizoma DAB 1999, Ch.B. 15700648 (Herkunftsland Vietnam), der Ingwer-Spissumextrakt UB 2005-141 sowie der ölige Spezialextrakt (> 25 % Scharfstoffe), Ch.B. 07023846, wurden von der Firma Finzelberg, Andernach zur Verfügung gestellt.

## 2.3 Chemikalien und Geräte

### 2.3.1 Isolierung und Anreicherung der Sesquiterpenkohlenwasserstoffe

#### Chemikalien

Silikonöl	Merck, Darmstadt
Natriumsulfat	Merck, Darmstadt
Kieselgel 60 für die Säulenchromatographie 70-230 mesh; Korngröße 0,063-0,2 mm	Merck, Darmstadt
Kieselgel 60 für die Säulenchromatographie 230-400 mesh ASTM; Korngröße 0,04-0,063 mm	Merck, Darmstadt
Dünnschichtchromatographie-Aluminiumplatten, Kieselgel 60 F <sub>254</sub> , 250 µm, 20 x 20 cm	Merck, Darmstadt
Dünnschichtchromatographie-Glasplatten RP-18 F <sub>254</sub> S, 5 x 10 cm	Merck, Darmstadt
n-Hexan	Merck, Darmstadt
n-Pentan	AppliChem, Darmstadt
2-Chlorpropan	Merck, Darmstadt
Diethylether	Merck, Darmstadt
Methanol	Merck, Darmstadt
n-Heptan	Merck, Darmstadt
Acetonitril	Merck, Darmstadt
Acetonitril für die HPLC (Chromanorm)	Prolabo/VWR
Ethylacetat	Merck, Darmstadt
Anisaldehyd	Merck, Darmstadt
Schwefelsäure	Merck, Darmstadt
Eisessig	Merck, Darmstadt
Chloroform-d <sub>1</sub>	Merck, Darmstadt
4-Phenyl-1,2,4-triazolin-3,5-dion (PTAD)	Sigma-Aldrich, Steinheim
Tetrahydrofuran	Merck, Darmstadt

**Geräte****Wasserdampfdestillation und Trockensäulenchromatographie**

Glasdestillationsapparatur nach EuAB 6	Wilh. O. Schmidt, Braunschweig
Schlagmessermühle TYP M20	KIKA-Werke, Staufen
Glaschromatographierohr mit Glasfritte (22 cm lang, Durchmesser 4,5 cm)	Laborausrüstung: Inst. für Pharm. Biol. und Phytochemie, Münster
Vakuumpumpe	Vacuumbrand GmbH, Wertheim

**Gaschromatographie**

GC-Gerät: Agilent 6890N	Agilent Technologies, Böblingen
GC-Säule: Agilent 19091S-433, HP5-MS, 0,25 mm x 30 m x 0,25 µm	Agilent Technologies, Böblingen
MS-Detektor: Agilent 5973	Agilent Technologies, Böblingen
Injector: Agilent 7683B	Agilent Technologies, Böblingen

**FCPC**

CPC Kromaton 2006 (Motorpower 0,75 kW, 220 V)	Kromaton Technologies, Frankreich
Pumpe Knauer 97-6	Knauer Berlin
Fraktionssammler Pharmacia	GMI, Ramsey, Minnesota, USA
LKB-Superfrac 92-28	

**Analytische HPLC**

HPLC-Säule: Supelco Discovery C18, 15 cm x 4,6 mm, 5 µm	Supelco, Bellefonte, PA, USA
Pumpe Varian 9012	Varian, California, USA
UV-Detektor Varian Polychrom 9065	Varian, California, USA
UV-VIS Detector Varian 9050	Varian, California, USA
Autosampler Varian 9100	Varian, California, USA

**Präparative HPLC**

HPLC-Säule Eurospher 100, RP-18, 250 x 20 mm, 7 µm	VDS optilab, Montabaur
Waters 515 HPLC Pumpe	Waters, Eschborn
Rheodyne 7161 Injektor	Rheodyne, California, USA

Millennium Software	Waters, Eschborn
Waters 3487 Dual $\lambda$ Absorbance Detektor	Waters, Eschborn
Degaser Degasys DG-2010	Uniflows Co., Ltd. Japan

### **Zingiberen-Gewinnung**

Alle verwendeten Glasgeräte sind Bestandteil der gängigen Laborausstattung der organischen Chemie des Institutes für Medizinische und Pharmazeutische Chemie.

### **NMR**

Varian Mercury 400 plus NMR spectrometer	Varian, UK
MestReC Software	Mestrelab Research, Santiago de Compostela, Spanien

### **Sonstige Geräte**

Weitere hier nicht genannte Geräte sind Bestandteil einer üblichen Laborausstattung.

## **2.3.2 Zellkultur**

### **Chemikalien**

Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM), high Glucose (4,5 g/l)	PAA, Cölbe
RPMI 1640 Medium	PAA, Cölbe
Dulbecco's PBS	PAA, Cölbe
Penicillin/Streptomycin, 100fach	PAA, Cölbe
L-Glutamin, 200 mM	PAA, Cölbe
Fötales Bovines Serum (FCS)	PAA, Cölbe
HEPES (4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazin-1-ethan- sulfonsäure und N-(2-Hydroxyethyl)- piperazin- N'-2-ethansulfonsäure) Pufferlösung 1 M	PAA, Cölbe
Pyruvat-Na Lösung 100 mM	PAA, Cölbe
Trypsin/EDTA	PAA, Cölbe
Mercaptoethanol	Invitrogen, Carlsbad, CA, USA
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Fluka, Buchs, Schweiz

<b>Zellkulturmedium für N1E-115 Zellen</b>	
Medium	DMEM high Glucose (4,5 g/ml)
Zusatz	Konzentration
Penicillin	100 I.U./ml
Streptomycin	100 µg/ml
Glutamin	2 mM
FCS	10 %

<b>Zellkulturmedium für INS-1 Zellen</b>	
Medium	RPMI 1640
Zusatz	Konzentration
Penicillin	100 I.U./ml
Streptomycin	100 µg/ml
Glutamin	2 mM
FCS	10 %
HEPES	10 mM
Na-Pyruvat	1 mM
Mercaptoethanol	40 µM

Zum Einfrieren der Zelllinien wurde dem Komplettmedium 10 % (V/V) DMSO zugesetzt.

### **Geräte**

Kryobehälter	Taylor-Wharton, Theodor, AL
Kryogefäße 1,5 ml	Sarstedt, Nümbrecht
Kühlzentrifuge CR412	Jouan GmbH, Dinslaken
Kühlzentrifuge Labofuge 400 R	Heraeus, Hanau
Lichtmikroskop	Krüss GmbH
Multiwellplatten 24er für N1E-115 Zellen	Biochrom, Berlin
Multiwellplatten 24er für INS-1 Zellen	Nunc, Wiesbaden
Probenröhrchen 15 ml, 50 ml	Sarstedt, Nümbrecht
Laminar Air Flow Werkbank Antair BSK	Anthos, Siegburg
Zellkulturflaschen 75 cm <sup>2</sup>	Sarstedt, Nümbrecht
Serologische Pipetten 10 ml	Biochrom, Berlin
Pipetboy	Abimed, Langenfeld
Zellkultur-Brutschrank HeraCell 240	Kendro-Heraeus, Berlin
Lichtmikroskop	Krüss GmbH, Hamburg
Autoklav 3170 ELV	Systec GmbH, Wetztenberg

Neubauerzählkammer

Laboroptik, Friedrichsdorf

### 2.3.3 Pharmakologische Untersuchungen

#### Chemikalien

Chemikalien, die bereits unter einem vorhergehenden Punkt genannt wurden, werden bei Doppelbenutzung nicht wiederholt.

#### **[<sup>14</sup>C]Guanidinium-Influx und Bindungsstudien**

Serotonin creatinine sulphate monohydrate	Fluka, Buchs, Schweiz
Veratridin	Sigma-Aldrich, Steinheim
Tropisetron-HCl	Novartis Pharma, Frankfurt
[ <sup>14</sup> C]Guanidinium-HCl	Biotrend, Köln
[ <sup>3</sup> H]GR65630	Perkin Elmer, Boston, USA
Szintillationslösung Unisafe 1	Zinsser Analytik, Frankfurt
Tris(hydroxymethyl)-aminomethan (TRIS)	Merck, Darmstadt
HEPES (4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazin-1-ethansulfonsäure und N-(2-Hydroxyethyl)-piperazin-N'-2-ethansulfonsäure)	AppliChem, Darmstadt
Cholinchlorid	Sigma Aldrich, Steinheim
Kaliumchlorid	Riedel de Häen, Seelze
Magnesiumsulfat-Heptahydrat	Merck, Darmstadt
D-Glucose, wasserfrei	Merck, Darmstadt
Bovines Serumalbumin (BSA)	Biomol, Hamburg
Natriumchlorid	J.T. Baker, Deventer, Niederlande
Triton X 100	Fluka, Buchs, Schweiz
Ethanol (vergällt)	Merck, Darmstadt

#### **Rattenileum**

Acetylcholin	Sigma Aldrich, Steinheim
Natriumhydrogencarbonat	Merck, Darmstadt
Kaliumdihydrogenphosphat	Merck, Darmstadt
Calciumchloriddihydrat	Merck, Darmstadt
Carbogen	Air Liquide, Düsseldorf



## **Insulinsekretion und Radioimmunoassay**

Methysergidmaleat	Biotrend, Köln
Ketanserin	Sigma Aldrich, Steinheim
[ <sup>125</sup> I]Insulin vom Schwein	Sanofi Aventis, Frankfurt
Anti-Insulin IgG vom Meerschweinchen	Biotrend, Köln (Hersteller: Linco)
Anti-Meerschweinchen IgG von der Ziege	Biotrend, Köln (Hersteller: Linco)
Meerschweinchen-Carrier IgG	Biotrend, Köln (Hersteller: Linco)
Natriumazid	J.T. Baker, Deventer, NL
Ratteninsulinstandard	Novo Nordisk, Bagsvaerds, DK
Calciumchloriddihydrat	Merck, Darmstadt
Dinatriumhydrogenphosphat-Dodecahydrat	Merck, Darmstadt
EDTA (Titriplex)	Merck, Darmstadt
EMTSA (Thiomersal)	Caelo, Hilden

## **Geräte**

### **[<sup>14</sup>C]Guanidinium-Influx und Bindungsstudien**

Multipette	Abimed
Soft-Wells 24er für MicroBeta 1450-402, 1000 µl	Perkin-Elmer, Boston, USA
24-Well-Cassette für MicroBeta 1450	Perkin-Elmer, Boston, USA
Permanent Plateseal	Perkin-Elmer, Boston, USA
Betacounter MicroBeta 1450	Perkin-Elmer, Boston, USA
Membran-Vakuumpumpe	Vacuubrand GmbH, Wertheim
Trockenschrank	WTC Binder, Tuttlingen
Vortex	KIKA-Werk, Staufen
Digital-pH-Meter 646	Knick, Berlin
pH-Elektrode InLab	Mettler Toledo, Giessen

### **Rattenileum**

Organbad	Eigenbau
Multi-Pen-Recorder	Rikadenki Kogyo, Tokio, Japan
Hebelaufnehmer Lever Transducer B40 Typ 373	Hugo Sachs Elektronik, March
2-Kanal-Brückenverstärker, Typ 301	Hugo Sachs Elektronik, March
Thermostat Haake D1	Fisons, Berlin

**Insulinsekretion und Radioimmunoassay**

Microlab® 500 Pipettierautomat

Hamilton, Martinsried

Zentrifuge Varifuge 3.0 R

Heraeus Sepatech, Osterode

Zentrifugenröhren 4,5 ml

Sarstedt, Nümbrecht

Gammacounter LB 2111

Berthold, Wildbad

**2.3.4 Sonstige Chemikalien****Ingweröl und Bestandteile**

Oleum Zingiberis - Zingiber officinale ROSCOE

Caelo, Hilden

Cital (cis/trans-Gemisch)

Sigma Aldrich, Steinheim

 $\beta$ -Pinen

Fluka, Buchs, Schweiz

 $\alpha$ -Phellandren

Fluka, Buchs, Schweiz

Terpinolen

Fluka, Buchs, Schweiz

 $\alpha$ -Copaen

Fluka, Buchs, Schweiz

**Pfefferminzöl und Bestandteile**

Oleum Menthae piperitae dopp. rectific.

Caelo, Hilden

(-)-Menthol

Fluka, Buchs, Schweiz

### 2.3.5 Pufferlösungen und Stammlösungen

Alle Pufferlösungen wurden mit Aqua demineralisata auf das entsprechende Volumen verdünnt. Der pH-Wert wurde durch Zutropfen von wässrigen HCl- und NaOH-Lösungen unterschiedlicher Konzentrationen eingestellt.

#### [<sup>14</sup>C]Guanidinium-Influx

##### Puffer

Inkubationspuffer	
HEPES	25 mM
TRIS	25 mM
KCl	5,4 mM
MgSO <sub>4</sub> x 7 H <sub>2</sub> O	0,98 mM
Cholinchlorid	135 mM
D-Glucose	5,5 mM
BSA	1 mg/ml
pH	7,4

Waschpuffer	
HEPES	25 mM
TRIS	25 mM
KCl	5,4 mM
MgSO <sub>4</sub> x 7 H <sub>2</sub> O	0,98 mM
NaCl	135 mM
D-Glucose	5,5 mM
pH	7,4

##### Stammlösungen

- [<sup>14</sup>C]Guanidinium-Lösung: Das radioaktiv markierte Kation wurde in einer Konzentration von 0,1 mCi/ml in Ethanol geliefert. Zunächst wurde eine 500 µM Stocklösung mit Aqua demineralisata hergestellt, die vor Versuchsdurchführung 1:10 verdünnt wurde.

- [<sup>14</sup>C]Guanidinium/Serotonin-Lösung: Die 50 µM [<sup>14</sup>C]Guanidinium-Lösung wurde 1:1 mit einer 1 mM Serotoninlösung vermischt. Diese Lösung wurde im Well 1:5 verdünnt (Endkonzentration von 5 µM [<sup>14</sup>C]Guanidinium und 100 µM Serotonin).
- [<sup>14</sup>C]Guanidinium/Veratridin-Lösung: Die Löslichkeit von Veratridin in wässrigem Milieu ist abhängig vom pH-Wert. Inkubationspuffer eignet sich besser zur Herstellung einer wässrigen Veratridin-Lösung als Aqua demineralisata. Die gelieferte Substanz wurde in Ethanol gelöst und dann mit Inkubationspuffer auf eine Konzentration von 3 mM verdünnt. Diese Lösung wurde 1:1 mit der 50 µM [<sup>14</sup>C]Guanidinium-Lösung versetzt und im Well 5-fach verdünnt. Es wurde eine Ethanolendkonzentration von 1 % (V/V) im Well erreicht. Laut Literaturangaben hat Ethanol keine Effekte auf den Veratridin-induzierten Ioneneinstrom<sup>[151]</sup>. Außerdem enthielten sowohl Referenz- als auch Probewells die gleiche Ethanolmenge.
- [<sup>14</sup>C]Guanidinium/Aqua dem.-Lösung (Blankwert): Die 50 µM [<sup>14</sup>C]Guanidinium-Lösung wurde 1:1 mit Aqua demineralisata (bzw. Inkubationspuffer in Veratridinversuchen) versetzt. Im Well erfolgte eine 1:5 - Verdünnung.
- Testsubstanzen: Bei den eingesetzten Substanzen handelte es sich meist um lipophile und damit schwer wasserlösliche Bestandteile ätherischer Öle. Zur Verbesserung der Löslichkeit im wässrigen Milieu wurden Ethanol oder DMSO in einer Menge zugesetzt, die zum Vorliegen einer über den Versuchszeitraum stabilen Lösung führte. Allerdings wurde in keinem Fall eine Endkonzentration im Well von 0,2 % (V/V) DMSO oder 0,5 % (V/V) Ethanol überschritten. Ethanol kann in bestimmten Konzentration den [<sup>14</sup>C]Guanidinium-Influx erhöhen<sup>[151]</sup>. Der Effekt des Ethanols wurde daher in Parallelbestimmungen erfasst.

## Bindungsstudien

### Puffer

<b>Krebs-Ringer-HEPES-Puffer (KRH)</b>	
Substanz	Konzentration
NaCl	119 mM
KCl	4,8 mM
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	1,2 mM
MgSO <sub>4</sub> x 7 H <sub>2</sub> O	1,2 mM
CaCl <sub>2</sub> x 2 H <sub>2</sub> O	2,5 mM
HEPES	10 mM
pH	7,4

## Stammlösungen

- [<sup>3</sup>H]GR65630-Verdünnung: Die gelieferte Lösung wurde mit KRH-Puffer auf eine Konzentration von 4 nM verdünnt. Im Well erfolgte eine 10-fache Verdünnung.
- Unspezifische Bindung: Zur Bestimmung der unspezifischen Bindung wurden 10 mM Serotonin (Konzentration im Well) eingesetzt.
- Testsubstanzen: Es wurden die gleichen Testsubstanzen untersucht wie im [<sup>14</sup>C]Guanidinium-Influx-Assay. In diesem Assay wurde zur Verbesserung der Löslichkeit DMSO zugesetzt, wobei die Endkonzentration im Well maximal 0,2 % (V/V) DMSO erreichte. Ein Lösemittelleffekt wurde durch Parallelbestimmung ausgeschlossen.

## Rattenileum

### Puffer

Krebs-Henseleit-Lösung	
Substanz	Konzentration
NaHCO <sub>3</sub>	25 mM
D-Glucose	5,5 mM
NaCl	119 mM
KCl	4,7 mM
CaCl <sub>2</sub> x 2 H <sub>2</sub> O	2,5 mM
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	1,2 mM
MgSO <sub>4</sub> x 7 H <sub>2</sub> O	1,2 mM
pH	7,4

## Stammlösungen

- Acetylcholin (ACh): Es wurde eine wässrige 1 mM ACh-Stocklösung hergestellt, von der 10 µl in das 10 ml-Organbad pipettiert wurden (Endkonzentration: 1 µM).
- Serotonin: Von einer wässrigen 10 mM Serotoninlösung wurden 10 µl in das 10 ml-Organbad pipettiert (Endkonzentration: 10 µM).
- Testsubstanzen: Aufgrund der Lipophilie der Testsubstanzen im Wässrigen wurde Ethanol als Lösungsvermittler in Mengen eingesetzt, in denen eine stabile Lösung vorlag. Ein Lösungsmittelleffekt wurde durch begleitende Versuche untersucht.

## Insulinsekretion

### INS-1 Zellassay

#### **Puffer**

Als Puffer für die Sekretionsversuche diente der in den Bindungsstudien benutzte Krebs-Ringer-HEPES-Puffer. Im Insulinsekretionsversuch wurde dieser zusätzlich mit 0,5 % BSA versetzt und auf einen pH-Wert von 7,35 eingestellt. Für die calciumfreien Experimente wurde Calciumchlorid durch Natriumchlorid ersetzt. Um Calcium-Verunreinigungen der eingesetzten Substanzen und intrazelluläres Calcium abzufangen, wurde dem Puffer 1 mM EDTA zugesetzt.

#### **Stammlösungen**

- Glibenclamid: Glibenclamid wurde in einer Konzentration von 100 µg/ml in Ethanol gelöst. Diese Lösung wurde am Versuchstag mit KRH-Puffer 1:10 verdünnt. Im Well erfolgte eine Verdünnung von 1:10 (Versuchskonzentration 1 µg/ml).
- Testsubstanzen: Zur Verbesserung der Löslichkeit wurde Ethanol verwendet. Die maximale Endkonzentration im Well betrug 0,5 % (V/V) Ethanol.

## Radioimmunoassay

#### **Puffer**

- KRH-Puffer: Zusammensetzung siehe INS-1 Zellassay.

<b>Assaypuffer</b>	
Substanz	Konzentration
NaCl	154 mM
NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> x 12 H <sub>2</sub> O	46 mM
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	4,8 mM
EDTA	25 mM
Thiomersal	0,25 mM
pH	7,4

- Isotopenpuffer: Der zur Verdünnung von [<sup>125</sup>I]Insulin verwendete Isotopenpuffer setzte sich aus KRH-Puffer mit 0,5 % BSA und 0,1 % Natriumazid (pH 7,35) zusammen.

- Waschpuffer: Assaypuffer ohne BSA.

### Stammlösungen

- Ratteninsulinstandard (100 mU/100 µl): Aus dieser Stammlösung wurde eine Verdünnungsreihe aus sechs Konzentrationen absteigend von 25 µU/100 µl bis 0,78125 µU/100 µl erstellt.
- Anti-Insulin Immunglobulin G (IgG) (Antikörper I) vom Meerschweinchen (50 µl pro Vial) wurde mit 1 ml Assay-Puffer verdünnt, aliquotiert und eingefroren. Am Versuchstag wurde die benötigte Menge aufgetaut und mit Assaypuffer 1:100 verdünnt. Im Verlauf der Arbeit wurde der RIA auf einen Antikörper von Linco umgestellt, von dem unverdünnt 100 µl pro Probe eingesetzt wurden.
- Anti-Meerschweinchen IgG (Antikörper II) wurde in 260 ml-Flaschen tiefgefroren geliefert. Pro Probe wurde 1 ml unverdünnt eingesetzt.
- Meerschweinchen-Carrier IgG (2 ml pro Vial) wurde mit 6 ml Assaypuffer verdünnt, aliquotiert und tiefgefroren. Im Versuch wurden von dieser Lösung 10 µl pro Probe eingesetzt
- [<sup>125</sup>I]Insulin wird in gefriergetrockneter Form geliefert, mit der angegebenen Menge Aqua destillata verdünnt, aliquotiert und bei -20 °C gelagert. Bei Anwendung des ursprünglichen Anti-Insulin IgGs wurde die [<sup>125</sup>I]Insulin-Lösung 1:200 in Isotopenpuffer verdünnt. Nach Umstellung des RIAs auf den neuen Antikörper wurde die [<sup>125</sup>I]Insulin-Lösung 1:217 in Isotopenpuffer verdünnt. Der Termin der radioaktiven Markierung des Insulins sollte maximal zehn Wochen zurückliegen.

### 3 Tiere

Die Versuche am isolierten Rattenileum wurden mit weiblichen und männlichen Wistar-Ratten durchgeführt. Es handelt sich hierbei um einen Stamm von Albino-Ratten, der der Spezies *Rattus norvegicus* angehört und 1906 im Wistar-Institut in Philadelphia, USA, gezüchtet wurde.

Die Tiere wurden in klimatisierten Räumen bei einer durchschnittlichen Temperatur von 22 °C und einem Tag-Nacht-Zyklus von 12 Stunden gehalten. In Makrolonkäfigen hatten die Tiere freien Zugang zu Wasser und standardisiertem Futter (Altromin® 1234, Firma Altromin, Lage). Am Versuchstag hatten die Tiere ein Gewicht von 180–300 g.



## 4 Methoden

### 4.1 Isolierung und Anreicherung der Sesquiterpenkohlenwasserstoffe

#### 4.1.1 Wasserdampfdestillation

Zur Gewinnung des ätherischen Öls wurde getrockneter Ingwerwurzelstock vietnamesischer Herkunft eingesetzt. Es wurden mehrere Wasserdampfdestillationen durchgeführt. Vor jeder Destillation wurde die Droge mit einer Schlagmessermühle pulverisiert. 30 g Droge wurden mit 250 ml Aqua destillata versetzt und in einer Wasserdampfdestillationsapparatur nach EuAB 6 destilliert. Jedem Ansatz wurden zwei Tropfen Silikonöl zugefügt, um ein Schäumen während der Destillation zu vermeiden. Die Destillationszeit betrug zwei Stunden. Nach wenigen Destillationen wurden die Bedingungen geändert, um eine für die Isolierung der Sesquiterpene ausreichende Menge an ätherischem Öl zu erhalten. 60 g pulverisierte Droge wurden mit 500 ml Aqua destillata und drei Tropfen Silikonöl versetzt und in der gleichen Apparatur zwei Stunden destilliert. Das ätherische Öl wurde in einem Schnappdeckelglas gesammelt, über  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  getrocknet und bei  $-20\text{ }^\circ\text{C}$  gelagert. Beide Ansätze wurden mittels Gaschromatographie mit massenspektrometrischer Detektion (GC-MS) untersucht, um zu überprüfen, ob die Änderung der Destillationsbedingungen Auswirkungen auf die Zusammensetzung des ätherischen Öls hat. Die quantitative Bestimmung erfolgte mit 0,5 ml Xylol als Hilfsphase.

#### 4.1.2 Chromatographische Methoden

##### 4.1.2.1 Trockensäulenchromatographie

Das ätherische Öl des Ingwerwurzelstocks ist ein Gemisch aus vielen Inhaltsstoffen mit unterschiedlicher Polarität. Die Sesquiterpenkohlenwasserstoffe sind neben einigen Monoterpenen die unpolarsten Bestandteile des Öls. Zur Trennung dieser unpolaren Bestandteile von den polareren wurde die trocken säulen chromatographische Fraktionierung nach Kubeczka (1973)<sup>[152]</sup> durchgeführt. Diese wurde in einer früheren Arbeit bei uns bereits verwendet<sup>[153]</sup>, um ätherisches Ingweröl in fünf Fraktionen unterschiedlicher Polarität zu unterteilen. Es wurde ein Chromatographierohr aus Glas mit 22 cm Länge und mit einem Durchmesser von 4,5 cm gewählt. Am unteren Ende dieses Rohres befanden sich eine Glasfritte und ein Zweiwegehahn. Der eine Weg führte über ein Ansatzstück mit Schliff NS 29/32 zum Rundkolben, während der andere Weg an eine Vakuumpumpe angeschlossen war. Als Vorlagen dienten Rundkolben NS 29/32

unterschiedlicher Größen. Kieselgel 60 für die Säulenchromatographie (70-230 mesh) wurde in das Chromatographierohr 15 cm hoch eingerüttelt. 2 ml ätherisches Öl wurden in 8 ml n-Hexan gelöst und gleichmäßig auf die Säule aufgetragen. Der Ansatz wurde mit etwas Watte abgedeckt. Zur Gewinnung der ersten Fraktion wurde mit 800 ml n-Pentan eluiert. Nach Trockenlaufen der Säule folgte eine Elution mit 400 ml 2-Chlorpropan (Fraktion 2). Die trockengelauene Säule wurde im Verhältnis 4:3:3 von unten nach oben dreigeteilt. Die drei Teile wurden aus der Säule entnommen und jeweils in 40 ml Ether/Methanol (4/1) (V/V) suspendiert. Jede Suspension wurde in die leere Säule gefüllt und mit 100 ml des Ether/Methanol-Gemisches portionsweise nachgewaschen. Die so erhaltenen Fraktionen drei, vier und fünf (Säulenanteile von unten nach oben) wurden zur Entfernung des Methanols jeweils zweimal mit 120 ml Aqua demineralisata ausgeschüttelt. Die Etherphase wurde über  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  getrocknet. Alle Fraktionen wurden bei Raumtemperatur und ca. 400 mbar eingeeengt.

#### 4.1.2.2 Dünnschichtchromatographie (DC)

Die erhaltenen Fraktionen sowie das ätherische Öl wurden dünnschichtchromatographisch untersucht, um die Trennung der polareren Bestandteile von den unpolaren Sesqui- und Monoterpenkohlenwasserstoffen sichtbar zu machen. Die Dünnschichtchromatographie wurde auf Aluminiumplatten, beschichtet mit Kieselgel 60  $F_{254}$ , durchgeführt. Als Fließmittel diente Toluol/Ethylacetat im Verhältnis 9/1 (V/V). Die Detektion der Zonen erfolgte unter UV-Licht bei 365 nm, 254 nm und mit Anisaldehyd-Schwefelsäure-Sprühreagenz (hergestellt nach EuAB 6: 0,5 ml Anisaldehyd gemischt mit 10 ml Eisessig, 85 ml Methanol und 5 ml konzentrierter Schwefelsäure). Nach Anwendung des Sprühreagenzes wurden die DC-Kieselgelplatten im Trockenschrank bei 100 °C für etwa 3 Min entwickelt. Die Fraktionen und das Öl wurden vor dem Auftragen 1:100 verdünnt. Von den hergestellten Verdünnungen wurden 4–12  $\mu\text{l}$  auf die DC-Platten aufgetragen. Die Laufstrecke betrug 8,5 cm.

#### 4.1.2.3 Gaschromatographie

Zur weiteren Identifizierung der im ätherischen Öl und in den unterschiedlichen Fraktionen enthaltenen Inhaltsstoffe wurde die Gaschromatographie mit massenspektrometrischer Detektion (GC/MS) herangezogen. Diese Methode diente während des gesamten Aufreinigungs- und Isolierungsprozesses der Sesquiterpenkohlenwasserstoffe zur Qualifizierung und Quantifizierung der in den unterschiedlichen Fraktionen und Unterfraktionen enthaltenen Bestandteile. Die Proben wurden mit n-Hexan

1:500 bis 1:1000 verdünnt und nach folgendem Temperaturprogramm (Tab. 4.1) gaschromatographisch aufgetrennt.

Split	50 : 1
Inlettemperatur	220° C
Carriergas	Helium
Flow	1 ml/min
Detektortemperatur	280 °C

	Heizrate (°C/min)	erreichte Temp. (°C)	Haltezeit (min)	Zeit (min)
Initialzustand		40	0	0
Phase 1	5	125	3	20
Phase 2	0,5	140	0	50
Phase 3	10	250	5	66

Tab. 4.1 Temperaturprogramm der durchgeführten Gaschromatographie

### Lineare Retentionsindizes

Komplexe Ätherisch-Öl-Gemische können gaschromatographisch durch Bestimmung von Retentionsindizes analysiert werden. Bei isothermer Arbeitsweise verhalten sich die Logarithmen der Retentionszeiten innerhalb homologer Reihen auf einer bestimmten stationären Phase und bei einer festgelegten Temperatur wie die Anzahl der Methylen-Gruppen. Das Kovats'sche Retentionsindexsystem beschreibt die Lage einer Verbindung relativ zu zwei benachbarten aliphatischen Kohlenwasserstoffen. Diese Berechnung gilt allerdings nur für die isotherme Arbeitsweise<sup>[154]</sup>. Eine isotherme Arbeitsweise resultiert aber vor allem bei komplexen Gemischen wie ätherischen Ölen in einer ungenügenden Trennleistung. Van den Dool und Kratz<sup>[155]</sup> führten 1963 für die temperaturprogrammierte Arbeitsweise den linearen Retentionsindex (LRI) ein. Zur Bestimmung der linearen Retentionsindizes wurde eine Lösung von n-Alkanen (Octan C<sub>8</sub> bis Pentacosan C<sub>25</sub>) als externer Standard unter gleichen Bedingungen wie die ätherisch-Öl-Proben chromatographiert. Für jeden Peak wurde nach folgender Formel der LRI berechnet. Dieser wurde dann mit Literaturangaben verglichen<sup>[156]</sup>.

$$\text{LRI}_X(T,P,\text{Programm}) = 100 \times n + 100 \times \frac{t(X) - t(n)}{t(n+1) - t(n)}$$

X	Analyt
T	Temperatur
P	stationäre Phase
n	Kettenlänge des Alkans vor dem Analyten
t(n)	Retentionszeit des Alkans vor dem Analyten
t(n-1)	Retentionszeit des Alkans nach dem Analyten
t	Retentionszeit

Zur Identifizierung der einzelnen Inhaltsstoffe wurden die erhaltenen Massenspektren mit der elektronischen Datenbank des National Institute for Safety and Technology (NIST), Gaithersburg, USA, verglichen. Die Quantifizierung der Inhaltsstoffe erfolgte mittels Integration der Peakflächen.

#### 4.1.2.4 Fast Centrifugal Partition Chromatography (FCPC)

Die aus der Trockensäulenchromatographie erhaltene Fraktion 1, mit einem großen Teil der im Öl enthaltenen Sesquiterpenkohlenwasserstoffe, wurde durch die FCPC weiter aufgetrennt. Das Prinzip der FCPC ist die Flüssig/Flüssig-Verteilungschromatographie. Die Trennung erfolgt mit zwei nicht miteinander mischbaren flüssigen Phasen, wobei sich die Inhaltsstoffe der Probe je nach Polarität in beiden Phasen verteilen. In vielen hintereinandergeschalteten Kammern wird die flüssige stationäre Phase durch Rotation fixiert, während die flüssige mobile Phase mit der Probe die Kammern durchfließt. Die Einstellung eines Löslichkeitsgleichgewichtes zwischen beiden Phasen führt zur Trennung der Inhaltsstoffe. Die FCPC ist eine chromatographische Methode, die besonders zur Aufreinigung von Vielstoffgemischen geeignet ist.

#### Vorbereitung der FCPC: Verteilung von Fraktion 1 in obere und untere Phase eines zweiphasigen Lösemittelgemisches per DC

Zunächst wurde im Scheidetrichter das entsprechende Lösungsmittelgemisch ausgeschüttelt. Obere und untere Phase wurden getrennt entnommen und von jeder Phase 0,5 ml in ein Reagenzglas gegeben. Nach Zugabe von 10 µl der Fraktion 1 wurde wiederum geschüttelt. Obere und untere Phase wurden getrennt auf die DC-Platte aufgetragen und die Verteilung der Fraktion 1 in den beiden unterschiedlichen Phasen beurteilt. Ziel war eine möglichst gleichmäßige Verteilung von Fraktion 1 in Ober- und Unterphase. Für die dünnschichtchromatographische Bestimmung wurden Dünnschicht-

chromatographieplatten RP18 F<sub>254S</sub>; 5 x 10 cm verwendet. Als Fließmittel diente Acetonitril. Die entsprechenden Zonen wurden durch Aufsprühen von Anisaldehyd-Schwefelsäure-Sprühreagenz und anschließender Entwicklung im Trockenschrank (5 min bei 105 °C) detektiert. Die Auftragemenge betrug 4 µl.

### **Durchführung der FCPC**

Die FCPC wurde mit dem Lösungsmittelgemisch n-Heptan/Acetonitril/Ethylacetat im Verhältnis 4/6/3 (V/V/V) durchgeführt. Aufgrund der etwas stärkeren Verteilung der Fraktion 1 in der oberen Phase (im Scheidetrichter) wurde diese als stationäre Phase gewählt. Die untere Phase diente als mobile Phase. Es wurde im Descending Modus gearbeitet. 1,2 ml Fraktion 1 (entsprechend 1,03–1,04 g) wurden mit 0,8 ml Unterphase versetzt und nach Äquilibration des Systems injiziert. Die Rotation betrug 1200 RPM bei einem Druck von 20 bar. Die eluierte Lösung wurde mit einem Fraktionssammler in circa 90 Reagenzgläsern gesammelt (1–2 min Füllzeit pro Reagenzglas je nach Elutionsmenge). Dieses Verfahren wurde zweimal durchgeführt, da die Probenschleife auf 2 ml begrenzt war. Die Lösung jedes fünften Reagenzglases wurde dünnschichtchromatographisch unter gleichen Bedingungen wie bei der Vorbereitung der FCPC untersucht. Die aufgetragene Menge betrug 8,4 µl. Im Elutionsbereich der Sesquiterpenkohlenwasserstoffe wurde die Lösung jedes einzelnen Reagenzglases auf die DC-Platte aufgetragen. Die Eluate mit identischen Zonen wurden vereinigt und bei Raumtemperatur und ca. 400 mbar eingeeengt. Die Lagerung der gewonnenen Unterfraktionen erfolgte bei -20 °C. Zur näheren Identifizierung und Quantifizierung der einzelnen Komponenten wurde zu jeder gewonnenen Unterfraktion ein Gaschromatogramm mit massenspektrometrischer Detektion erstellt (Probenverdünnung in n-Hexan 1:1000).

#### **4.1.2.5 Analytische High Performance Liquid Chromatography (HPLC)**

Zur Bestimmung der geeigneten Bedingungen (Fließmittelsystem und Art der Säule) für die präparative HPLC wurden geringe Mengen der Proben mittels analytischer HPLC chromatographiert. Die HPLC wurde mit einer Supelco Discovery C18 Säule (5cm x 4.6mm, 5 µm) und Acetonitril als Fließmittel durchgeführt. Die Detektion erfolgte mit UV-Detektion bei 215 nm.

#### **4.1.2.6 Präparative HPLC**

Durch die präparative HPLC wurden aus Unterfraktionen der FCPC die Sesquiterpenkohlenwasserstoffe  $\alpha$ -Curcumen und  $\beta$ -Sesquiphellandren isoliert oder

angereichert. Die präparative HPLC wurde mit einer Eurospher 100C18 Säule (250 x 20 mm, No 13011111) und einer Elution mit 100 % Acetonitril durchgeführt. Die Detektion der Substanzen erfolgte mit einem UV-Detektor bei 205 nm und 254 nm. Die eluierten Fraktionen wurden bei Raumtemperatur und 400 mbar vorsichtig eingengt und bei -20 °C gelagert. Eine Identifizierung der eluierten Substanzen erfolgte wiederum mittels GC/MS.

### 4.1.3 Isolierung von $\alpha$ -Zingiberen

Das Sesquiterpen  $\alpha$ -Zingiberen konnte durch die angewendeten chromatographischen Methoden nicht isoliert werden, da es unter Lösemiteleinfluss und Sauerstoffkontakt sehr schnell zu  $\alpha$ -Curcumen oxidiert wird. Zur Isolierung wurde somit eine Methode gewählt, die bereits durch Millar *et al.*<sup>[157]</sup> beschrieben wurde. Durch Wasserdampfdestillation gewonnenes Öl der Firma Caelo (Oleum Zingiberis - Zingiber officinale ROSCOE; Ch.B. 6141522) wurde als Ausgangssubstanz gewählt, da in diesem Ingweröl eine relativ große Menge (ca. 31 %) an  $\alpha$ -Zingiberen vorhanden ist. Aus den gaschromatographisch ermittelten Retentionszeiten wurden im Vergleich mit den Retentionszeiten der Octanreihe die linearen Retentionsindizes bestimmt und die enthaltenen Substanzen identifiziert.

#### 4.1.3.1 Vakuumdestillation – Anreicherung der Sesquiterpene

Zur Trennung von Monoterpenen und Sesquiterpenen wurde die Vakuumdestillation herangezogen. In Tab. 4.2 sind die Siedepunkte der Inhaltsstoffgruppen des Ingweröls unter Normaldruck und bei angelegtem Vakuum von 23–30 mbar aufgeführt.

	Siedepunkte bei Normaldruck [°C]	errechnete Siedepunkte bei 23–30 mbar [°C]
Monoterpenkohlenwasserstoffe	150–190	ca. 60–85
oxygenierte Monoterpene	190–245	ca. 85–135
Sesquiterpenkohlenwasserstoffe	240–280	ca. 130–155

Tab. 4.2 Siedepunkte der Inhaltsstoffgruppen des Ingweröls

Die Apparatur zur Vakuumdestillation bestand aus einem 25 ml-Rundkolben mit Schliff, der über einen Kühler und eine Spinne mit vier 5 ml-Rundkolben verbunden war. Der 25 ml-Rundkolben wurde in einem Ölbad auf die erforderliche Temperatur erhitzt, wobei der Übergang zum Kühler mit Alufolie abgedichtet wurde. Das Vakuum von 23–30 mbar wurde mittels Wasserstrahlpumpe erzeugt. Es wurden vier Vakuumdestillationen mit 3,5 g bis 5 g ätherischem Öl durchgeführt und jeweils vier Fraktionen gesammelt. Die Identifizierung und Quantifizierung der Inhaltsstoffe erfolgte per GC/MS (Bedingungen siehe 4.1.2.3). Die identischen Fraktionen der Destillationen wurden vereinigt.

#### 4.1.3.2 Kopplung zum Diels-Alder-Produkt

Das genuin vorliegende  $\alpha$ -Zingiberen weist eine ähnliche Polarität auf wie die weiteren im ätherischen Ingweröl vorliegenden Sesquiterpenderivate. Die chromatographische Trennung erfordert vielfache Trennungsschritte und ein großes Probenvolumen. Die chemische Instabilität des  $\alpha$ -Zingiberens stellt ein zusätzliches Problem dar. Durch die Kopplung zum Diels-Alder-Produkt werden in das Molekül des  $\alpha$ -Zingiberens selektiv hydrophile Gruppen eingebaut. Die erhöhte Polarität ermöglicht eine unproblematische chromatographische Trennung von ungekoppelt vorliegenden Sesquiterpenkohlenwasserstoffen.

#### Prinzip der Diels-Alder Reaktion

Bei der Diels-Alder Reaktion wird ein konjugiertes Dien an ein Alken addiert, wodurch Cyclohexenderivate entstehen (Abb. 4.1).

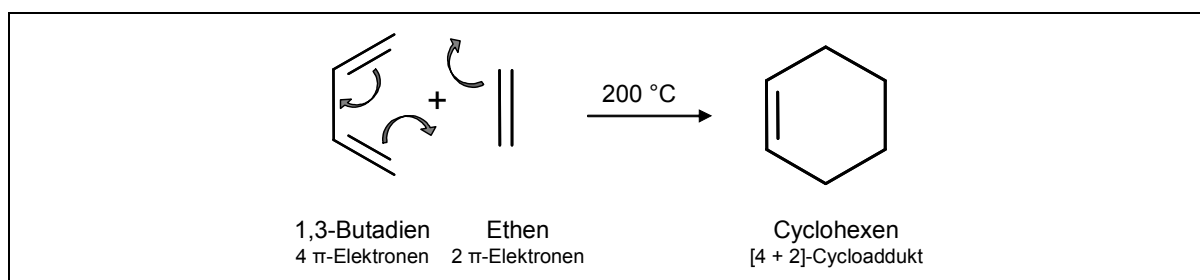


Abb. 4.1 Schematische Darstellung des Mechanismus der Diels-Alder-Reaktion

Die dargestellte Reaktion zwischen 1,3-Butadien und Ethen resultiert in nur 20 % Ausbeute. Man nimmt für diese Reaktion bevorzugt elektronenarme Alkene und elektronenreiche Diene, um eine höhere Ausbeute zu erzielen. Die Diels-Alder-Reaktion ist eine konzertiert verlaufende Reaktion, in der Bindungsbruch und Bindungsbildung gleichzeitig erfolgen. Der Reaktionsverlauf ist stereospezifisch. Die ursprünglichen

Konfigurationen des Diens und des Dienophils bleiben erhalten, und das entstandene Cycloaddukt kann wieder in seine Ausgangsbestandteile gespalten werden. Man spricht hier von einer Retro-Diels-Alder-Reaktion<sup>[158, 159]</sup>.

### Reaktion von $\alpha$ -Zingiberen und PTAD

In der durch die Vakuumdestillation erhaltenen vierten Fraktion stellt  $\alpha$ -Zingiberen das einzige Dien dar und kann somit selektiv mit dem reaktiven Dienophil 4-Phenyl-1,2,4-triazolin-3,5-dion (PTAD) zu einem Diels-Alder-Addukt reagieren. Die Reaktionsgleichung ist in Abb. 4.2 dargestellt.

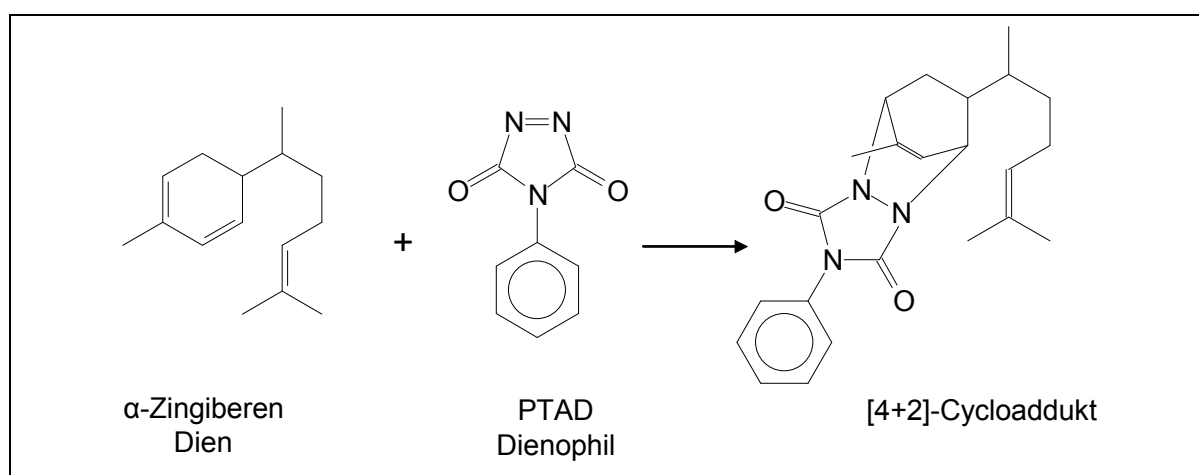


Abb. 4.2 Cycloaddition von  $\alpha$ -Zingiberen an PTAD

2 g Sesquiterpenfraktion (ca. 9 mmol Sesquiterpene) wurden in einem Dreihalskolben mit Schliff unter Stickstoffatmosphäre in 20 ml frisch destilliertem, trockenem THF gelöst. Das Gemisch wurde tropfenweise mit einer Lösung von PTAD (4-Phenyl-1,2,4-triazolin-3,5-dion) in THF (Konzentration 1 g/10 ml) versetzt. Die vollständige Reaktion wurde durch Persistieren der Rotfärbung des PTADs angezeigt. Die Diels-Alder-Kopplung wurde bei Raumtemperatur durchgeführt, um ein frühzeitiges Spalten des Cycloadduktes zu vermeiden. Das Gemisch wurde mit dem Rotationsverdampfer bei ca. 250 mbar und ohne Wärmeanwendung einrotiert. Eine zähflüssige rosa - gelb gefärbte Masse blieb als Rückstand im Kolben zurück.

#### 4.1.3.3 Flash-Chromatographie (FC) zur Isolierung des gekoppelten Produktes

Das gekoppelte Diels-Alder-Cycloaddukt wurde mittels Flash-Chromatographie isoliert. Zur Vorbereitung der FC wurde mittels Dünnschichtchromatographie auf DC-



Aluminiumplatten Kieselgel 60 F<sub>254</sub> das geeignete Fließmittelsystem ermittelt. Ziel hierbei ist es, einen Rf-Wert-Unterschied größer als 0,2 zwischen der zu isolierenden Komponente und allen weiteren Komponenten zu erhalten. Das in der Literatur<sup>[157]</sup> empfohlene Fließmittelgemisch von 15 % (V/V) Aceton in n-Hexan erfüllte diese Bedingung und wurde bei der Durchführung der FC als Fließmittel eingesetzt. Als stationäre Phase wurde Kieselgel 60 (230-400 mesh) gewählt. Von diesem wurden 65 g Kieselgel in die Säule (Länge 35 cm, Durchmesser 3,5 cm) eingerüttelt, wodurch eine Füllhöhe von 15–16 cm erreicht wurde. Pro Säule wurden zwischen 0,5 und 0,8 g des aus der Diels-Alder-Reaktion erhaltenen Gemisches eingesetzt. In das Lösemittelreservoir oberhalb der Säule wurden 500–600 ml Lösungsmittel (15 % (V/V) Aceton in n-Hexan) eingefüllt. Durch Anlegen von Stickstoffdruck wurde eine Fließgeschwindigkeit von 10-12 ml pro Minute eingestellt, wobei das eluierte Lösemittel in Reagenzgläsern (15–20 ml pro Reagenzglas) aufgefangen wurde. Der Inhalt der Reagenzgläser wurde dünnschichtchromatographisch unter gleichen Bedingungen wie zur Vorbereitung der FC untersucht. Die Detektion erfolgte durch Fluoreszenzlöschung und Farbdetektion mit Anisaldehyd-Schwefelsäure-Reagenz. Die Fraktionen, in denen das Cycloaddukt vorhanden war, wurden vereinigt. Mit dem Rotationsverdampfer wurde das organische Lösemittel abgedampft und das gekoppelte Produkt blieb im Rundkolben zurück. Nach diesem Schema wurden zur Erhöhung der Ausbeute fünf Flash-Chromatographiesäulen durchgeführt. Von dem erhaltenen gekoppelten Addukt wurde ein <sup>1</sup>H-NMR-Spektrum erstellt.

#### 4.1.3.4 Retro-Diels-Alder-Reaktion

Das gekoppelte Cycloaddukt sollte in Form einer Retro-Diels-Alder-Reaktion wieder in seine Ausgangsstoffe gespalten werden. Es wurde unter Stickstoffatmosphäre gearbeitet, um eine Oxidation von  $\alpha$ -Zingiberen zu ar-Curcumen zu verhindern. 0,39 g (entsprechend 1,03 mmol) des aus der Flash-Chromatographie erhaltenen Produktes wurden drei Stunden in 10 ml 2,1 M KOH in 96 % (V/V) EtOH unter Stickstoffatmosphäre rückflusserhitzt. Die abgekühlte Mischung wurde mit Aqua demineralisata verdünnt und dreimal mit 25 ml n-Hexan ausgeschüttelt. Der erhaltene Hexanextrakt wurde mit gesättigter wässriger NaCl-Lösung gewaschen, über Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> getrocknet und bei 250 mbar auf wenige ml eingengt.

#### 4.1.3.5 Flash-Chromatographie zur Reinigung des $\alpha$ -Zingiberens

Die vollständige Isolierung des  $\alpha$ -Zingiberens erfolgte mittels Flash-Chromatographie. Wie unter 4.1.3.3 beschrieben, wurde zur Vorbereitung der FC das Fließmittelsystem per DC ermittelt. n-Hexan (nach Angabe von Millar<sup>[157]</sup>) erwies sich als geeignetes Fließmittel

zur Trennung des  $\alpha$ -Zingiberen von weiteren Bestandteilen, wie im Prozess entstandenen polareren Stoffen und Spuren von Anilin. Die Präparation und Durchführung der Säule verlief identisch wie in Abschnitt 4.1.3.3. Jedoch wurden hier nur ca. 50 g Kieselgel eingerüttelt. Das gesamte aus der Retro-Diels-Alder-Reaktion erhaltene Gemisch wurde auf die Säule aufgetragen. Das eluierte Fließmittel wurde in kleinen Fraktionen in Reagenzgläsern aufgefangen. Anschließend wurde der Inhalt jeweils dünnschichtchromatographisch (Fließmittel n-Hexan) untersucht. Alle Fraktionen, die die entsprechende  $\alpha$ -Zingiberen-Zone bei einem Rf-Wert von 0,75 bis 0,8 ohne jegliche Begleitzone enthielten, wurden vereinigt. Unter vorsichtigem Anlegen von Vakuum (maximal 250 mbar) wurde das Lösungsmittel am Rotationsverdampfer vollständig entfernt. Es blieb eine farblose Flüssigkeit mit aromatischem Geruch zurück. Zur Identifizierung wurden sowohl GC/MS-Chromatogramme als auch  $^1\text{H}$ -NMR- und  $^{13}\text{C}$ -NMR-Spektren erstellt. Die kurzzeitige Lagerung des  $\alpha$ -Zingiberens bis zur Versuchsdurchführung erfolgte unter Stickstoffatmosphäre bei  $-20\text{ }^\circ\text{C}$ .

## 4.2 Pharmakologische Untersuchungen

### 4.2.1 Zellkultur

#### N1E-115- Zellen

N1E-115 Zellen (Passagen 38–65) wurden im [ $^{14}\text{C}$ ]Guanidinium-Influx-Assay und in Bindungsstudien verwendet. Die Zelllinie wurde zweimal wöchentlich passagiert. Hierzu wurde das Medium entfernt und durch frisches Zellkulturmedium ersetzt. Nach Abschlagen der Zellen und Zentrifugation bei 300 x g wurde der Überstand abgesaugt. Das erhaltene Pellet wurde in frischem Medium resuspendiert und die Zellzahl mittels Zählung in einer Neubauerzählkammer bestimmt. Die Kultivierung erfolgte in 75 cm<sup>2</sup> großen Zellkulturflaschen im Zellkulturschrank in einer Atmosphäre von 5 % CO<sub>2</sub> und 95 % Luft. Drei Tage vor Versuchsbeginn wurden die Zellen in 24er Multiwellplatten zu 2,5 x 10<sup>4</sup> Zellen in 1000 µl pro Well ausgesät.

#### INS-1 Zellen

Zur Passagierung der INS-1 Zellen wurde das Medium abgesaugt und die Zellen wurden mit PBS Puffer gewaschen. Anschließend wurde für 2–4 Minuten eine Trypsin/EDTA-Lösung zugesetzt, um die Zellen enzymatisch vom Zellkulturflaschenboden zu lösen. Die enzymatische Reaktion wurde durch Zusatz von kaltem Zellkulturmedium beendet. Die Zellen wurden durch Abschlagen vom Boden der Zellkulturflasche in Suspension gebracht. Das weitere Vorgehen und die Kultivierungsbedingungen entsprechen der N1E-Zellkultur. Fünf bis sechs Tage vor Versuchsbeginn wurden die INS-1 Zellen in einer Menge von 1,5 x 10<sup>5</sup> pro 1000 µl in 24er Multiwellplatten ausgesät.

### 4.2.2 [ $^{14}\text{C}$ ]Guanidinium-Influx-Assay

Die Messung des Ioneneinstroms an murinen Neuroblastomazellen N1E-115 mit [ $^{14}\text{C}$ ]Guanidiniumchlorid als Marker ist eine geeignete Methode, um den Einfluss von Testsubstanzen auf den Ionenkanal des 5-HT<sub>3</sub>-Rezeptors zu untersuchen<sup>[160]</sup>. Der Influx des Kations [ $^{14}\text{C}$ ]Guanidinium weist ähnliche Eigenschaften auf wie der des <sup>22</sup>Na<sup>+</sup>-Isotops und kann zur Bestimmung der Kationen-Permeabilität von Natriumkanälen eingesetzt werden<sup>[161]</sup>.

Die Versuche wurden in 24er Multiwellplatten in einem Gesamtvolumen von 300 µl pro Well durchgeführt. Nach Absaugen des Zellkulturmediums wurden die Zellen zweimal mit 37 °C warmem Inkubationspuffer gewaschen und 20 Minuten mit Inkubationspuffer und

den zu testenden Substanzen im Zellkulturschrank vorinkubiert. Anschließend wurden 5  $\mu\text{M}$  [ $^{14}\text{C}$ ]Guanidiniumchlorid (spezifische Aktivität 55 mCi/mmol) und 100  $\mu\text{M}$  Serotonin zugegeben. Nach 2,5 Minuten wurde die Inkubation durch Absaugen und schnelles zweimaliges Waschen mit eiskaltem Waschpuffer beendet. Die Zellen wurden in 200  $\mu\text{l}$  0,1 %iger Triton X 100-Lösung 30 Minuten lysiert und in eine Softwellplatte überführt. Nach Zugabe von Szintillationslösung wurde der Gehalt an [ $^{14}\text{C}$ ]Guanidinium mittels Flüssigszintillationsmessung bestimmt. Der Serotonin-vermittelte [ $^{14}\text{C}$ ]Guanidinium-Influx ohne jeglichen Zusatz von Testsubstanzen galt als Referenzwert (100 %-Wert). Parallel erfolgte die Bestimmung eines Blindwertes ohne Zugabe von Serotonin, der von allen Werten abgezogen wurde, und eine Positivkontrolle mit 100  $\mu\text{M}$  Tropicsetron (Übersicht siehe Tab. 4.3). Alle Versuche wurden als Doppelbestimmungen durchgeführt.

Blindwert	100 %-Wert	Positivkontrolle	Testwell
N1E-Zellen	N1E-Zellen	N1E-Zellen	N1E-Zellen
Inkubationspuffer	Inkubationspuffer	Inkubationspuffer	Inkubationspuffer
[ $^{14}\text{C}$ ]Guanidinium	[ $^{14}\text{C}$ ]Guanidinium	[ $^{14}\text{C}$ ]Guanidinium	[ $^{14}\text{C}$ ]Guanidinium
Keine Zusätze	Serotonin	Serotonin	Serotonin
		Tropicsetron	Testsubstanz

**Tab. 4.3** Inhalte der einzelnen Wells zur Bestimmung des [ $^{14}\text{C}$ ]Guanidinium-Influx

Die N1E-Zellen enthalten neben 5-HT<sub>3</sub>-Rezeptoren weitere Ionenkanalrezeptoren wie den tetrodotoxinsensitiven, spannungsabhängigen Natriumkanal, dessen Offenwahrscheinlichkeit durch das Alkaloid Veratridin erhöht werden kann. Auch diese Kanäle können den Kationeneinstrom während des Experiments beeinflussen, wobei dieser Einfluss im [ $^{14}\text{C}$ ]Guanidinium-Influx-Assay durch den Blindwert kontrolliert wird. Um zu überprüfen, ob eine Hemmung des Serotonin-induzierten [ $^{14}\text{C}$ ]Guanidinium-Influsses überwiegend durch Antagonismus am 5-HT<sub>3</sub>-Rezeptor-Kanalprotein oder auch durch Effekte an spannungsabhängigen Natriumkanälen zustande kommt, wurden zusätzliche Experimente durchgeführt. Hierzu wurde in dem zuvor beschriebenen Assay 100  $\mu\text{M}$  Serotonin durch 300  $\mu\text{M}$  Veratridin ersetzt und der Effekt im Veratridinversuch dem Effekt im Serotonin-Assay gegenübergestellt.

### 4.2.3 Bindungsstudien an N1E-115 Zellen

Rezeptorbindungsstudien werden durchgeführt, um die Affinität von Wirkstoffen zu einem Rezeptor oder die Rezeptordichte in Gewebe- und Zellproben zu bestimmen. Im Rahmen pharmakologischer Untersuchungen werden zwei Arten von Bindungsstudien

unterschieden: Verdrängungsstudien und Sättigungsstudien. Zur direkten Bestimmung der Affinität eines radioaktiv markierten Liganden zum Rezeptor und der Bestimmung der Rezeptordichte in Gewebeproben werden Sättigungsexperimente verwendet. Unterschiedliche Konzentrationen eines Radioliganden werden mit dem Rezeptor inkubiert, wobei mit steigender Radioligandmenge die Menge an Radioligand-Rezeptorkomplex hyperbol ansteigt. Bedingung hierbei ist, dass die an den Rezeptor bindende Substanz radioaktiv markiert ist. Bei den im Rahmen der Arbeit verwendeten Testsubstanzen handelt es sich um pflanzliche Biosyntheseprodukte und Vielstoffgemische, die in radioaktiv markierter Form nicht erhältlich sind. In diesen Fällen werden Verdrängungsstudien durchgeführt. Diese Art von Studien wird angewendet, um die Affinität eines unmarkierten Liganden zum Rezeptor indirekt zu bestimmen. In einer Verdrängungsstudie konkurrieren unterschiedliche Konzentrationen eines unmarkierten Liganden mit einer konstanten Menge eines Radioliganden um den Rezeptor. Je niedriger die gemessene Radioaktivität, desto mehr wurde der Radioligand durch die Testsubstanz vom Rezeptor verdrängt. Neben der spezifischen Bindungsstelle am Rezeptor kann der Radioligand an weiteren Stellen der Probe, wie zum Beispiel an anderen Rezeptoruntereinheiten, Gewebekomponenten oder Plastikelementen der Gefäße unspezifisch binden. Man bestimmt diese unspezifische Bindung durch Zugabe des Radioliganden zusammen mit einer hohen Konzentration eines unmarkierten Liganden, der spezifisch an die untersuchte Bindungsstelle bindet und somit den Radioligand von diesen Bindungsstellen komplett verdrängt. Die Radioaktivität, die dann noch in der Probe messbar ist, wird als Non-Specific-Binding bezeichnet; wahrscheinlich handelt es sich um eine physikalisch bedingte Adsorption, die nicht sättigbar ist. Die Grundschrirte der Rezeptorbindungstudien sind in Abb. 4.3 dargestellt.



**Abb. 4.3 Grundschrirte von Rezeptorbindungstudien**

Bindungsstudien können an Membranpräparationen oder ganzen Zellen in Monolayerkultur oder als Suspensionskultur durchgeführt werden. Vorteile bei der

Verwendung von ganzen Zellen sind zum einen, dass die Rezeptoren in ihrer physiologischen Umgebung untersucht werden und zum anderen eine vereinfachte Durchführung, da man auf die Herstellung einer Membranpräparation verzichten kann. Nachteil ist die Verfälschung des Ergebnisses durch die Aufnahme der radioaktiven Substanz in die Zelle. Bindungsstudien mit Membranpräparationen eignen sich vor allem bei einem hohen Probendurchsatz<sup>[162]</sup>. Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurden die Rezeptorbindungsstudien an N1E-115 Zellen in Monolayerkultur durchgeführt. Der radioaktiv markierte 5-HT<sub>3</sub>-Rezeptor-Antagonist [<sup>3</sup>H]GR65630 bindet selektiv an die gleiche Bindungsstelle am 5-HT<sub>3</sub>-Rezeptor wie Tropicsetron und wird somit durch dieses von der Rezeptorbindungsstelle verdrängt<sup>[77]</sup>. Testsubstanzen, die im [<sup>14</sup>C]Guanidinium-Influx-Versuch den Kationeneinstrom vermindern, sollten nun auf ihren Effekt auf die Bindung von [<sup>3</sup>H]GR65630 untersucht werden, um die Bindungsstelle zu identifizieren. Die Versuche an N1E-115 Zellen wurden am dritten Tag nach Aussäen in 24er Multiwellplatten in einem Gesamtvolumen von 200 µl durchgeführt. Nach Absaugen des Zellkulturmediums wurden die Zellen zweimal mit angewärmtem Krebs-Ringer-HEPES-Puffer gewaschen und mit demselben Puffer und den Testsubstanzen, Tropicsetron (Positivkontrolle) oder 10 mM Serotonin (unspezifische Bindung) versetzt. Danach folgte die Zugabe von 0,4 nM [<sup>3</sup>H]GR65630 (spezifische Aktivität 76,4 Ci/mmol) und eine 30-minütige Inkubation bei Raumtemperatur (Pipettierschema siehe Tab. 4.4).

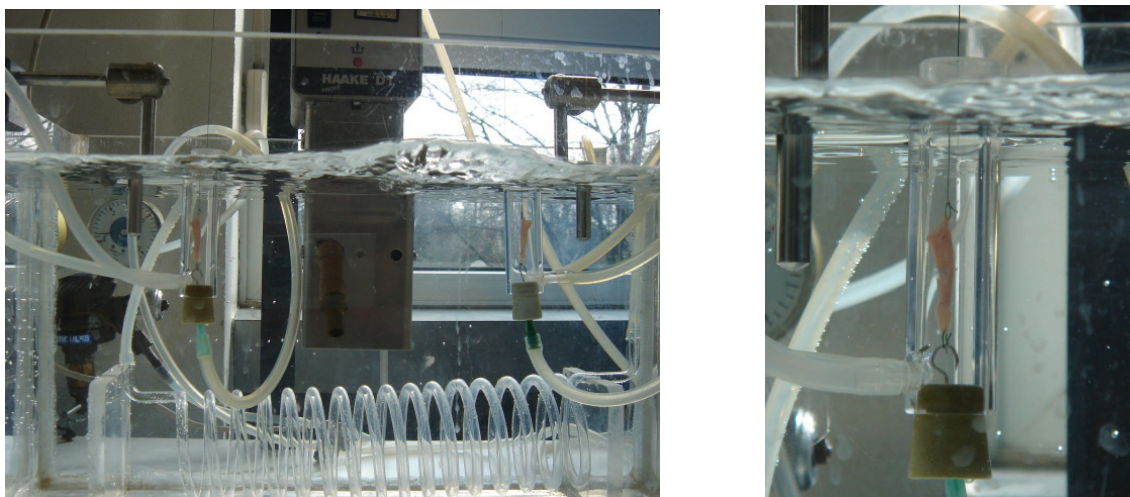
Gesamtbindung	Unspezifische Bindung	Positivkontrolle	Testwell
Rezeptor KRH-Puffer [ <sup>3</sup> H]GR65630	Rezeptor KRH-Puffer [ <sup>3</sup> H]GR65630 Serotonin 10 mM	Rezeptor KRH-Puffer [ <sup>3</sup> H]GR65630 Tropicsetron	Rezeptor KRH-Puffer [ <sup>3</sup> H]GR65630 Testsubstanz

**Tab. 4.4** Inhalte der Wells bei Durchführung der Rezeptorbindungsstudien

Durch Absaugen des Überstandes und schnelles zweimaliges Waschen mit eiskaltem Krebs-Ringer-HEPES-Puffer wurde die Inkubation beendet. Die Zellen wurden mit 0,1 %iger Triton X 100-Lösung 30 min bei Raumtemperatur lysiert und in 24er Softwells übertragen. Nach Zugabe von Szintillationslösung wurden die Proben im Betacounter vermessen. Alle Versuche wurden als Doppelbestimmungen durchgeführt. Die unspezifische Bindung wurde von allen ermittelten Ergebnissen abgezogen (Gesamtbindung – unspezifische Bindung = spezifische Bindung). Alle daraus resultierenden Werte wurden auf die spezifische Bindung als 100 %-Wert bezogen.

#### 4.2.4 Versuche am Rattenileum

Pfefferminzöl und der ölige Ingwer-Spezialextrakt sollten auf ihren Effekt auf die Serotonin-induzierte Kontraktion am Rattenileum untersucht werden. Als Versuchsvorbereitung wurde das die Organbäder umgebende Wasserbad auf 37 °C erwärmt und der hergestellte Krebs-Henseleit-Puffer mit Carbogen begast. Der Puffer wurde aus dem Vorratsbehältnis über eine Glasspirale, die im 37 °C warmen Wasserbad lag, in das Organbad geleitet. Sowohl das Pufferbehältnis als auch die Organbäder wurden während des gesamten Versuchsablaufs mit Carbogen begast. Weibliche und männliche Wistar-Ratten mit einem Gewicht zwischen 180 und 300 g wurden durch Ethernarkose getötet. Das Ileum wurde so schnell wie möglich entnommen, in Puffer gelegt, von Bindegewebe befreit und mit Puffer gespült. Der Darm wurde in circa 2 cm lange Stücke geschnitten. An beiden Enden der Darmabschnitte wurden mit einem dünnen Faden Ösen angebracht. Danach wurde das Ileum in das mit 10 ml Krebs-Henseleit-Puffer gefüllte Organbad eingehängt. Hierzu wurde das Organ am unteren Ende an einer gebogenen Kanüle befestigt, durch die auch die Begasung des Organbades erfolgte. Die Öse am oberen Ende wurde mit einem Hebelarm verbunden, der alle Kontraktionen und Relaxationen des Organs an Verstärker und Schreiber weiterleitet. In Abb. 4.4 sind die Organbäder mit eingehängten Organen dargestellt.



**Abb. 4.4** Fotografien des im Organbad eingehängten Ileums

Links ist das temperierbare Wasserbad mit beiden Organbädern dargestellt. Auf dem rechten Foto sieht man ein einzelnes Organbad mit dem eingehängten Ileum.

Der eingehängte Darm wurde unter 1 g Spannung gehalten und mehrmals mit Puffer gespült. Bis zur Equilibrierung, also dem Erreichen einer konstanten Basislinie, vergingen 45–60 Minuten. Zu Beginn jedes Experimentes wurde zunächst ein Referenzwert

bestimmt. Dazu wurde der Darm mit 10  $\mu\text{M}$  Serotonin als Stimulans versetzt und die resultierende Kontraktion aufgezeichnet. Danach wurde der Darm sechs bis acht Mal mit Puffer gespült und wiederum 30 Minuten equilibriert. Nach Erreichen der Basislinie wurde die Testsubstanz zupipettiert. Das Ileum wurde vier bis sechs Minuten mit der jeweiligen Testsubstanz vorinkubiert, bevor wieder 10  $\mu\text{M}$  Serotonin zugegeben wurden, um den Effekt der eingesetzten Substanzen auf die induzierte Kontraktion zu bestimmen. Nach Abnahme der Kontraktion wurde das Experiment durch vielfaches Spülen des Darms mit Puffer beendet. Das gründliche Spülen ist hier sehr wichtig, da die oft sehr lipophilen Substanzen an Organ und Gefäßwänden anhaften. Nach 30 Minuten wurde ein neuer Versuch wiederum mit Bestimmung eines Referenzwertes eingeleitet. Zur Bestimmung des Eigeneffektes des Pfefferminzöls wurde 1  $\mu\text{M}$  Acetylcholin zur Referenzwertbestimmung eingesetzt, da dies im Vergleich zu Serotonin stärkere Kontraktionen am Ileum hervorruft und als Referenz gut geeignet ist. Nach Ausspülen und 30-minütiger Equilibrierung erfolgte die Zugabe unterschiedlicher Konzentrationen von ätherischem Pfefferminzöl. Die resultierende Relaxation wurde bis zum Erreichen einer Basislinie aufgezeichnet. Sowohl der Eigeneffekt der Testsubstanzen vor Stimulanzzugabe als auch der Effekt durch Serotonin oder Acetylcholin unter Testsubstanzeinfluss wurden auf den vorher ermittelten Referenzwert bezogen und in Prozentwerten angegeben.

#### **4.2.5 Insulinsekretionsversuche und Radioimmunoassay**

##### **Insulinsekretionsversuche**

Die *in vitro*-Experimente zur Insulinsekretion an INS-1 Zellen wurden durchgeführt, um den Effekt von Serotonin, Ingwerextrakten und unterschiedlichen Serotoninrezeptor-Antagonisten auf die Insulinsekretion zu untersuchen. 24er Multiwellplatten mit konfluent gewachsenen INS-1 Zellen wurden nach Entnahme aus dem Brutschrank auf Eiswasser gelegt, um eine Insulinsekretion vor Beginn der Inkubationszeit zu vermeiden. Alle verwendeten Puffer und Stammlösungen wurden vor Verwendung in Eiswasser auf 4 °C abgekühlt. Nach Absaugen des Zellkulturmediums wurden die Zellen dreimal mit KRH-Puffer gewaschen. Die Wells wurden nach folgendem Pipettierschema mit Puffer und den entsprechenden Substanzen befüllt (Tab. 4.5).



Basalsekretion	100 % Wert	Positivkontrolle	Testwell
300 µl 3,0 mM Glucose in KRH-Puffer	300 µl 5,6 mM Glucose in KRH-Puffer	270 µl 6,22 mM Glucose in KRH- Puffer + 30 µl 10 µg/ml Glibenclamid in KRH- Puffer	270 µl 6,22 mM Glucose in KRH- Puffer + 30 µl Testsubstanzen (10-fach konzentriert in KRH-Puffer)

**Tab. 4.5** Inhalte der Wells bei Durchführung der Insulinsekretionsversuche

Nach Zugabe der Lösungen erfolgte eine Inkubation im Zellkulturschrank über 90 Minuten. Die Multiwellplatte wurde danach direkt auf Eiswasser gestellt, um eine weitere Insulinsekretion zu unterbinden. Aus jedem Well wurden 150 µl des Überstandes abgenommen, in Eppendorf Cups übertragen und bis zur Durchführung des Radioimmunoassays bei -20 °C tiefgefroren. Die Insulinsekretion der Zellen unter einem Glucosestimulus von 5,6 mM ohne Zusatz weiterer Substanzen diente als Referenzwert (100 %-Wert). Alle ermittelten Werte wurden prozentual auf diesen Wert bezogen, von dem jeweils eine Vierfachbestimmung durchgeführt wurde. Die Basalsekretion bei 3,0 mM Glucose und die Positivkontrolle mit Glibenclamid, die eine Stimulierbarkeit der Zellen über den 100 %-Wert hinaus erfasst, wurden als Kontrollwerte herangezogen.

### Radioimmunoassay

Die Bestimmung der Insulinmenge erfolgte mittels Radioimmunoassay (RIA) nach der Doppelantikörpermethode<sup>[163]</sup>. Prinzip dieser Methode ist, dass der Probe radioaktiv markiertes [<sup>125</sup>I]Insulin zugesetzt wird, das mit dem unmarkierten Insulin der Probe um die Bindungsstellen eines Anti-Ratteninsulin-Antikörpers konkurriert. Der zweite Antikörper ist gegen die Spezies gerichtet, aus der der erste Antikörper stammt und verstärkt eine Fällung. Durch Zugabe eines Carriers erfolgt die Fällung des Antigen-Antikörper-Antikörper-Komplexes. Je mehr unmarkiertes Insulin in der Probe vorhanden ist, desto weniger [<sup>125</sup>I]Insulin ist im ausgefällten Pellet gebunden. Die Zerfallsrate des gebundenen [<sup>125</sup>I]Insulins kann im Gammacounter vermessen werden. Parallel wird durch Proben mit bekanntem Insulingehalt eine Kalibriergerade erstellt, anhand der die unbekannte Insulinkonzentration der Proben ermittelt werden kann. Da es sich um eine Antigen-Antikörper-Methode handelt, wird nur das immunoreaktive Insulin (IRI) bestimmt. Die verwendeten Pufferlösungen wurden vor Beginn des Radioimmunoassays in Eiswasser abgekühlt. Alle Arbeitsschritte erfolgten im Eisbad oder im Kühlschranks bei 4 °C. Die tiefgefrorenen Proben wurden langsam in Eiswasser aufgetaut und mittels eines

Pipettierautomaten 1:20 mit KRH-Puffer verdünnt. Von dieser Verdünnung wurden 10 µl im Assay eingesetzt und mit Assaypuffer auf 200 µl aufgefüllt. Parallel wurden für die Kalibrierkurve sechs Standardinsulinkonzentrationen mit 0,78125 µU/100 µl bis 25 µU/100 µl eingesetzt. 100 µl jeder Standardkonzentration wurde mit 100 µl Assaypuffer verdünnt, so dass auch hier ein Probenvolumen von 200 µl erhalten wurde. Zur Bestimmung der maximalen Bindung ( $B_0$ ) wurden 200 µl Assaypuffer eingesetzt (entsprechend 0 µU Insulin). Jeder Probe wurden zunächst 100 µl [ $^{125}$ I]Insulin-Verdünnung in Isotopenpuffer und dann 100 µl Anti-Insulin-IgG (Antikörper I) zugesetzt. Zur Bestimmung der eingesetzten Radioaktivität („Total counts“) wurden 100 µl der [ $^{125}$ I]Insulin-Verdünnung vermessen. Unter der unspezifischen Bindung (NSB; „nonspecific binding“) versteht man den Gehalt von [ $^{125}$ I]Insulin im Pellet ohne den Zusatz von Antikörper I. Um diese zu erfassen, wurden Probe und Antikörper I durch 300 µl Assaypuffer ersetzt. Die Bestimmungen der Standards, der Total counts, des NSB und der  $B_0$  erfolgten jeweils als Doppelbestimmungen. Die Proben wurden über Nacht bei 4 °C inkubiert. Am nächsten Tag wurden in alle Probengefäße, mit Ausnahme der „Total-count“-Bestimmung, 1000 µl Anti-Meerschweinchen-IgG (Antikörper II) und 10 µl der Carrier-Verdünnung pipettiert. Nach 2–3 Stunden Inkubation im Kühlschrank wurden alle Proben bis auf die Total-count-Gefäße mit 1000 µl Waschpuffer versetzt und 20 Minuten bei 4 °C mit 3500 x g zentrifugiert. Der Überstand wurde vorsichtig abdekantiert und am Rand des Tubes befindliche Flüssigkeit mit einem Zellstofftuch aufgenommen. Anschließend wurde das Pellet im Gammacounter vermessen. Mit Hilfe des Softwareprogramms des Gammacounters erfolgte durch die Erstellung der Kalibriergerade ( $B/B_0$  gegen [µU] der Standardkonzentrationen; B = gebundenes [ $^{125}$ I]Insulin der Probe) die Umrechnung der Zerfallraten in die enthaltenen Insulinkonzentrationen in [µU]. Bei fehlerhafter Berechnung der Kalibriergerade (z.B. durch Eliminierung von Standards) wurde die Auswertung mit dem Programm GraphPadPrism durchgeführt.

#### 4.2.6 Bindungsstudien an INS-1 Zellen

Um das Vorkommen von 5-HT<sub>3</sub>-Rezeptoren an INS-1 Zellen nachzuweisen, wurde eine Bindungsstudie mit dem radioaktiv markierten selektiven 5-HT<sub>3</sub>-Rezeptor-Antagonist [ $^3$ H]GR65630 durchgeführt. Die INS-1 Zellen wurden fünf bis sechs Tage vor Versuchsbeginn in 24er Multiwellplatten ausgesät. Die weitere Durchführung dieser Bindungsstudie entspricht der Vorgehensweise bei den Bindungsstudien an N1E-115 Zellen (Abschnitt 4.2.3).

### 4.3 Statistik

Die Ergebnisse in dieser Arbeit werden als Mittelwert  $\pm$  SEM angegeben. Als Grundlage dient die Anzahl  $n$  der unabhängigen Versuche. Ausreißer wurden nach der  $2\sigma$  Regel nicht in die Berechnung der Ergebnisse einbezogen. Die statistische Auswertung wurde mit der Einweg-Varianz-Analyse (ANOVA) und anschließend ungepaartem t-Test durchgeführt. Die Ergebnisse gelten als statistisch signifikant wenn  $p < 0,05$  erreicht ist.

Zur graphischen Darstellung der Ergebnisse wurde das Programm SigmaPlot von SYSTAT Software Inc., USA verwendet.

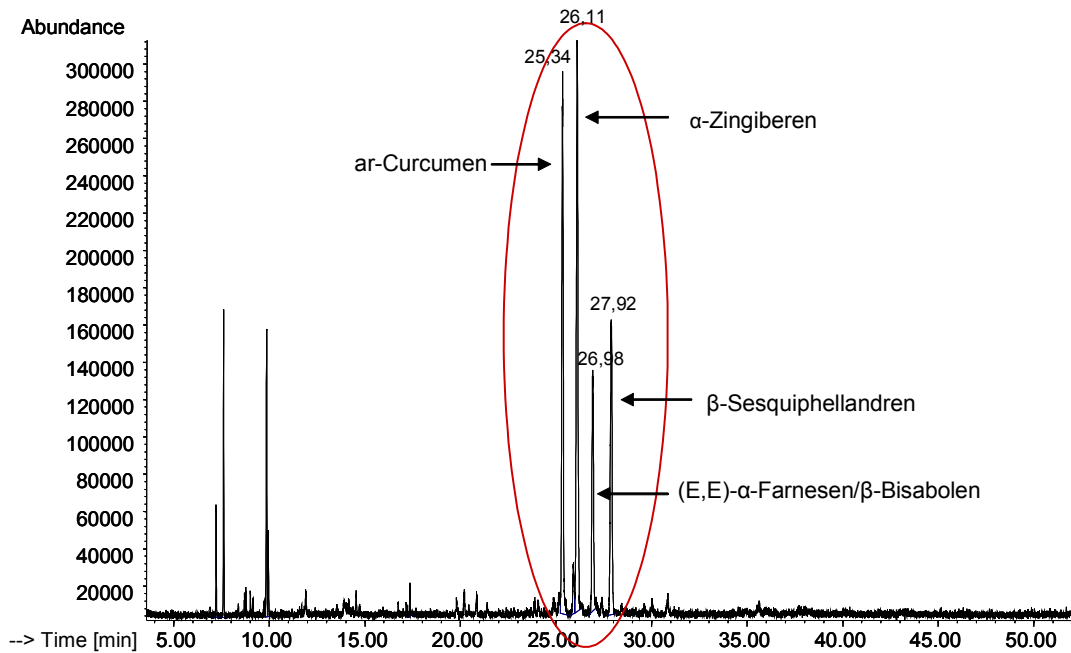
## 5 Ergebnisse

### 5.1 Gewinnung des ätherischen Ingweröls und Isolierung der Sesquiterpenkohlenwasserstoffe

Das ätherische Ingweröl und die enthaltenen Sesquiterpenkohlenwasserstoffe (ar-Curcumen,  $\alpha$ -Zingiberen, (E,E)- $\alpha$ -Farnesen,  $\beta$ -Bisabolen und  $\beta$ -Sesquiphellandren) wurden im Rahmen dieser Arbeit auf ihre Wirkung an 5-HT<sub>3</sub>-Rezeptoren untersucht. Keines der Sesquiterpenderivate ist derzeit als Reinsubstanz käuflich erhältlich. Daher wurden die Sesquiterpene vor Beginn der pharmakologischen Experimente zunächst aus ätherischem Ingweröl isoliert.

#### 5.1.1 Gewinnung und Charakterisierung des ätherischen Ingweröls

Für die pharmakologischen Untersuchungen am 5-HT<sub>3</sub>-Rezeptor und als Ausgangssubstanz für die chromatographische Isolierung der Sesquiterpene wurden zunächst mittels Wasserdampfdestillation ca. 10 ml ätherisches Ingweröl aus Ingwerhizomen vietnamesischer Herkunft gewonnen. Das ätherische Öl weist eine gelbgrünliche Färbung und einen charakteristischen aromatischen Geruch auf. Das verwendete Ingwerhizom enthält 1,5 % (V/m) ätherisches Öl mit einer Dichte von 0,9 g/cm<sup>3</sup>. Zur Charakterisierung des Inhaltsstoffspektrums wurde das ätherische Öl mittels GC/MS analysiert. Die Komponenten des Ingweröls wurden durch Vergleich der linearen Retentionsindizes und Massenspektren mit Literaturangaben<sup>[156]</sup> sowie Angaben der NIST-Datenbank identifiziert. Im Gaschromatogramm des ätherischen Öls (siehe Abb. 5.1) sind die Peaks der Sesquiterpene bei Retentionszeiten zwischen 25,3–28 Minuten deutlich zu erkennen. Die Hauptbestandteile des gewonnenen ätherischen Öls und ihre durch Integration der Peakflächen ermittelten Anteile am ätherischen Öl sind in Tab. 5.1 aufgeführt. Da das ätherische Öl als Ausgangssubstanz zur Isolierung der Sesquiterpene dienen sollte, wurde der analytische Schwerpunkt auf diese Substanzklasse gelegt. Der Vollständigkeit halber sind in Tab. 5.1 neben den Sesquiterpenen die in hohen Konzentrationen vorkommenden Monoterpenderivate mit aufgeführt.



**Abb. 5.1 Gaschromatogramm des destillierten ätherischen Öls zeitnah zur Gewinnung**

Der rot umrandete Bereich markiert die Peaks der Sesquiterpenkohlenwasserstoffe. Neben den Hauptpeaks unterstreichen die zahlreichen kleinen Peaks den Charakter des Vielstoffgemisches des ätherischen Ingweröls.

Rt [min]	LRI	Inhaltsstoff	Flächenprozent
7,23	933,9	$\alpha$ -Pinen	1,99
7,63	948,6	Camphen	5,18
9,87	1030,1	$\beta$ -Phellandren	5,95
9,94	1032,4	1,8-Cineol	1,63
17,37	1294,7	2-Undecanon	0,20
25,34	1480,5	ar-Curcumen	24,88
25,93	1491,2	n.i.	2,11
26,11	1495,0	$\alpha$ -Zingiberen	27,48
26,98	1507,4	(E,E)- $\alpha$ -Farnesen/ $\beta$ -Bisabolen	11,93
27,92	1520,3	$\beta$ -Sesquiphellandren	15,38

**Tab. 5.1 Inhaltsstoffe des Ingweröls**

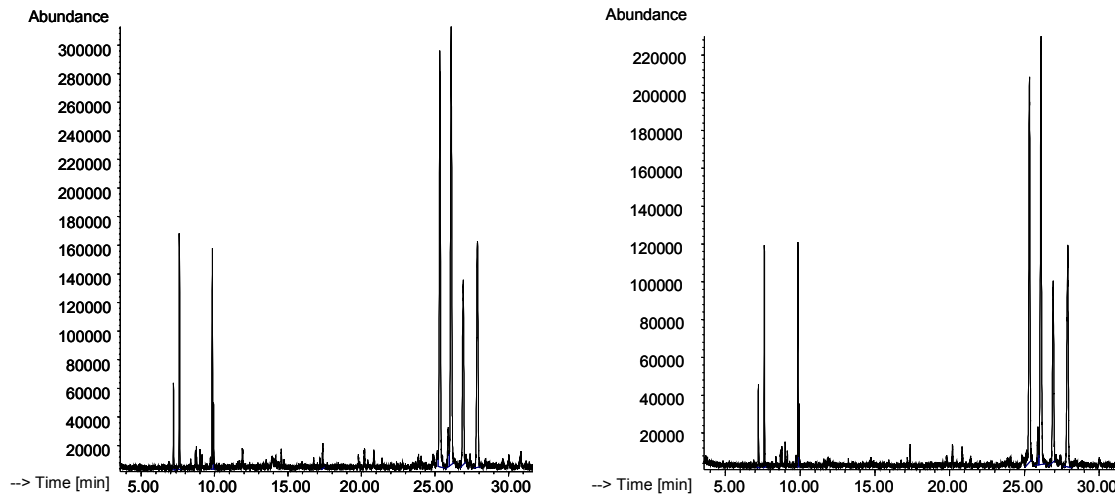
(n.i. = nicht identifiziert; Rt = Retentionszeit; rot = Sesquiterpene)

Die Sesquiterpenkohlenwasserstoffe stellen mit einem Gesamtgehalt von ca. 79,5 % die Hauptfraktion des ätherischen Öls dar. Aufgrund des hohen Gehalts dieser Sesquiterpene ist das Ingweröl als Ausgangssubstanz für die Gewinnung dieser Inhaltsstoffe gut geeignet. ar-Curcumen und  $\alpha$ -Zingiberen sind mit ca. 25 % bzw. 27,5 % die

Hauptbestandteile des Öls, was für die Gewinnung dieser Sesquiterpene von Vorteil war. In den später beschriebenen pharmakologischen Untersuchungen sind ar-Curcumen und  $\alpha$ -Zingiberen als Reinsubstanzen von besonderem Interesse, da sie als „Frischeindikatoren“ des ätherischen Ingweröls verwendet werden können. Die Sesquiterpene (E,E)- $\alpha$ -Farnesen und  $\beta$ -Bisabolen weisen annähernd identische Retentionszeiten auf und erscheinen somit beide in einem Peak bei einer Retentionszeit von 26,98 Minuten.

Zur Gewinnung einer ausreichenden Menge an ätherischem Ingweröl wurden mehrere Wasserdampfdestillationen durchgeführt. Im Verlauf der Gewinnung des Öls wurden sowohl die Einwaage des Ingwerrhizoms als auch die Menge an Aqua destillata pro Destillation verdoppelt, um eine höhere Ausbeute zu erzielen. Beide Ansätze ergaben eine Ausbeute von 1,5 % (V/m) ätherischem Öl. Die gaschromatographische Analyse zeigte bei beiden Methoden ein ähnliches Inhaltsstoffspektrum. Das in Abb. 5.1 gezeigte Gaschromatogramm resultiert aus der Vereinigung des aus allen Destillationen gewonnenen ätherischen Öls.

In der Literatur<sup>[71, 78]</sup> ist eine Instabilität des ätherischen Öls während der Lagerung beschrieben. Da die pharmakologische Untersuchung des Ingweröls und die Isolierung der Inhaltsstoffe einige Monate in Anspruch nahm, wurde die Stabilität des ätherischen Öls vor Durchführung der Versuche kontrolliert. In Abb. 5.2 sind die GC-Spektren des frisch destillierten Öls und des gleichen Öls nach einer Lagerungszeit von 10 Monaten bei -20 °C gegenübergestellt. Anhand der Ähnlichkeit der Chromatogramme wird deutlich, dass sich das ätherische Ingweröl bezüglich seiner Zusammensetzung während der Lagerung kaum verändert hat. Die in der Literatur<sup>[71, 78]</sup> beschriebene Oxidationsreaktion von  $\alpha$ -Zingiberen zu ar-Curcumen bei längerer Lagerung wurde bis zu diesem Zeitpunkt nicht beobachtet. Somit konnte das ätherische Öl über einen Zeitraum von mindestens 10 Monaten zur pharmakologischen Testung verwendet werden.



**Abb. 5.2 Gaschromatogramme des frisch destillierten (links) und des 10 Monate gelagerten Ingweröls (rechts)**

Dargestellt sind die relevanten Ausschnitte der Gaschromatogramme. Bei längerer Retentionszeit wurden in beiden Chromatogrammen keine zusätzlichen, neu aufgetretenen Substanzen detektiert.

### 5.1.2 Chromatographische Isolierung der Sesquiterpene

#### Trockensäulenchromatographie

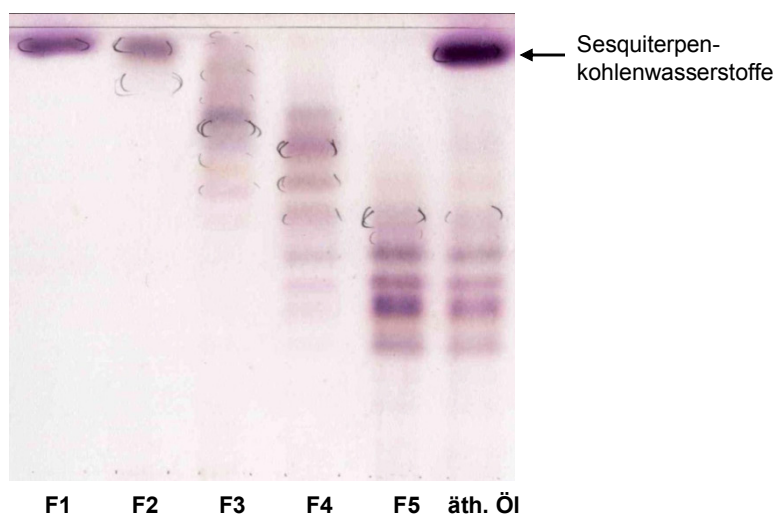
Zur Auftrennung des ätherischen Öls in fünf Fraktionen unterschiedlicher Polarität wurde die Trockensäulenchromatographie nach Kubeczka<sup>[152]</sup> durchgeführt. Diese Methode wurde bereits von Riyazi<sup>[153]</sup> im Arbeitskreis Verspohl verwendet, um ein Ingweröl aus Ingwerrhizomen nigerianischer Herkunft in fünf Fraktionen aufzutrennen. Diese wurden dort ausführlich chemisch charakterisiert und pharmakologisch auf ihre 5-HT<sub>3</sub>-Rezeptorkanal-antagonistische Wirkung untersucht. Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurde die Fraktionierung nicht zur pharmakologischen Bewertung unterschiedlicher Inhaltsstoffgruppen, sondern zur Trennung der unpolaren Sesquiterpene von den polarerer Bestandteilen und als Vorbereitung für weitere chromatographische Schritte verwendet. Die Trockensäulenchromatographie wurde dreimal durchgeführt, um für die weitere Isolierung der Sesquiterpene genügend Material zu erhalten. In Tab. 5.2 sind die Ausbeuten der fünf gewonnenen Fraktionen aus der ersten Trockensäulenchromatographie dargestellt. In der ersten Fraktion mit n-Pentan als Fließmittel wurde der Hauptteil des eingesetzten ätherischen Öls eluiert. Die Ausbeute in den beiden folgenden Durchläufen war vergleichbar und wird hier nicht separat aufgeführt. Die um 8,5 % verringerte Ausbeute lässt sich durch Adsorption der Inhaltsstoffe an das Kieselgel und durch Verluste beim Trennen der drei Kieselgelfraktionen (Gewinnung von F3–F5) erklären. Des Weiteren könnte auch eine Verdunstung der Inhaltsstoffe die Ausbeute verringert haben.

Fraktion (F)	Ausbeute [g]	Ausbeute [%]	Farbe
1	1,26	70,80	farblos
2	0,04	2,23	gelb
3	0,01	0,71	gelb
4	0,04	2,26	gelb-grün
5	0,28	15,49	gelb-grün
Summe	1,63	91,49	--

**Tab. 5.2 Ausbeuten der mittels Trockensäulenchromatographie gewonnenen Fraktionen des Ingweröls**

1,78 g Ingweröl wurden auf die Säule gegeben und nacheinander mit n-Pentan (F1) und 2-Chlorpropan (F2) eluiert. Die Fraktionen F3–F5 wurden durch Extraktion des von unten nach oben dreigeteilten Kieselgels mit einer Ether/Methanol-Mischung gewonnen.

Zur Analyse der Inhaltsstoffe der fünf Fraktionen wurden diese zunächst dünnschichtchromatographisch auf Kieselgel 60 F<sub>254</sub>-DC-Platten mit einem Fließmittelgemisch aus Toluol und Ethylacetat untersucht. Im Dünnschichtchromatogramm (siehe Abb. 5.3) wird die Auftrennung der Inhaltsstoffe des Öls durch die Trockensäulenchromatographie sichtbar. Die Zone der unpolaren Sesquiterpenkohlenwasserstoffe ist am oberen Fließmittelrand deutlich zu erkennen. Diese ist außer im ätherischen Öl vor allem in der Fraktion 1 und in Spuren auch in der Fraktion 2 enthalten. In den Fraktionen 3–5 befinden sich Inhaltsstoffe des ätherischen Öls mit höherer Polarität.



**Abb. 5.3 Dünnschichtchromatogramm des ätherischen Öls und der fünf Fraktionen**

Der Pfeil kennzeichnet die Zone der Sesquiterpenkohlenwasserstoffe. Die Detektion erfolgte mittels Anisaldehyd-Schwefelsäure-Reagenz. Mit Bleistift markierte Zonen wurden unter Betrachtung mit UV-Licht sichtbar; (F = Fraktion).



Die Ergebnisse der gaschromatographischen Untersuchung der Fraktionen bestätigen, dass sich der größte Anteil der Sesquiterpene in der ersten Fraktion befindet. Die Inhaltstoffe dieser Fraktion sind in Tab. 5.3 aufgeführt. Neben insgesamt 87,9 % Sesquiterpenkohlenwasserstoffen befinden sich in Fraktion 1 zudem unpolare Monoterpenderivate.

Rt [min]	LRI	Inhaltsstoff	Flächenprozent
7,24	934,2	$\alpha$ -Pinen	1,34
7,64	949,1	Camphen	5,38
9,88	1030,3	$\beta$ -Phellandren	5,37
25,37	1480,7	ar-Curcumen	28,17
26,13	1495,1	$\alpha$ -Zingiberen	36,72
26,96	1507,6	(E,E)- $\alpha$ -Farnesen/ $\beta$ -Bisabolen	9,57
27,92	1520,4	$\beta$ -Sesquiphellandren	13,44

**Tab. 5.3 Inhaltsstoffe der Fraktion 1**

(rot = Sesquiterpene)

Die zweite Fraktion besteht zu 85 % aus ar-Curcumen. Diese Fraktion wurde aber wegen einer geringen Ausbeute und aufgrund von Farbveränderungen, die auf Zersetzungsreaktionen hindeuteten, nicht zur Isolierung von ar-Curcumen verwendet. In den Gaschromatogrammen der Fraktionen 3–5 wurden keine Sesquiterpenkohlenwasserstoffe detektiert. Als Ausgangsmaterial für die weiteren Isolierungsschritte wurde die Fraktion 1 ausgewählt. Zum einen verfügt sie über einen hohen Gehalt an Sesquiterpenen mit wenigen Begleitsubstanzen; zum anderen lieferten die drei Trockensäulen-chromatographien eine gute Gesamtausbeute von insgesamt 3,3 g Fraktion 1. Die Inhaltstoffe der Fraktionen 3–5 sind in der Arbeit von Riyazi<sup>[153]</sup> charakterisiert. Da im Rahmen dieser Arbeit der Schwerpunkt bei den Sesquiterpenen liegt, wird hier nicht weiter auf die sesquiterpenfreien Fraktionen eingegangen.

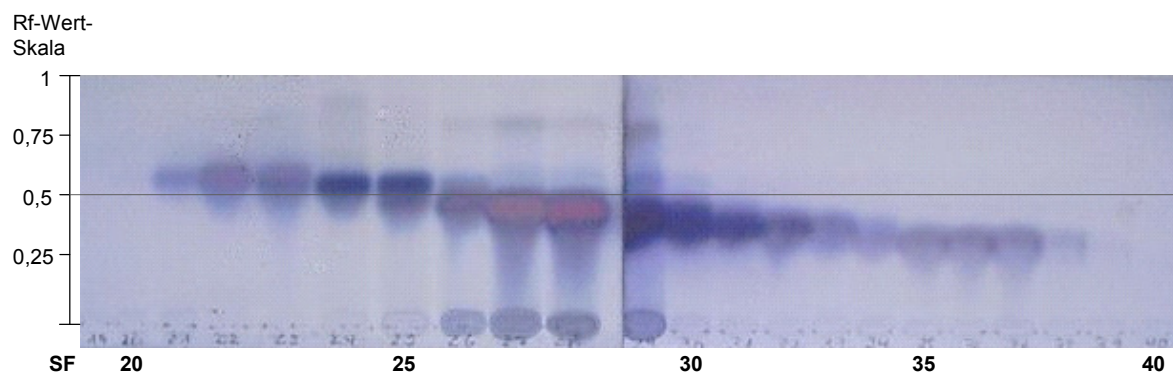
## FCPC

Die FCPC (Fast Centrifugal Partition Chromatography) ist eine geeignete Chromatographiemethode zur Auftrennung komplexer Naturstoffgemische. Die in der Trockensäulenchromatographie gewonnene Fraktion 1 mit einem Sesquiterpen-Gehalt von ca. 88 % wurde mittels FCPC in weitere Subfraktionen getrennt. Ziel dieser Methode war, die einzelnen Sesquiterpenderivate voneinander zu trennen.

Zur Vorbereitung der FCPC wurde zunächst mittels Dünnschichtchromatographie das geeignete Fließmittelsystem ermittelt (Dünnschichtchromatogramm nicht gezeigt). Hierzu

wurde die Verteilung der Fraktion 1 in obere und untere Phase eines zweiphasigen Fließmittelgemisches untersucht. Bei der Durchführung der FCPC dient eine der beiden Phasen als stationäre und die andere als mobile Phase. Der Analyt sollte sich möglichst gleichmäßig in beiden Phasen lösen, damit sowohl eine Retention als auch eine Elution der Inhaltsstoffe erreicht werden kann. Eine etwa gleichmäßige Verteilung der Fraktion 1 in beide Phasen wurde durch Verwendung des Lösungsmittelgemisches n-Heptan/Acetonitril/ Ethylacetat im Verhältnis 4/6/3 (V/V/V) erreicht.

Im Anschluss an die vorbereitenden Versuche wurde die FCPC durchgeführt. Das eluierte Fließmittel wurde in Reagenzgläsern in etwa 100 Subfraktionen (= SF) aufgefangen. Anschließend wurde der Inhalt jedes fünften Reagenzglases dünnschichtchromatographisch auf RP18-DC-Platten mit Acetonitril als Fließmittel untersucht, um grob die SF zu ermitteln, in denen die Bestandteile der Fraktion 1 eluiert werden. Die Elution der Substanzen erfolgte zwischen der 19. und 40. Fraktion. In diesem Bereich wurde jede einzelne SF dünnschichtchromatographisch untersucht. In Abb. 5.4 ist das Dünnschichtchromatogramm der entscheidenden SF dargestellt. Anhand der abnehmenden Rf-Werte und der unterschiedlichen Färbungen der nacheinander eluierten Substanzen ist eine Trennung der zuvor in der Fraktion 1 enthaltenen Inhaltsstoffe deutlich zu erkennen.

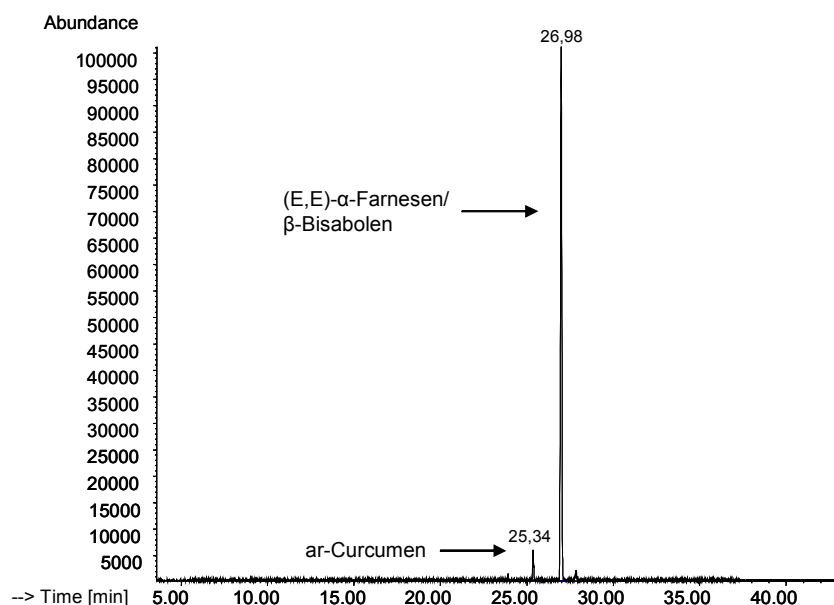


**Abb. 5.4** Dünnschichtchromatogramm der gesammelten Unterfraktionen mittels FCPC

Anhand der Skala können die Rf-Werte abgeschätzt werden. Die Linie bei einem Rf-Wert von 0,5 dient zur Orientierung; (SF = Unterfraktion).

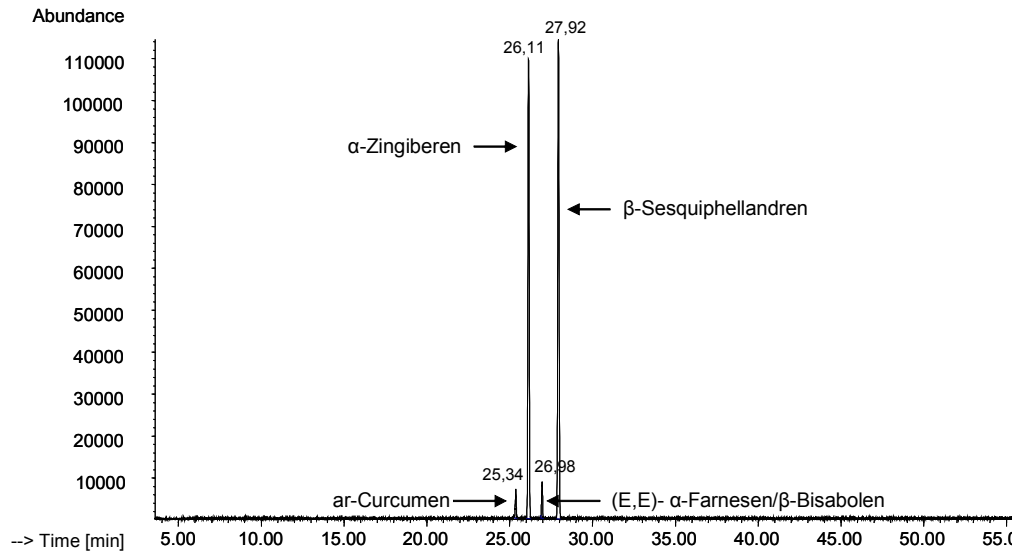
Nach Auswertung des Dünnschichtchromatogramms wurden die identischen Unterfraktionen vereinigt und mittels GC/MS analysiert. Im Verlauf der Elution wurden zunächst ar-Curcumen und  $\beta$ -Phellandren (SF 21 + 22 mit 93,6 % ar-Curcumen und 6,3 %  $\beta$ -Phellandren), dann  $\beta$ -Sesquiphellandren (SF 25–28) und schließlich  $\alpha$ -Zingiberen (SF 26–29) eluiert. Die Elution der Hauptinhaltsstoffe ging ineinander über, so dass in den Unterfraktionen neben dem mengenmäßig überwiegenden Sesquiterpenderivat noch weitere Terpene vorhanden waren. Der dem (E,E)- $\alpha$ -Farnesen und  $\beta$ -Bisabolen

entsprechende gemeinsame Peak bei einer Retentionszeit von 26,98 min konnte in den Unterfraktionen 23–30 detektiert werden. Welche der beiden Substanzen in der jeweiligen Fraktion überwiegt, konnte aufgrund der gleichen Retentionszeit im Gaschromatogramm nicht eindeutig bestimmt werden. Die SF 24 enthält zu 93,2 % das (E,E)- $\alpha$ -Farnesen/ $\beta$ -Bisabolen-Gemisch in Kombination mit 4,3 % ar-Curcumen und 2,6 % sonstigen nicht identifizierten Bestandteilen. Diese SF wurde aufgrund des hohen Gehalts des (E,E)- $\alpha$ -Farnesen/ $\beta$ -Bisabolen-Gemisches für die pharmakologischen Untersuchungen verwendet. Das Gaschromatogramm dieser SF ist in Abb. 5.5 dargestellt.



**Abb. 5.5 Gaschromatogramm der SF 24 mit (E,E)- $\alpha$ -Farnesen/ $\beta$ -Bisabolen als Hauptkomponente**

Die Substanz ar-Curcumen wurde in den SF 21 und 22 mit einer Reinheit von 93,6 % eluiert. ar-Curcumen wurde im Laufe der weiteren Isolierung aus einer anderen SF als Reinsubstanz gewonnen, so dass die SF 21 und 22 aufgrund der geringeren Reinheit des ar-Curcumens in den pharmakologischen Experimenten keine Verwendung fanden. Die Sesquiterpene  $\alpha$ -Zingiberen und  $\beta$ -Sesquiphellandren wurden innerhalb der gleichen SF eluiert. Die Hauptmenge dieser beiden Sesquiterpene befindet sich in den vereinigten SF 27 + 28, die 44,1 %  $\alpha$ -Zingiberen und 50,2 %  $\beta$ -Sesquiphellandren neben 2,4 % ar-Curcumen und 3 % (E,E)- $\alpha$ -Farnesen/ $\beta$ -Bisabolen enthalten (Gaschromatogramm siehe Abb. 5.6).



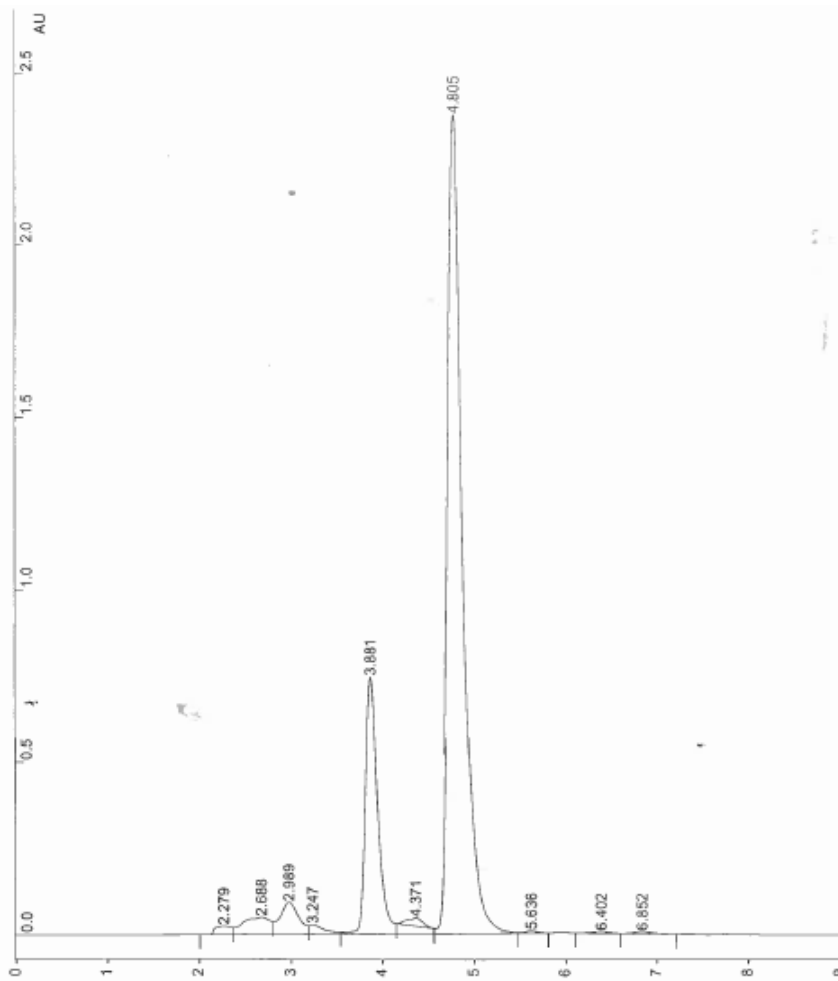
**Abb. 5.6 Gaschromatogramm der vereinigten SF 27 und 28**

Aufgrund des hohen Gehalts der Sesquiterpene  $\alpha$ -Zingiberen und  $\beta$ -Sesquiphellandren in den SF 27 + 28 und einer hohen Ausbeute von ca. 250 mg wurden diese als Ausgangssubstanz für die präparative HPLC gewählt.

Zusammenfassend erwies sich die FCPC als geeignete Methode zur Auftrennung der Sesquiterpene. Drei der fünf Sesquiterpenderivate (ar-Curcumen und (E,E)- $\alpha$ -Farnesen/ $\beta$ -Bisabolen) wurden in den Subfraktionen bis zu einem Gehalt von ca. 93 % angereichert. Die SF 27 + 28 besteht zu einem großen Teil aus den Sesquiterpenkohlenwasserstoffen  $\alpha$ -Zingiberen und  $\beta$ -Sesquiphellandren und ist als Ausgangsmaterial zur Isolierung dieser beiden Sesquiterpene gut geeignet.

## HPLC

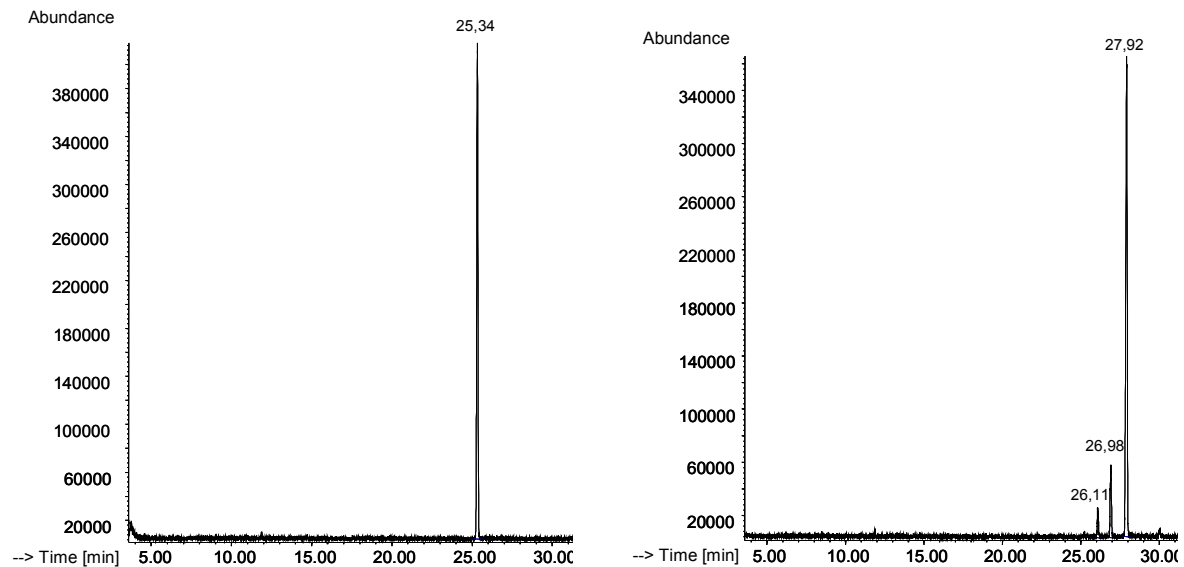
Die präparative HPLC wurde zur Isolierung der Sesquiterpene  $\alpha$ -Zingiberen und  $\beta$ -Sesquiphellandren aus den SF 27 + 28 verwendet. Zur Vorbereitung der präparativen HPLC wurde diese Unterfraktion zunächst mittels analytischer HPLC untersucht. Diese wurde angewendet, um bei geringem Substanzeinsatz die für die Trennung der Substanzen geeignete HPLC-Säule und das geeignete Fließmittel für die präparative HPLC zu finden. Unter Verwendung einer RP18-Säule und Acetonitril als Fließmittel konnte eine Basislinientrennung der beiden Hauptbestandteile erreicht werden (Spektrum siehe Abb. 5.7).



**Abb. 5.7 HPLC-Spektrum der SF 27 und 28**

Auf der Y-Achse ist die Absorption in AU (= arbitrary units) bei 215 nm und auf der X-Achse die Zeit in Minuten angegeben.

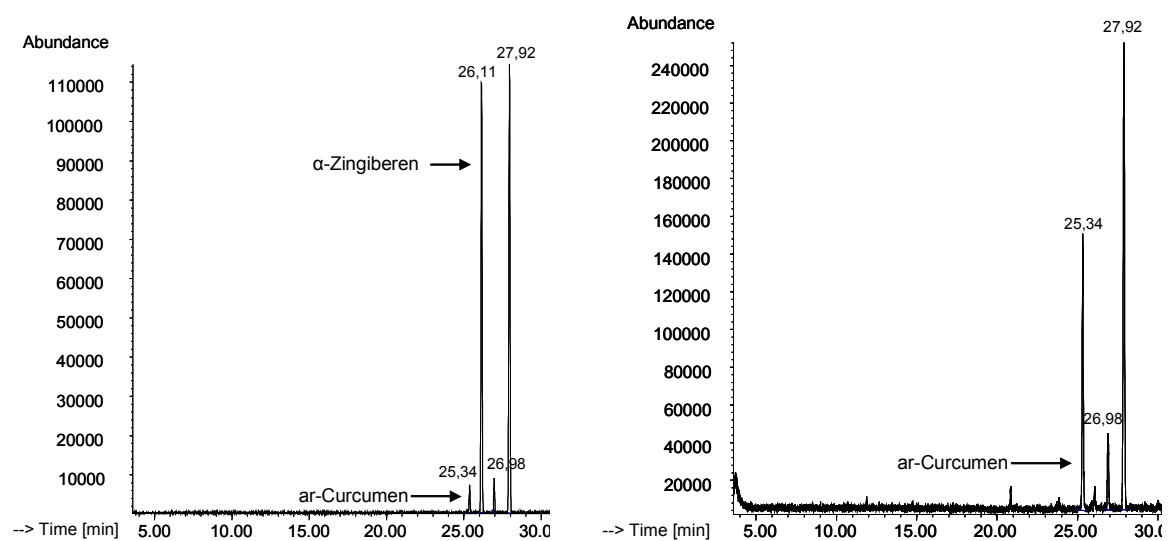
Die Schlussfolgerungen aus der analytischen HPLC waren auf die dann durchzuführende präparative HPLC übertragbar. Bei einer Fließgeschwindigkeit von 7 ml/min und einem Druck von 600–800 psi wurde der erste Hauptpeak nach 13,5 Min und der zweite nach 17 Minuten eluiert. Die Substanzen wurden getrennt aufgefangen. Die GC/MS-Analyse der Eluenten (siehe Abb. 5.8) ergab für den zuerst eluierten Hauptpeak reines ar-Curcumen und für den zweiten Hauptpeak einen  $\beta$ -Sesquiphellandren-Gehalt von 83,7 % neben 4,6 %  $\alpha$ -Zingiberen und 11,7 % (E,E)- $\alpha$ -Farnesen/ $\beta$ -Bisabolen. Die Retentionszeiten der Substanzen entsprechen exakt ihren Retentionszeiten im Gaschromatogramm des ätherischen Ingweröls.



**Abb. 5.8 Gaschromatogramme des isolierten ar-Curcumens (links) und des angereicherten  $\beta$ -Sesquiphellandrens (rechts) nach der präparativen HPLC**

Es sind jeweils nur die relevanten Bereiche der Gaschromatogramme dargestellt. Nach einer Retentionszeit von 30 min wurden keine weiteren Substanzen eluiert.

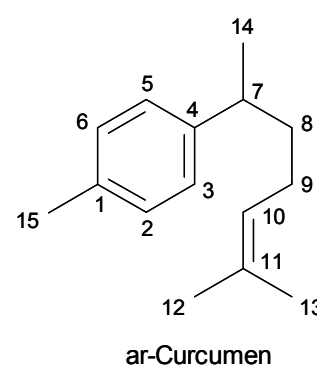
Unerwartet wurde anstelle des zuvor im Ausgangsmaterial enthaltenen  $\alpha$ -Zingiberens mit dem ersten Hauptpeak reines ar-Curcumen eluiert. Zur Überprüfung von Veränderungen der Subfraktionen 27 + 28 während der zweiwöchigen Lagerung wurden diese erneut gaschromatographisch analysiert. In Abb. 5.9 sind die Gaschromatogramme der gerade gewonnenen SF 27 + 28 und der SF nach zweiwöchiger Lagerung gegenübergestellt.



**Abb. 5.9 Gaschromatogramme der SF 27 + 28 kurz nach Gewinnung (links) und nach zweiwöchiger Lagerung (rechts)**

Der im linken Chromatogramm bei einer Retentionszeit von 26,11 Minuten detektierte Peak des  $\alpha$ -Zingiberens ist im rechten Chromatogramm kaum noch erkennbar. Im Chromatogramm der gelagerten SF (rechts) ist nun ein deutlicher ar-Curcumen-Peak zu erkennen, während ar-Curcumen in der gerade gewonnenen SF nur in Spuren vorhanden ist. Diese Ergebnisse lassen schlussfolgern, dass während der Lagerung der SF bei  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  das enthaltene  $\alpha$ -Zingiberen fast vollständig zu ar-Curcumen oxidiert wurde. Der Vorteil dieser Oxidation war, dass mittels präparativer HPLC für die pharmakologischen Untersuchungen reines ar-Curcumen gewonnen werden konnte. Die Struktur des ar-Curcumens wurde neben Auswertung der GC/MS-Daten durch  $^1\text{H}$ - und  $^{13}\text{C}$ -NMR-Spektren belegt. Die Ergebnisse sind im Folgenden dargestellt.

$^1\text{H-NMR}$  ( $\text{CDCl}_3$ , 400 MHz):  $\delta$  (ppm) = 1,21 (d,  $J = 6,6$  Hz, 3 H, H-14), 1,52 (s, 3 H, H-13), 1,59 (m, 2 H, H-8), 1,67 (d,  $J = 1,1$  Hz, 3 H, H-12), 1,87 (m, 2 H, H-9), 2,34 (s, 3 H, H-15), 2,7 (tq,  $J = 6,9$  Hz, 1 H, H-7), 5,09 (br t,  $J = 7,1$ , 1 H, H-10), 7,08 (m, 4 H, H-2, H-3, H-5, H-6);  $^{13}\text{C-NMR}$  ( $\text{CDCl}_3$ , 100 MHz):  $\delta$  (ppm) = 17,9 (C-13), 21,2 (C-15), 22,7 (C-14), 25,9 (C-12), 26,4 (C-9), 38,7 (C-8), 39,2 (C-7), 124,8 (C-10), 127,1 (C-3, C-5), 129,2 (C-2, C-6), 131,6 (C-11), 135,4 (C-1), 144,9 (C-4)

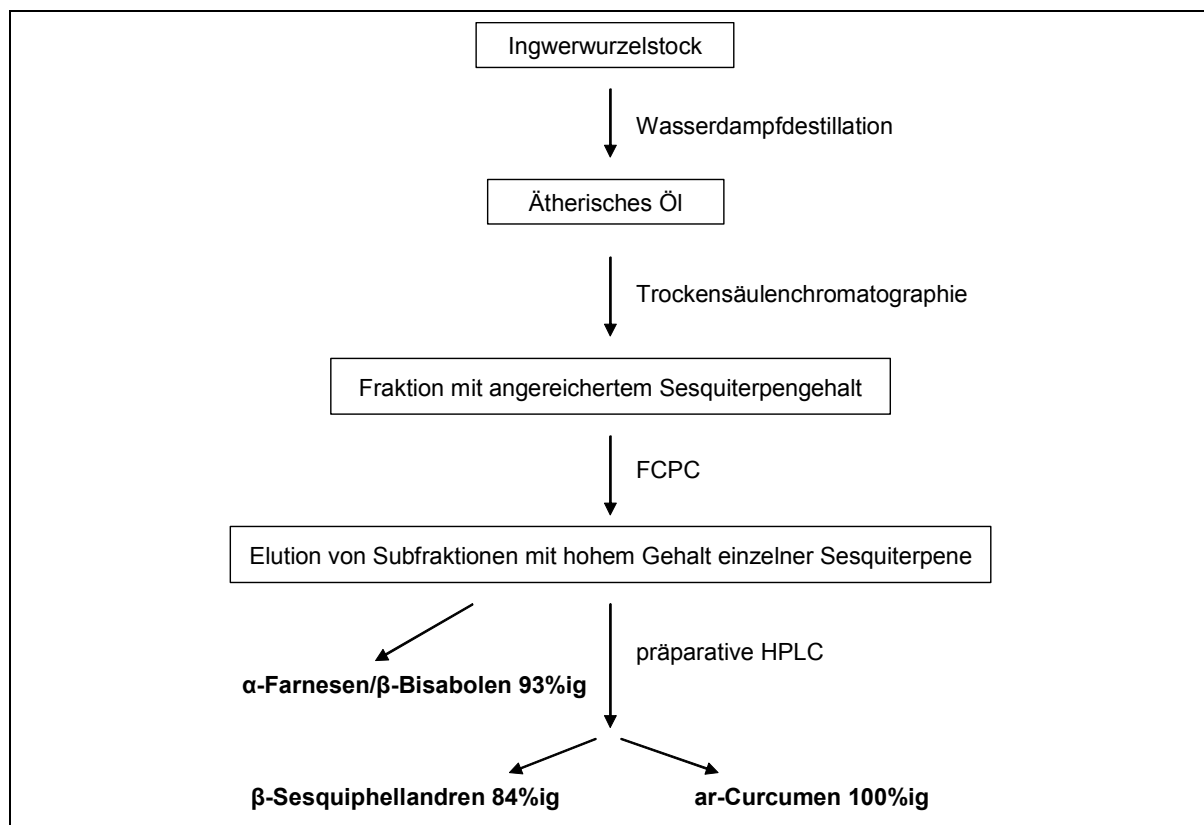


Diese gefundenen Daten entsprechen den Literaturangaben<sup>[164]</sup>.

Da  $\beta$ -Sesquiphellandren mit 83,7 % Hauptbestandteil der im zweiten Hauptpeak des HPLC-Spektrums eluierten Substanzen ist, wurde diese Fraktion in den pharmakologischen Experimenten verwendet, um den Effekt dieses Sesquiterpens zu erfassen. Obwohl neben  $\beta$ -Sesquiphellandren in dieser Fraktion noch 16,3 % weitere Begleitsubstanzen (v.a. (E,E)- $\alpha$ -Farnesen/ $\beta$ -Bisabolen und  $\alpha$ -Zingiberen) enthalten sind, ist der Gehalt ausreichend, um die pharmakologische Wirkung der Substanz zu bestimmen. Außerdem wurden die Begleitsubstanzen ebenfalls pharmakologisch getestet, so dass ihr Einfluss auf die Wirkung des  $\beta$ -Sesquiphellandrens abschätzbar ist.

## Übersicht der chromatographischen Isolierung der Sesquiterpene

Unter Verwendung der beschriebenen Methoden wurden die Sesquiterpene ar-Curcumen,  $\beta$ -Sesquiphellandren und das Gemisch aus (E,E)- $\alpha$ -Farnesen und  $\beta$ -Bisabolen isoliert oder zumindest angereichert. Die chromatographische Isolierung dieser Substanzen ist in Abb. 5.10 noch einmal schematisch dargestellt.



**Abb. 5.10 Übersicht der chromatographischen Isolierung und Anreicherung der Sesquiterpenkohlenwasserstoffe**

Aufgrund der schnell eintretenden Oxidation des  $\alpha$ -Zingiberens zu ar-Curcumen während der Lagerung einzelner Fraktionen wurde auf eine erneute Isolierung dieser Substanz mittels chromatographischer Methoden verzichtet. Stattdessen wurde  $\alpha$ -Zingiberen unter Verwendung einer Derivatisierungsreaktion und Ausschluss von Sauerstoff gewonnen, wie im folgenden Kapitel beschrieben.



### 5.1.3 Isolierung von $\alpha$ -Zingiberen

Die Konzentration des Sesquiterpen-Derivats  $\alpha$ -Zingiberen gilt als Indikator für die Frische eines Ingweröls, da es bei Lagerung und unter Einfluss hoher Temperaturen zu ar-Curcumen oxidiert wird. Diese Umsetzung wurde auch während der zuvor beschriebenen chromatographischen Isolierung der Sesquiterpenkohlenwasserstoffe beobachtet und führte dazu, dass  $\alpha$ -Zingiberen nicht als Reinsubstanz gewonnen werden konnte. Es wurde daher eine schnellere Isolierungsmethode gewählt, die es außerdem ermöglichte  $\alpha$ -Zingiberen unter Ausschluss von Sauerstoff aus dem ätherischen Ingweröl zu gewinnen. Bei der durch Millar<sup>[157]</sup> beschriebenen Methode wird eine durch Vakuumdestillation gewonnene sesquiterpenreiche Fraktion mit einem Dienophil versetzt, das selektiv mit dem Dien  $\alpha$ -Zingiberen ein Cycloaddukt bildet (Diels-Alder-Reaktion). Dieses kann dann durch Anwendung der Flash-Chromatographie isoliert werden. Durch Hydrolyse des Cycloaddukts wird dieses wieder in seine Ausgangsprodukte gespalten (Retro-Diels-Alder-Reaktion). Mittels erneuter Flash-Chromatographie kann dann die Reinsubstanz  $\alpha$ -Zingiberen gewonnen werden. Die einzelnen Schritte werden im Folgenden genau beschrieben.

#### Charakterisierung des verwendeten Ingweröls

Das ätherische Ingweröl aus eigener Herstellung wurde für die pharmakologischen Testungen benötigt. Für die Isolierung des  $\alpha$ -Zingiberens wurde daher ein ätherisches Ingweröl der Firma Caelo verwendet. Dieses wurde nach Angaben des Herstellers mittels Wasserdampfdestillation aus Ingwerrhizomen unbekannter Anbaugelände gewonnen. Das Auswahlkriterium für die Verwendung des Öls war ein  $\alpha$ -Zingiberen-Gehalt von mindestens 20 %. Die Zusammensetzung des ätherischen Öls und im speziellen der Anteil des  $\alpha$ -Zingiberens wurden mittels GC/MS-Analytik untersucht. Anhand des Gaschromatogramms (siehe Abb. 5.11) wird deutlich, dass  $\alpha$ -Zingiberen bei einer Retentionszeit von 26,11 Minuten eine der Hauptkomponenten des ätherischen Öls ist. Durch Integration der Peakflächen konnte ein Gehalt an  $\alpha$ -Zingiberen von etwa 31 % ermittelt werden. Die weiteren Komponenten und ihre Anteile im ätherischen Ingweröl sind in Tab. 5.4 aufgeführt.

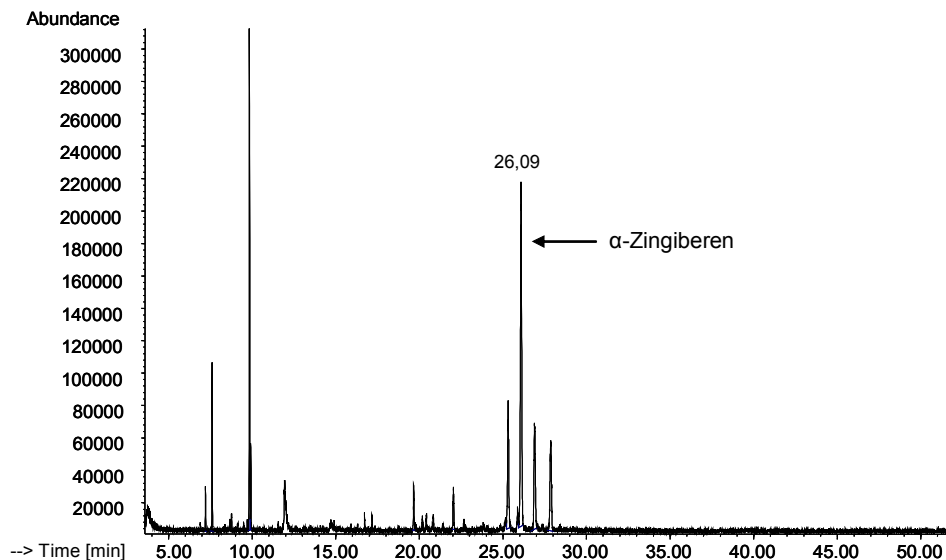


Abb. 5.11 Gaschromatogramm des ätherischen Ingweröls der Firma Caelo

Rt [min]	LRI	Inhaltsstoff	Flächenprozent
7,214	933,2	α-Pinen	1,45
7,609	947,9	Camphen	5,52
9,847	1029,2	Limonen	18,30
9,926	1031,9	Eucalyptol	3,12
11,945	1102,3	n.i.	5,05
19,673	1360,1	n.i.	2,26
22,048	1417,9	β-Caryophyllen	2,85
25,321	1479,8	ar-Curcumen	11,34
26,094	1494,4	α-Zingiberen	31,08
26,901	1506,8	(E,E)-α -Farnesen/β-Bisabolen	10,36
27,871	1519,7	β-Sesquiphellandren	8,69

Tab. 5.4 Zusammensetzung des ätherischen Ingweröls der Firma Caelo

### Vakuumdestillation zur Trennung der Sesquiterpene von den Monoterpenen

Die Trennung der Sesquiterpene von den Monoterpenen mittels Vakuumdestillation wurde durchgeführt, um eine sesquiterpenreiche Fraktion mit einem hohen α-Zingiberen-Gehalt als Ausgangsmaterial für die Diels-Alder-Reaktion zu erhalten. Außerdem wurden durch die Trennung weitere Diene innerhalb der Monoterpenfraktion, wie z.B. das in Spuren vorkommende α-Phellandren, von der Reaktion mit dem Dienophil ausgeschlossen. Durch die Destillation des ätherischen Öls bei 23–30 mbar wurden vier Fraktionen aufgrund ihrer unterschiedlichen Siedepunkte getrennt voneinander aufgefangen. Der Temperaturverlauf und die Ausbeuten der einzelnen Fraktionen sind in

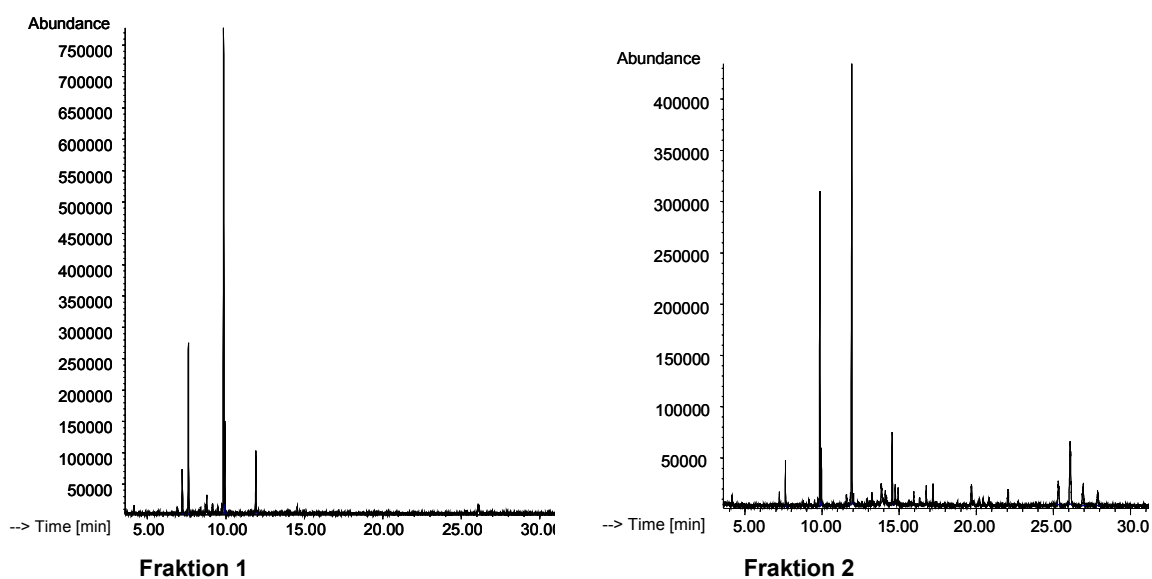
Tab. 5.5 dargestellt. Neben den vier gewonnenen Fraktionen blieb ein dunkel-gelber, hochviskoser Rückstand im Kolben, der nicht weiter untersucht wurde.

	1. Fraktion	2. Fraktion	3. Fraktion	4. Fraktion
Temp. [°C]	25–115	115–135	135–143	143–148
Ausbeute [g]	1,345	0,607	0,636	1,424
Aussehen	farblos	farblos	farblos	farblos–hellgelb

**Tab. 5.5 Fraktionsgewinnung durch die Vakuumdestillation**

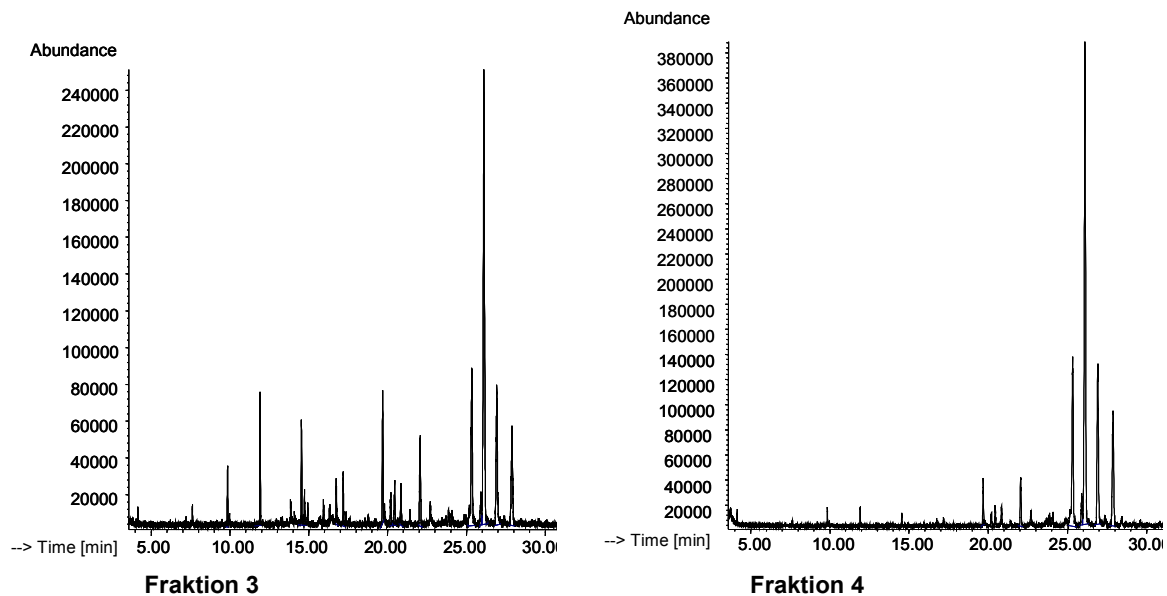
Die Ausbeuten beziehen sich auf eine Einwaage von 5 g ätherischem Ingweröl.

Die Inhaltsstoffe der einzelnen Fraktionen wurden mittels GC/MS analysiert. Anhand der Gaschromatogramme in Abb. 5.12 wird deutlich, dass in den ersten beiden destillierten Fraktionen vorwiegend die mit kürzeren Retentionszeiten eluierten Monoterpene enthalten sind.



**Abb. 5.12 Gaschromatogramme der durch Vakuumdestillation gewonnenen ersten beiden Fraktionen**

Die dritte Fraktion enthält beide Stoffgruppen zu etwa gleichen Teilen. Die zwischen Destillationstemperaturen von 143–148 °C gewonnene vierte Fraktion besteht zu ca. 90 % aus den bei Retentionszeiten von ca. 25,3 bis 28 Minuten eluierten Sesquiterpen-derivaten (Gaschromatogramme siehe Abb. 5.13).



**Abb. 5.13** Gaschromatogramme der dritten und vierten Fraktion der Vakkumdestillation

Die genaue Zusammensetzung der vierten Fraktion ist in Tab. 5.6 dargestellt. Der Gehalt des  $\alpha$ -Zingiberens beträgt in dieser Fraktion ca. 45,6 %.

Rt [min]	LRI	Inhaltsstoff	Flächenprozent
9,847	1029,2	Limonen	0,57
11,923	1101,5	n.i.	0,74
19,691	1360,6	n.i.	2,33
22,056	1418,1	$\beta$ -Caryophyllen	3,72
25,335	1480,1	ar-Curcumen	17,74
25,918	1491,1	n.i.	2,11
<b>26,120</b>	<b>1494,9</b>	<b><math>\alpha</math>-Zingiberen</b>	<b>45,64</b>
26,928	1507,2	(E,E)- $\alpha$ -Farnesen/ $\beta$ -Bisabolen	15,05
27,889	1520,0	$\beta$ -Sesquiphellandren	12,10

**Tab. 5.6** Zusammensetzung der sesquiterpenreichen vierten Fraktion aus der Vakuumdestillation

Neben den Sesquiterpenen sind in der vierten Fraktion in geringen Mengen noch weitere Substanzen enthalten. Zusätzlich zu den mengenmäßig dominierenden Sesquiterpenderivaten kommen weitere Sesquiterpene wie z.B.  $\beta$ -Caryophyllen, die über ähnliche Siedepunkte verfügen, in der vierten Fraktion vor. Außerdem sind Spuren an Monoterpenderivaten enthalten, die durch Rückstände der zuvor kondensierten dritten Fraktion im Kühlerbereich zu erklären sind.

Die vierte Fraktion wurde aufgrund des hohen  $\alpha$ -Zingiberen-Gehalts von 45,6 % und der neben den Sesquiterpenderivaten geringen Menge an Begleitsubstanzen als Ausgangsmaterial für die Diels-Alder-Reaktion verwendet. Die Vakuumdestillation wurde zur Gewinnung von genügend Ausgangssubstanz dreimal wiederholt, was zu ähnlichen Fraktionen führte. Die jeweils vierten Fraktionen wurden vereinigt (Gesamtausbeute = 4,72 g) und in der Diels-Alder-Reaktion eingesetzt.

### **Diels-Alder-Kopplung und Isolierung des Cycloadduktes**

Die chromatographische Trennung der Sesquiterpenderivate voneinander ist problematisch, da sie eine ähnliche Polarität aufweisen und somit nur schwer trennbar sind. Das  $\alpha$ -Zingiberen besitzt jedoch ein Strukturmerkmal, das allen weiteren Sesquiterpenen des Ingweröls fehlt. Dies ist die cis-konfigurierte Dien-Struktur, die eine selektive Kopplung mit einem Dienophil im Sinne einer Diels-Alder-Reaktion ermöglicht. So kann durch Kopplung mit einem polaren Dienophil die Polarität des  $\alpha$ -Zingiberens erhöht werden. Die Trennung von den ungekoppelt vorliegenden unpolaren Sesquiterpenderivaten ist nun mittels Flash-Chromatographie durchführbar. Wichtig für die Selektivität der Reaktion ist, dass vor Durchführung andere im Ausgangsmaterial enthaltene Diene eliminiert werden. Dies ist im Fall der Isolierung des  $\alpha$ -Zingiberens durch Vakuumdestillation des ätherischen Ingweröls unter Bildung einer sesquiterpenreichen Fraktion mit möglichst wenigen Begleitsubstanzen geschehen.

Ungefähr 2 g der vierten Fraktion aus der Vakuumdestillation (entsprechend ca. 4,5 mmol  $\alpha$ -Zingiberen) wurden im Rahmen der Diels-Alder-Kopplung mit ca. 5 mmol des Dienophils PTAD (4-Phenyl-1,2,4-triazolin-3,5-dion) zur Reaktion gebracht. Das entstandene Cycloaddukt aus  $\alpha$ -Zingiberen und PTAD wurde anschließend mittels Flash-Chromatographie von den ungekoppelt vorliegenden Sesquiterpenkohlenwasserstoffen und weiteren unpolaren Bestandteilen getrennt. Zur Vorbereitung der Flash-Chromatographie wurde das Gemisch zunächst dünnschichtchromatographisch analysiert, um die geeignete Fließmittelzusammensetzung für die Isolierung des Cycloaddukts zu ermitteln. Besteht zwischen den zu trennenden Komponenten im

Dünnschichtchromatogramm ein Rf-Wert-Unterschied von mindestens 0,2, ist bei gleichen Bedingungen in der Flash-Chromatographie von einer getrennten Elution der Inhaltsstoffe auszugehen. Bei Verwendung von Kieselgel 60 F<sub>254</sub>-DC-Platten und 15 % (V/V) Aceton in n-Hexan als Fließmittel wurde diese Bedingung erfüllt. Der Rf-Wert der gekoppelten Komponente lag bei 0,3, die Rf-Werte der nicht gekoppelten Sesquiterpene lagen mit 0,9–0,95 nahe der Fließmittelfront. Das Fließmittelsystem erwies sich somit als geeignet für die Flash-Chromatographie. Es wurden vier Flash-Chromatographien mit Einwaagen zwischen 0,5 und 0,8 g des aus der Diels-Alder-Reaktion erhaltenen Gemisches durchgeführt. Das polarere Cycloaddukt verblieb länger auf der Säule als die unpolaren Sesquiterpenderivate und wurde getrennt von diesen aufgefangen. Bei dem gekoppelten Addukt handelt es sich um eine farblose, viskose Masse. Die Ausbeute ist in Tab. 5.7 dargestellt. Die Gesamtausbeute des Cycloadduktes aus vier Flash-Chromatographien beträgt 0,725 g.

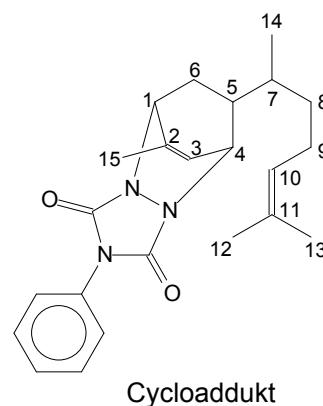
Säulenr.	Einwaage [g] Ausgangssubstanz	Ausbeute des Cycloaddukts [g]	Beschreibung des gekoppelten Produkts
1	0,503	0,150	viskose, farblose Masse
2	0,645	0,180	viskose, farblose Masse
3	0,624	0,190	viskose, farblose Masse
4	0,780	0,205	viskose, farblose Masse

Tab. 5.7 Ergebnisse der Isolierung des Cycloaddukts durch die Flash-Chromatographie (4 Ansätze)

Die Struktur des durch die Diels-Alder-Kopplung aus  $\alpha$ -Zingiberen und PTAD entstandenen Cycloaddukts wurde mittels <sup>1</sup>H- und <sup>13</sup>C-NMR-Spektroskopie überprüft. Die im Folgenden dargestellten Ergebnisse bestätigen die Struktur des Cycloaddukts und stimmen mit den Literaturdaten<sup>[157]</sup> überein.

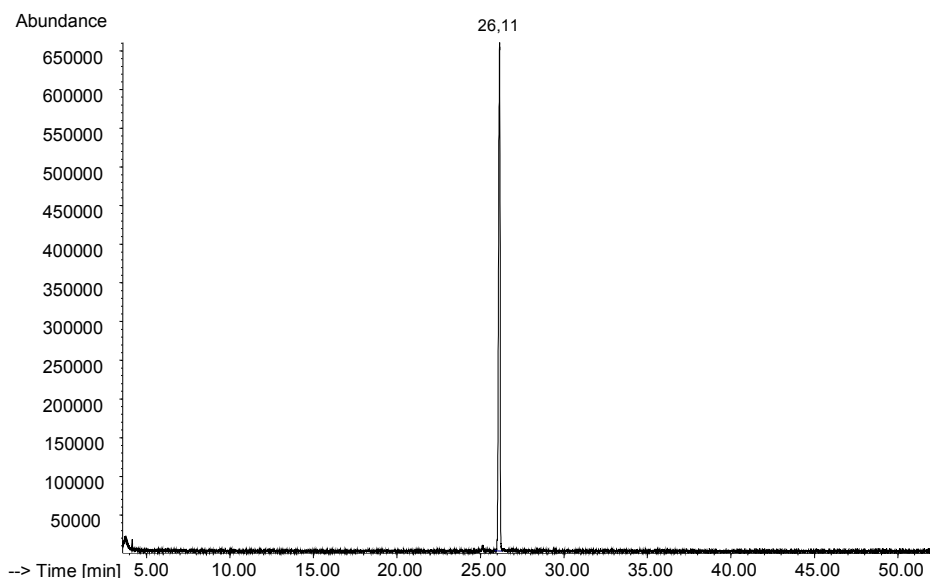
<sup>1</sup>H-NMR (CDCl<sub>3</sub>, 400 MHz):  $\delta$  (ppm) = 0,86 (d, J = 6,5 Hz, 3 H, H-14), 1,1 (m, 1 H, H-7), 1,25 (m, 2 H, H-6', H-8'), 1,49 (m, 1 H, H-8), 1,61 (s, 3 H, H-12), 1,69 (s, 3 H, H-13), 1,92 (d, J = 1,7 Hz, 3 H, H-15), 2,06 (m, 3 H, H-5, H-9, H-9'), 2,31 (ddd, J = 13,0/8,8/3,6 Hz, 1 H, H-6), 4,69 (m, 1 H, H-6), 4,93 (dd, J = 5,7/2,6 Hz, 1 H, H-4), 5,08 (br t, J = 7,1 Hz, 1 H, H-10), 5,97 (br d, J = 5,7 Hz, 1 H, H-3); 7,31–7,5 (m, 5 H, Ph)

<sup>13</sup>C-NMR (CDCl<sub>3</sub>, 100 MHz):  $\delta$  (ppm) = 16,5, 17,9, 19,6, 25,1, 25,9, 28,8, 34,5, 36,7, 41,6, 53,8, 55,3, 120,8, 124,3, 125,6, 128,3, 129,3, 131,8, 132,1, 156,3, 156,7



## Retro-Diels-Alder-Reaktion und Isolierung des $\alpha$ -Zingiberens

Bei Durchführung von Diels-Alder-Synthesen wird das Reaktionsgemisch häufig gekühlt um eine vorzeitige Spaltung in die Ausgangsprodukte (Retro-Diels-Alder-Reaktion) zu unterbinden. Diese Rückreaktion tritt besonders unter Einfluss hoher Temperaturen ein und wurde im Rahmen der vorliegenden Arbeit zur Spaltung des Cycloaddukts in seine Ausgangssubstanzen genutzt. Das dadurch erneut vorliegende unpolare  $\alpha$ -Zingiberen wurde mittels Flash-Chromatographie mit n-Hexan als Fließmittel von PTAD und weiteren Bestandteilen, wie während der Retro-Diels-Alder-Reaktion gebildetem Anilin, getrennt. Das isolierte Produkt ist eine farblose, leicht viskose Substanz mit aromatischem Geruch. Die Ausbeute beträgt 95 mg bei einer Einwaage von 0,39 g Diels-Alder-Cycloaddukt in der Retro-Diels-Alder-Reaktion. Zur Strukturabklärung wurde das isolierte Produkt mittels GC/MS analysiert (siehe Abb. 5.14).

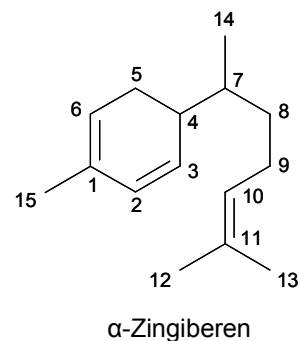


**Abb. 5.14** Gaschromatogramm des isolierten Produktes der Retro-Diels-Alder-Reaktion

Der Peak im Gaschromatogramm wird zur gleichen Retentionszeit (26,1 Minuten) eluiert wie der Peak des  $\alpha$ -Zingiberens im zuvor gaschromatographisch untersuchten und zur Isolierung eingesetzten ätherischen Öl. Durch Integration der Peakflächen wurde eine Reinheit von mindestens 99 % berechnet. Der Vergleich des Massenspektrums mit Literaturdaten<sup>[156]</sup> bestätigte die Struktur des  $\alpha$ -Zingiberens. Diese wurde neben der GC/MS-Analytik durch  $^1\text{H}$ - und  $^{13}\text{C}$ -NMR-Spektren überprüft. Die NMR-Spektroskopie-Daten sind im Folgenden aufgeführt:

**$^1\text{H-NMR}$**  ( $\text{CDCl}_3$ , 400 MHz):  $\delta$  (ppm) = 0,87 (d,  $J = 6,8$  Hz, 3 H, H-14), 1,17 (m, 1 H, H-7), 1,40 (m, 2 H, H-8), 1,56 (s, 3 H, H-12), 1,68 (s, 3 H, H-13), 1,71 (d,  $J = 1,9$  Hz, 3 H, H-15), 2,01 (m, 4 H, H-5 und H-9), 2,26 (m, 1 H, H-4), 5,10 (br t,  $J = 7,1$  Hz, 1 H, H-10), 5,45 (s, 1 H, H-6), 5,63 (dd,  $J = 9,7/3$  Hz, 1 H, H-2), 5,77 (dt,  $J = 10,4/1,7$  Hz, 1 H, H-3)

**$^{13}\text{C-NMR}$**  ( $\text{CDCl}_3$ , 100 MHz):  $\delta$  (ppm) = 16,8 (C-12), 17,9 (C-13), 21,3 (C-14), 24,6 (C-15), 25,9 (C-9), 26,1 (C-8), 34,4 (C-5), 36,2 (C-7), 38,2 (C-4), 120,6 (C-10), 125,0 (C-6), 128,1 (C-2), 129,2 (C-3), 131,3 (C-11), 131,4 (C-1)

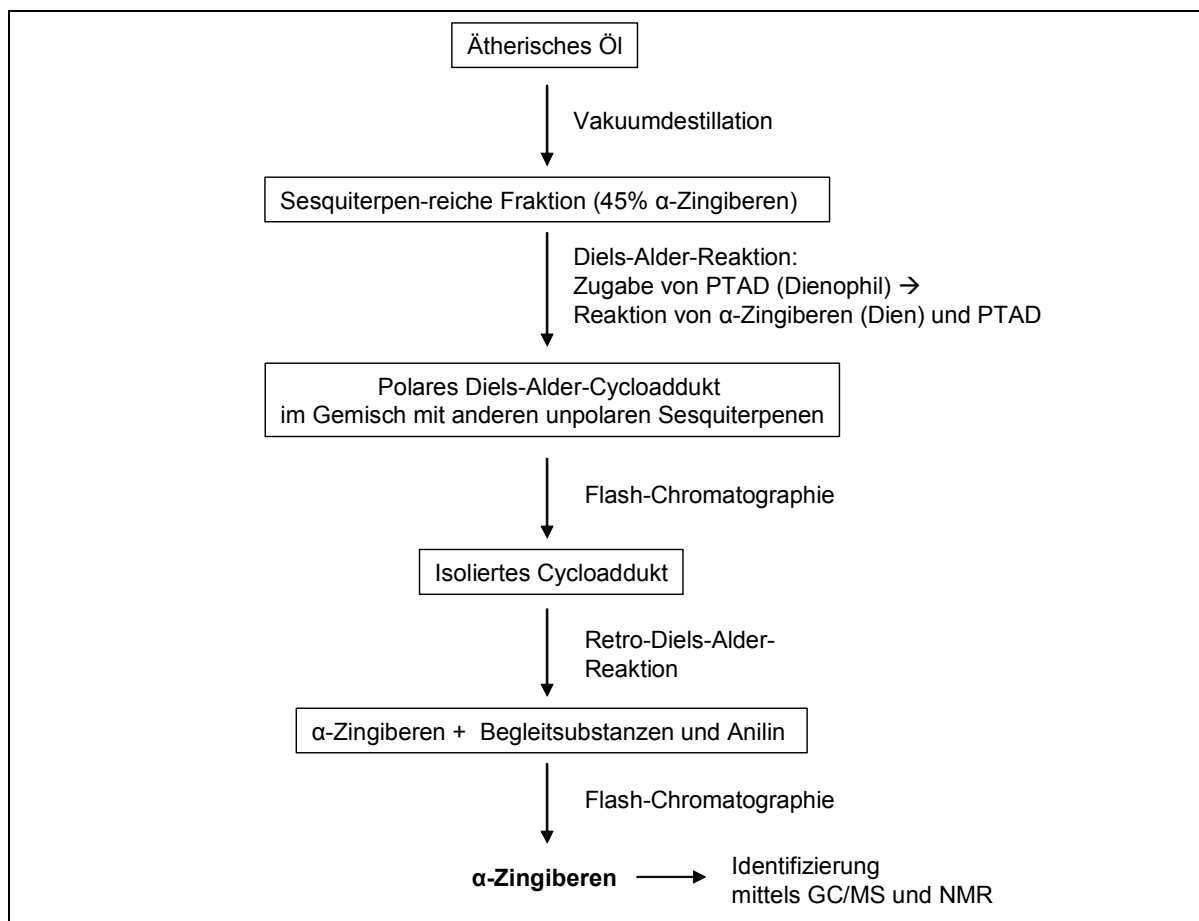


Diese Daten stimmen mit den Angaben in der Literatur<sup>[165]</sup> überein.



## Übersicht der $\alpha$ -Zingiberen-Isolierung

Zur Übersicht sind die einzelnen Schritte der Isolierung des  $\alpha$ -Zingiberens in Abb. 5.15 in einem Fließdiagramm aufgeführt.



**Abb. 5.15** Isolierung des  $\alpha$ -Zingiberens

Durch die durch Millar<sup>[157]</sup> entwickelte Isolierungsmethode wurde das  $\alpha$ -Zingiberen auf schonende und schnelle Weise gewonnen. Die Oxidationsreaktion zu ar-Curcumen wurde unterbunden, da alle Reaktionsschritte, bei denen  $\alpha$ -Zingiberen frei vorlag, unter Stickstoffatmosphäre durchgeführt wurden. Auch vor Lagerung des isolierten  $\alpha$ -Zingiberens wurde der Sauerstoff durch Einleiten von Stickstoff in das Gefäß entfernt, um die Abbaureaktion zu verhindern. Die pharmakologischen Untersuchungen wurden zeitnah zur Isolierung des  $\alpha$ -Zingiberens durchgeführt und die Qualität wurde am Versuchstag mittels GC/MS überprüft.

## 5.2 Pharmakologische Untersuchung einiger Inhaltsstoffe des Ingwers und der Pfefferminze

### 5.2.1 [<sup>14</sup>C]Guanidinium-Influx-Assay

Als pharmakologisches *in vitro*-Modell zur Untersuchung des 5-HT<sub>3</sub>-Rezeptor-antagonistischen Effekts der Testsubstanzen diente der 1993 durch Bönisch *et al.*<sup>[160]</sup> charakterisierte [<sup>14</sup>C]Guanidinium-Influx-Assay an der Mausneuroblastoma-Zelllinie N1E-115, der auf ersten Versuchen der Gruppe von Reiser beruht<sup>[166]</sup>. Durch Zugabe von Serotonin kommt es zur Öffnung des 5-HT<sub>3</sub>-Rezeptor-Ionenkanals und zum Einstrom von Kationen in die Zelle. Als Marker des Kationeneinstroms in die Zelle können [<sup>14</sup>C]Guanidinium-Ionen eingesetzt werden. Über die Menge des aufgenommenen [<sup>14</sup>C]Guanidiniums werden agonistische und antagonistische Wirkungen von Testsubstanzen am 5-HT<sub>3</sub>-Rezeptor erfasst. Die Angabe der Ergebnisse erfolgt prozentual: Als Bezugswert (100 %-Wert) dient der durch Serotonin induzierte [<sup>14</sup>C]Guanidinium-Influx ohne Zusatz von Testsubstanzen. Da [<sup>14</sup>C]Guanidinium auch durch Serotonin-unabhängige Kationenkanäle in die Zelle gelangen kann, wurde zusätzlich ein Blindwert ([<sup>14</sup>C]Guanidinium-Influx ohne Zugabe von Serotonin) bestimmt und von allen anderen Werten abgezogen.

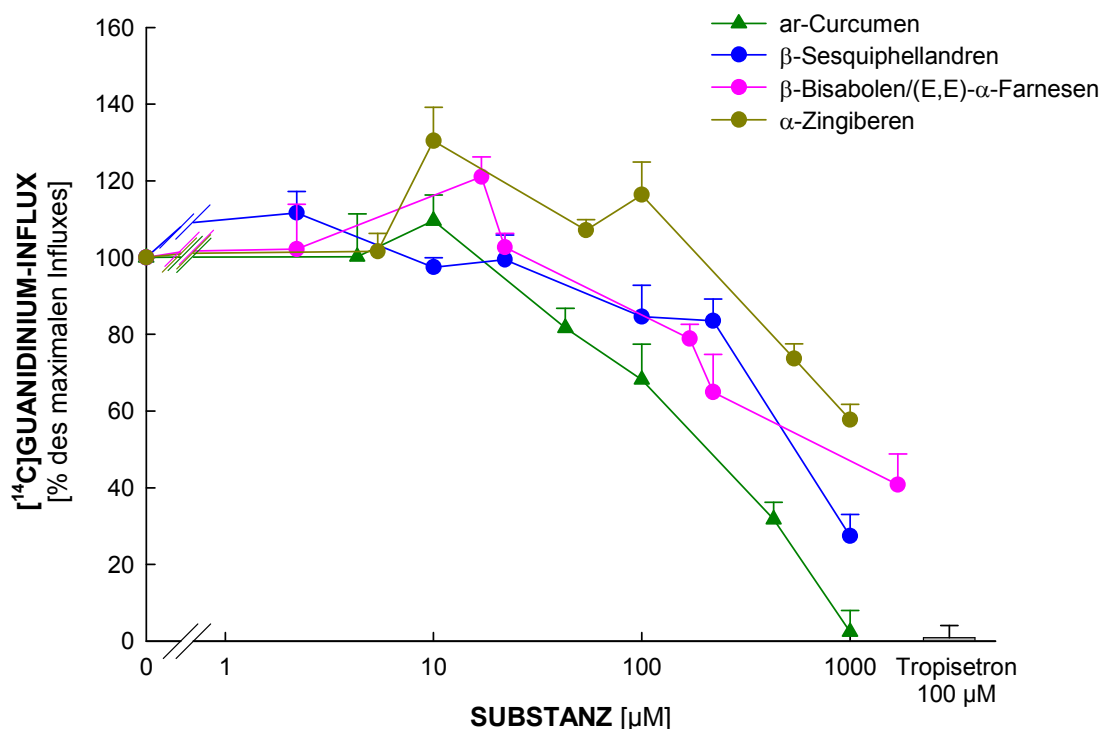
Mit Hilfe des [<sup>14</sup>C]Guanidinium-Assays wurden unterschiedliche Substanzen auf ihre antagonistische Wirkung am 5-HT<sub>3</sub>-Rezeptor untersucht. Zu diesen gehörte das ätherische Ingweröl und dessen Hauptbestandteile sowie ein öliger Ingwer-Spezialextrakt der Firma Finzelberg mit einem erhöhten Scharfstoffanteil von 25 %. Des Weiteren wurden das bei Reizdarmsyndrom wirksame Pfefferminzöl und sein Hauptbestandteil (-)-Menthol auf einen 5-HT<sub>3</sub>-Rezeptor-antagonistischen Effekt getestet, um zu überprüfen, ob dieser Mechanismus an der Wirkung des ätherischen Öls beteiligt ist.

#### 5.2.1.1 Effekte des ätherischen Ingweröls und der Hauptinhaltsstoffe auf den [<sup>14</sup>C]Guanidinium-Influx

Für einige Ingwerinhaltsstoffe konnte in vorherigen Arbeiten im Arbeitskreis Verspohl anhand dieses pharmakologischen Modells bereits eine 5-HT<sub>3</sub>-Rezeptorkanal-antagonistische Wirkung nachgewiesen werden. Die durch Abdel-Aziz<sup>[90]</sup> isolierten und getesteten Scharfstoffe ([4]-, [6]-, [8]- und [10]-Gingerol, [6]- und [8]-Shogaol, [6]-Gingerdiol, Diacetyl-[6]-gingerdiol und [6]-Gingeron) hemmten den durch Serotonin induzierten [<sup>14</sup>C]Guanidinium-Influx in Konzentrationen zwischen 10 und 100 µM nahezu vollständig. Riyazi<sup>[153]</sup> konnte auch für das ätherische Ingweröl, Fraktionen des

ätherischen Öls und die Terpene  $\alpha$ -Phellandren,  $\alpha$ -Copaen,  $\beta$ -Phellandren und Terpinolen in Konzentrationen über 100  $\mu\text{M}$  eine Inhibierung des Kationeninfluxes feststellen. Die antagonistischen Effekte der Scharfstoffe und lipophiler Extrakte des Ingwerwurzelstocks am 5-HT<sub>3</sub>-Rezeptorkanal sind allerdings den Effekten des ätherischen Öls und den bisher getesteten Bestandteilen des ätherischen Ingweröls gemessen an den benötigten Konzentrationen überlegen. In lipophilen Gesamtextrakten könnte das ätherische Öl aber durchaus die antagonistische Wirkung der Scharfstoffe am 5-HT<sub>3</sub>-Rezeptorkanal unterstützen. Eine einzelne wirksamkeitsbestimmende Verbindung konnte bisher für das ätherische Öl nicht gefunden werden.

Daher wurden im Rahmen der vorliegenden Arbeit die als Hauptbestandteile des ätherischen Ingweröls bekannten monozyklischen Sesquiterpenkohlenwasserstoffe  $\alpha$ -Curcumen,  $\beta$ -Sesquiphellandren,  $\alpha$ -Zingiberen,  $\beta$ -Bisabolen und das azyklische  $\alpha$ -Farnesen isoliert bzw. aufgereinigt und auf ihren Effekt am 5-HT<sub>3</sub>-Rezeptor untersucht. In Abb. 5.16 sind die Wirkungen dieser Substanzen auf den [<sup>14</sup>C]Guanidinium-Influx dargestellt.

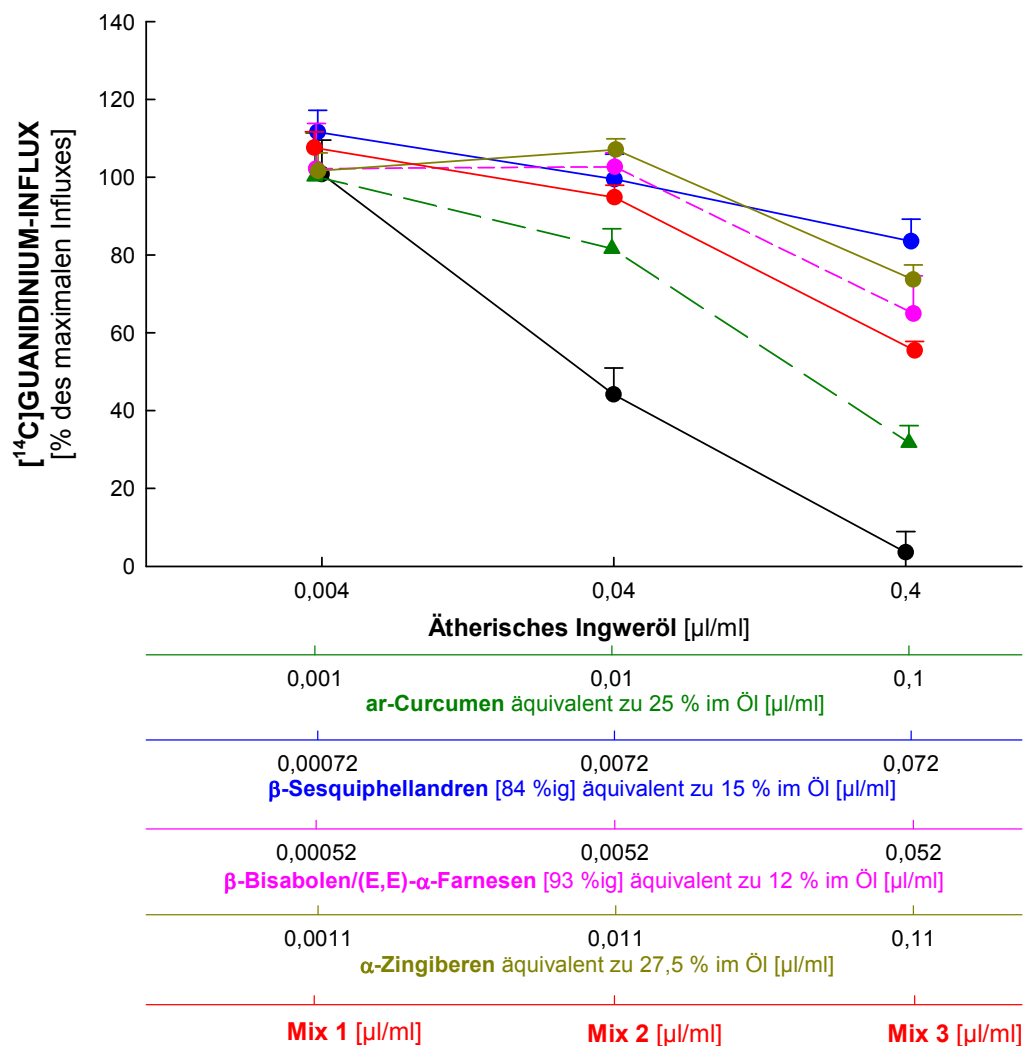


**Abb. 5.16** Effekt der Sesquiterpene auf den Serotonin-induzierten [<sup>14</sup>C]Guanidinium-Influx in N1E-115 Zellen

Gemessen wurde der durch 100  $\mu\text{M}$  Serotonin induzierte Influx des [<sup>14</sup>C]Guanidinium-Kations (5  $\mu\text{M}$  für 2,5 min). Vor Zugabe des Serotonins wurden die Zellen 20 Minuten mit den zu testenden Substanzen inkubiert. 100  $\mu\text{M}$  Tropisetron diente als Positivkontrolle; n = 3–5 + SEM.

Die Sesquiterpene *ar*-Curcumen,  $\beta$ -Sesquiphellandren und  $\beta$ -Bisabolen/(*E,E*)- $\alpha$ -Farnesen hemmen konzentrationsabhängig den durch Serotonin induzierten [ $^{14}$ C]Guanidinium-Influx.  $\alpha$ -Zingiberen besitzt in Konzentrationen zwischen 10 und 100  $\mu$ M eine 5-HT<sub>3</sub>-Rezeptor-agonistische Wirkung. Eine antagonistische Wirkung am 5-HT<sub>3</sub>-Rezeptorkanal tritt erst in sehr hohen Konzentrationen über 100  $\mu$ M ein. Für die getesteten Substanzen lässt sich folgende Reihenfolge der Wirkstärke feststellen: *ar*-Curcumen >  $\beta$ -Sesquiphellandren =  $\beta$ -Bisabolen/(*E,E*)- $\alpha$ -Farnesen >  $\alpha$ -Zingiberen. Die 5-HT<sub>3</sub>-Rezeptorkanal-antagonistische Wirkung der Sesquiterpene  $\beta$ -Bisabolen und (*E,E*)- $\alpha$ -Farnesen kann nicht abschließend beurteilt werden, da es sich hier um ein Gemisch der beiden Substanzen handelt. Da der Effekt dieser Mischung aber nicht herausragend stärker ist als der der anderen Sesquiterpene, wurde auf eine vollständige Isolierung der beiden Substanzen verzichtet. Auch  $\beta$ -Sesquiphellandren ist nur bis zu einem Gehalt von 83,7 % angereichert (neben 4,6 %  $\alpha$ -Zingiberen und 11,7 % (*E,E*)- $\alpha$ -Farnesen/ $\beta$ -Bisabolen). Da ein starker antagonistischer Effekt am 5-HT<sub>3</sub>-Rezeptorkanal auch bei einer nicht vollständig reinen Substanz deutlich werden müsste, wurde auch hier, aufgrund der im Vergleich zu *ar*-Curcumen schwächeren Wirkung, auf eine Isolierung verzichtet.

Die Wirkung des zur chromatographischen Isolierung und Anreicherung der Sesquiterpene verwendeten ätherischen Ingweröls ist in Abb. 5.17 dargestellt. 0,04  $\mu$ l/ml ätherisches Öl erniedrigen den [ $^{14}$ C]Guanidinium-Influx auf  $44,2 \pm 6,8$  % und 0,4  $\mu$ l/ml hemmen den Influx vollständig. Zur Beurteilung des Anteils der Sesquiterpenfraktion an der 5-HT<sub>3</sub>-Rezeptorkanal-antagonistischen Wirkung des ätherischen Öls wurden die Substanzen in Konzentrationen äquivalent zu ihrer Konzentration im Ingweröl getestet (siehe Abb. 5.17). Je näher die Dosis-Wirkungs-Kurve einer Reinsubstanz der Kurve des ätherischen Öls liegt, desto größer ist der Anteil dieser Substanz an der Gesamtwirkung des Ingweröls. Bei einer Konzentration von 0,04  $\mu$ l/ml ätherischem Öl zeigt nur *ar*-Curcumen eine Hemmung des [ $^{14}$ C]Guanidinium-Influxes um  $18,3 \pm 5,1$  %. Damit beruhen theoretisch 32,8 % der Wirkung des ätherischen Öls bei dieser Konzentration auf dem *ar*-Curcumen-Anteil. Bei einer Ätherisch-Öl-Konzentration von 0,4  $\mu$ l/ml hemmen alle Sesquiterpene einzeln in Konzentrationen entsprechend ihrem Anteil im ätherischen Öl den [ $^{14}$ C]Guanidinium-Influx. Am deutlichsten ist auch hier die Hemmung des Kationeninfluxes durch *ar*-Curcumen um  $68,3 \pm 4,4$  %.  $\beta$ -Bisabolen/(*E,E*)- $\alpha$ -Farnesen hemmen den Influx um  $35,1 \pm 9,8$  %,  $\alpha$ -Zingiberen um  $26,4 \pm 3,9$  % und  $\beta$ -Sesquiphellandren um  $16,5 \pm 5,7$  %. Zusätzlich zur Testung der isolierten Sesquiterpene wurde eine Mischung (Mix 1–3) aus allen Sesquiterpenen entsprechend ihrem Gesamtanteil im ätherischen Öl (insgesamt 79,5 %) getestet, um den Effekt der gesamten Sesquiterpenfraktion und Wechselwirkungen innerhalb dieser Fraktion zu erfassen.

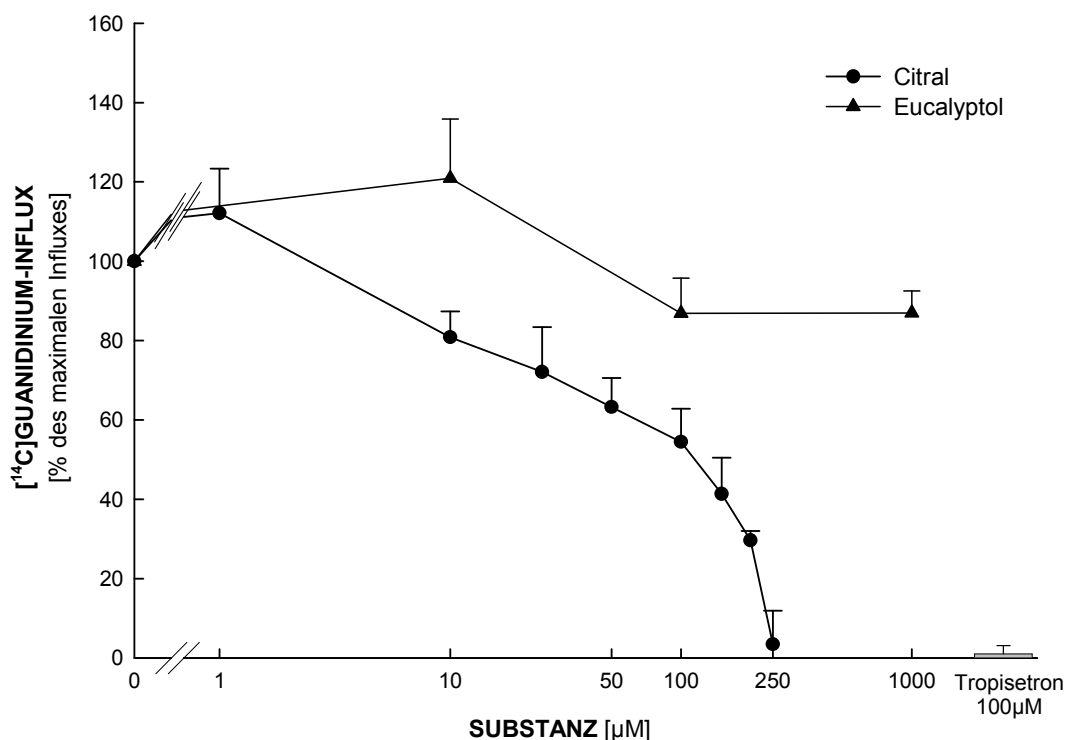


**Abb. 5.17 Anteil der Sesquiterpenkohlenwasserstoffe am Effekt des ätherischen Ingweröls auf den Serotonin-induzierten [<sup>14</sup>C]Guanidinium-Influx**

Gemessen wurde der durch 100 µM Serotonin induzierte Influx des [<sup>14</sup>C]Guanidinium-Kations (5 µM für 2,5 min). Vor Zugabe des Serotonins wurden die Zellen 20 Minuten mit den zu testenden Substanzen inkubiert. Die Sesquiterpene wurden in einer Volumenkonzentration getestet, die annähernd ihrem Anteil im ätherischen Ingweröl entspricht. Die Mix-Konzentrationen bestehen aus allen Sesquiterpenen in Konzentrationen äquivalent zum ätherischen Öl (Gesamteffekt der Sesquiterpene); n = 3–5 + SEM.

Anhand Abb. 5.17 wird deutlich, dass der Mix der Sesquiterpene äquivalent zum biologischen Mischungsverhältnis keine additiven Synergismen aufweist. Rechnerisch ist die gesamte Sesquiterpenfraktion, bezogen auf 0,04 µl/ml ätherisches Öl (in Abb. 5.17 dargestellt als Mix 2), nur zu 9,2 % und bezogen auf 0,4 µl/ml ätherisches Öl (= Mix 3) nur zu 46,2 % an der Wirkung des ätherischen Öls beteiligt. In der Wirkung des Mix 3 zeigt sich sogar, dass sich durch Mischung der Sesquiterpene die Einzeleffekte gegenseitig abschwächen. Besonders der zuvor deutliche Effekt des ar-Curcumens wird mit steigendem Anteil der anderen Sesquiterpenderivate vermindert.

Ingweröle mit citrusbetontem Aroma (z.B. Öle australischer Herkunft) weisen einen hohen Gehalt des Monoterpens Citral auf. Ein hoher Citral-Gehalt ist meist verbunden mit einem geringen Gehalt an Sesquiterpenkohlenwasserstoffen, weil sie dem gleichen Biogeneseweg entstammen. Da im Rahmen dieser Arbeit vor allem die Wirkung der Hauptbestandteile ätherischer Ingweröle am 5-HT<sub>3</sub>-Rezeptor untersucht werden sollte, wurde auch Citral in die pharmakologischen Untersuchungen mit einbezogen. Das Monoterpen Eucalyptol (1,8-Cineol) ist ebenfalls ein Bestandteil vieler Ingweröle und wurde im [<sup>14</sup>C]Guanidinium-Assay getestet. Beide Substanzen wurden unter Zusatz von Ethanol als Lösungsvermittler eingesetzt. 1 % Ethanol allein (entsprechend der im Versuch maximal angewendeten Ethanolkonzentration) hatte keinen Effekt auf den [<sup>14</sup>C]Guanidinium-Influx. Eucalyptol inhibiert selbst in hohen Konzentrationen von 1 mM den Kationeninflux statistisch nicht signifikant und kann als Wirksubstanz im ätherischen Ingweröl in Hinsicht auf den antagonistischen Effekt am 5-HT<sub>3</sub>-Rezeptorkanal ausgeschlossen werden. Citral hemmt den Serotonin-induzierten [<sup>14</sup>C]Guanidinium-Influx konzentrationsabhängig. Die Ergebnisse sind in Abb. 5.18 graphisch dargestellt.

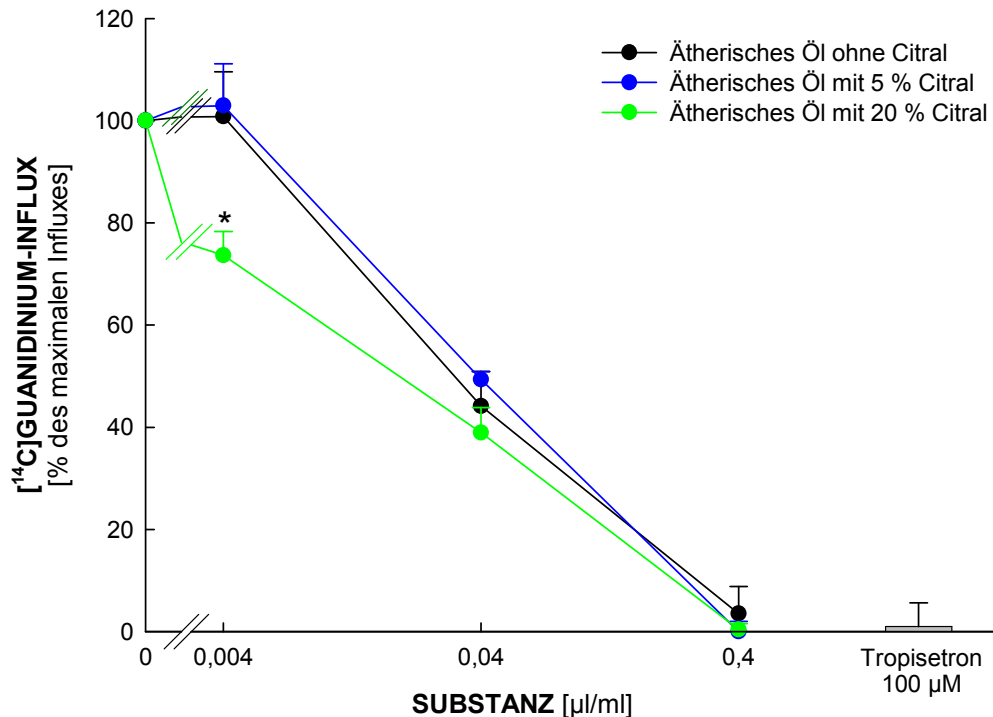


**Abb. 5.18** Effekt von Citral und Eucalyptol auf den Serotonin-induzierten [<sup>14</sup>C]Guanidinium-Influx in N1E-115 Zellen

Gemessen wurde der durch 100 μM Serotonin induzierte Influx des [<sup>14</sup>C]Guanidinium-Kations (5 μM für 2,5 min). Vor Zugabe des Serotonins wurden die Zellen 20 Minuten mit den zu testenden Substanzen inkubiert. 100 μM Tropicisetron diente als Positivkontrolle; n = 3–8 + SEM.

Während alle bisher getesteten Komponenten des ätherischen Ingweröls erst in Konzentrationen von mehr als 100  $\mu\text{M}$  einen hemmenden Effekt auf den Kationeninflux zeigen, vermindert bereits 10  $\mu\text{M}$  Citral den [ $^{14}\text{C}$ ]Guanidinium-Influx auf  $80,9 \pm 6,6 \%$ . 250  $\mu\text{M}$  Citral hemmt den Kationeninflux vollständig. Citral ist ein Gemisch der Stereoisomere Neral und Geranial. Citral wurde gaschromatographisch untersucht: die Quantifizierung mittels Integration der Flächen ergab 46,98 % Neral (Retentionszeit: 15,93 min) und 53,02 % Geranial (Retentionszeit: 16,75 min). Der Neral/Geranial-Quotient in ätherischen Ingwerölen lag in einer Studie relativ konstant bei  $2/3$ <sup>[76]</sup>.

In dem eigens destillierten und im [ $^{14}\text{C}$ ]Guanidinium-Influx-Assay eingesetzten Ingweröl vietnamesischer Herkunft waren im Gaschromatogramm im Bereich der oben genannten Retentionszeiten keine Peaks enthalten. Dieses ätherische Öl weist somit maximal Spuren der Stereoisomere Neral und Geranial auf. Zur Bewertung der Bedeutung eines bestimmten Citralanteils im ätherischen Ingweröl in Bezug auf den 5-HT<sub>3</sub>-Rezeptorkanal-antagonistischen Effekt des Öls wurde dieses mit 5 und 20 % (V/V) Citral versetzt. Ein Zusatz von 5 % Citral zum ätherischen Öl verändert den Effekt des Ingweröls auf den Kationeninflux nicht signifikant. Die auch ohne Citralzusatz bestehende Wirkung des ätherischen Ingweröls in Konzentrationen zwischen 0,04–0,4  $\mu\text{l/ml}$  wird durch 20 % Citral tendenziell, aber nicht statistisch signifikant verstärkt. In besonderem Maße macht sich ein Citral-Gehalt von 20 % in niedrigen Testkonzentrationen von 0,004  $\mu\text{l/ml}$  ätherischem Öl bemerkbar. Während das citralfreie/-arme Ingweröl in dieser Konzentration keine Hemmung des Serotonin-induzierten [ $^{14}\text{C}$ ]Guanidinium-Influsses bewirkt, vermindert das ätherische Öl mit 20 % Citralzusatz in einer Konzentration von 0,004  $\mu\text{l/ml}$  den Influx auf  $73,6 \pm 4,6 \%$  statistisch signifikant ( $p = 0,0273$  verglichen mit dem Effekt des citralfreien/-armen Ingweröls). In Abb. 5.19 ist die Auswirkung eines erhöhten Citralanteils im ätherischen Ingweröl auf den [ $^{14}\text{C}$ ]Guanidinium-Influx graphisch dargestellt.



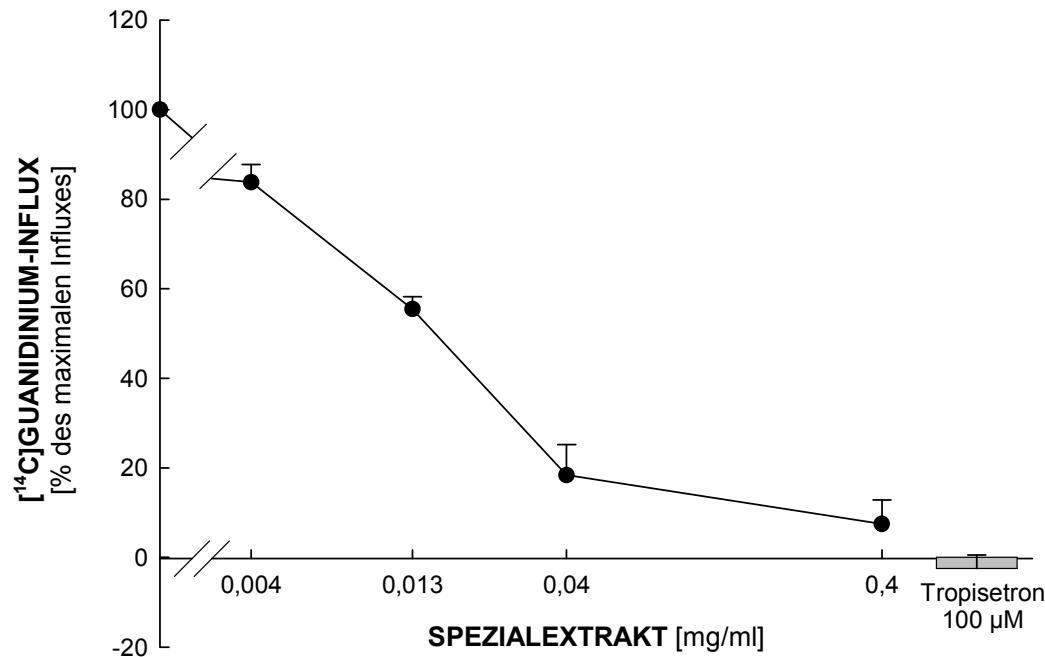
**Abb. 5.19** Beeinflussung des Serotonin-induzierten [ $^{14}\text{C}$ ]Guanidinium-Influsses in N1E-115 Zellen durch ätherisches Öl ohne Citral und versetzt mit 5 % und 20 % Citral

Gemessen wurde der durch 100  $\mu\text{M}$  Serotonin induzierte Influx des [ $^{14}\text{C}$ ]Guanidinium-Kations (5  $\mu\text{M}$  für 2,5 min). Vor Zugabe des Serotonins wurden die Zellen 20 Minuten mit den zu testenden Substanzen inkubiert. 100  $\mu\text{M}$  Tropicsetron diente als Positivkontrolle;  $n = 4-5 + \text{SEM}$ ; \*:  $p < 0,05$ .

### 5.2.1.2 Effekt eines Ingwer-Spezialextraktes auf den [ $^{14}\text{C}$ ]Guanidinium-Influx

Neben den Bestandteilen des ätherischen Ingweröls wurde ein speziell angefertigter öliger Ingwerextrakt der Firma Finzelberg mit mehr als 25 % Scharfstoffen (= Spezialextrakt) bezüglich seiner Wirkung auf den durch Serotonin induzierten [ $^{14}\text{C}$ ]Guanidinium-Influx getestet. Da die Scharfstoffe bezüglich der antagonistischen Wirkung am 5-HT<sub>3</sub>-Rezeptorkanal die Hauptwirksubstanzen des Ingwerrhizoms darstellen, sollte ein mit Scharfstoffen angereicherter Ingwerextrakt stärker wirksam sein als zuvor im Arbeitskreis Verspohl getestete natürliche Ingwerextrakte. Der Spezialextrakt hemmt den Serotonin-induzierten [ $^{14}\text{C}$ ]Guanidinium-Influx konzentrationsabhängig. Bei einer Extraktkonzentration von 0,04 mg/ml wird der [ $^{14}\text{C}$ ]Guanidinium-Influx um  $81,6 \pm 6,8\%$  vermindert. 0,4 mg/ml Extrakt hemmen den Kationeninflux vollständig. Die Ergebnisse sind in Abb. 5.20 dargestellt.





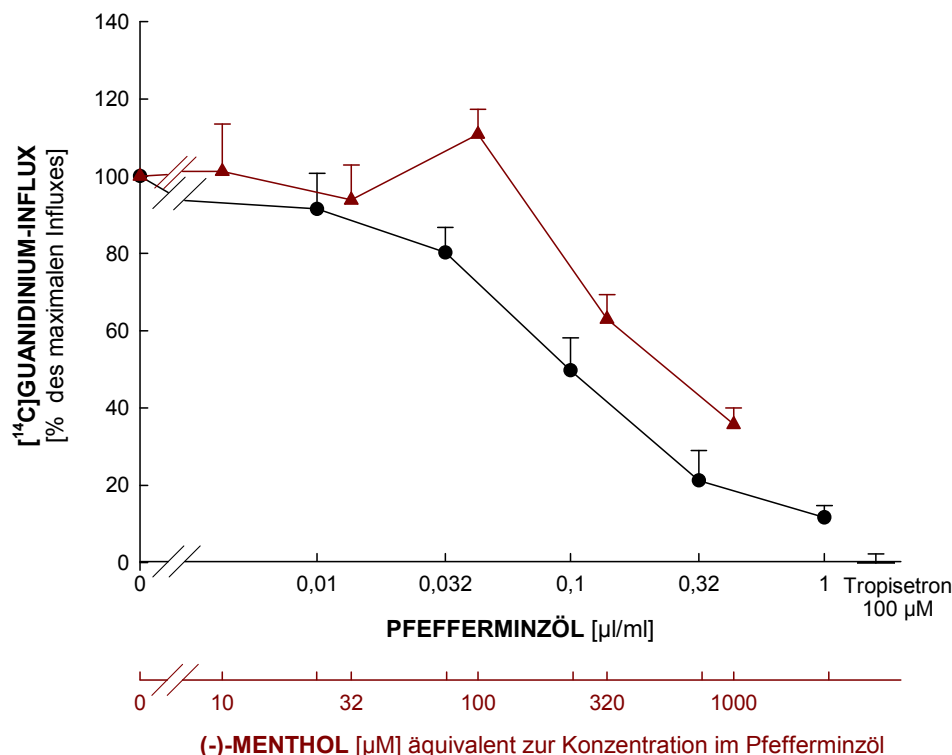
**Abb. 5.20** Beeinflussung des Serotonin-induzierten [<sup>14</sup>C]Guanidinium-Influxes in N1E-115 Zellen durch einen Ingwer-Spezialextrakt der Firma Finzelberg

Gemessen wurde der durch 100 µM Serotonin induzierte Influx des [<sup>14</sup>C]Guanidinium-Kations (5 µM für 2,5 min). Vor Zugabe des Serotonins wurden die Zellen 20 Minuten mit den zu testenden Substanzen vorinkubiert. 100 µM Tropisetron diente als Positivkontrolle; n = 4–6 + SEM.

Der Effekt des Spezialextraktes wurde mit dem Effekt eines durch Riyazi<sup>[153]</sup> im [<sup>14</sup>C]Guanidinium-Assay untersuchten ethanolschen Ingwer-Spissumextraktes verglichen. Dieser inhibierte den Kationeninflux bereits in einer Konzentration von 1 µg/ml um ca. 55 %, während der Spezialextrakt in der vierfach höheren Konzentration von 4 µg/ml nur eine leichte Hemmung des Kationeninfluxes um ca. 16 % bewirkt. 0,1 mg/ml Ingwer-Spissumextrakt hemmten den Serotonin-induzierten [<sup>14</sup>C]Guanidinium-Influx vollständig. Diese Konzentration wurde im Rahmen dieser Arbeit nicht getestet. Dem Kurvenverlauf in Abb. 5.20 kann jedoch entnommen werden, dass auch der Ingwer-Spezialextrakt in einer Konzentration von 0,1 mg/ml den Kationeninflux um ca. 90 % inhibiert. Trotz des hohen Gehalts an Scharfstoffen ist der Spezialextrakt am 5-HT<sub>3</sub>-Rezeptorkanal nicht stärker antagonistisch wirksam als der Ingwer-Spissumextrakt. In Testkonzentrationen im Mikrogrammbereich ist die Wirkung des Ingwer-Spezialextraktes sogar schwächer, während die Extrakte den Kationeninflux im Konzentrationsbereich von 0,1 mg/ml etwa gleich stark hemmen.

### 5.2.1.3 Effekt von Pfefferminzöl und (-)-Menthol auf den [<sup>14</sup>C]Guanidinium-Influx

Pfefferminzöl, verabreicht als magensaftresistente Formulierung, ist ein anerkanntes Therapeutikum zur Behandlung des Reizdarmsyndroms (RDS). Die Wirksamkeit wird zum Teil der Ca<sup>2+</sup>-Kanal-modulierenden Wirkung des Öls und vor allem des Hauptbestandteils (-)-Menthol zugeschrieben. Das im Darmbereich in großen Mengen vorkommende Serotonin ist vermutlich unter anderem durch Wirkung an 5-HT<sub>3</sub>-Rezeptoren an der Pathogenese des RDS beteiligt. Zur Überprüfung, ob neben der Modulation von Ca<sup>2+</sup>-Kanälen ein antagonistischer Effekt am 5-HT<sub>3</sub>-Rezeptor die Wirksamkeit des Pfefferminzöls beim RDS bedingen könnte, wurden Pfefferminzöl und (-)-Menthol im [<sup>14</sup>C]Guanidinium-Influx-Assay an N1E-115 Zellen getestet. Sowohl das ätherische Öl als auch die Hauptkomponente (-)-Menthol hemmen den [<sup>14</sup>C]Guanidinium-Influx konzentrationsabhängig. In Abb. 5.21 sind die Konzentrationen des (-)-Menthols (untere X-Achse) äquivalent zu seinem Anteil im ätherischen Pfefferminzöl aufgetragen. Je näher die Dosis-Wirkungs-Kurve des (-)-Menthols der Kurve des Pfefferminzöls liegen würde, desto größer wäre der Anteil des (-)-Menthols an der Wirkung des ätherischen Öls.



**Abb. 5.21** Effekt von Pfefferminzöl und (-)-Menthol auf den Serotonin-induzierten [<sup>14</sup>C]Guanidinium-Influx in N1E-115 Zellen

Gemessen wurde der durch 100 µM Serotonin induzierte Influx des [<sup>14</sup>C]Guanidinium-Kations (5 µM für 2,5 min). Vor Zugabe des Serotonins wurden die Zellen 20 Minuten mit den zu testenden Substanzen inkubiert. 100 µM Tropisetron diente als Positivkontrolle; n = 4–7 + SEM.

Der Effekt des Pfefferminzöls in Konzentrationen über 0,1 µl/ml wird zu ca. 40–57 % durch (-)-Menthol bedingt. Die Rechtsverschiebung der Konzentrations-Wirkungs-Kurve des (-)-Menthols zeigt, dass neben diesem weitere Inhaltsstoffe an der hemmenden Wirkung des ätherischen Pfefferminzöls auf den [<sup>14</sup>C]Guanidinium-Influx beteiligt sind. Besonders in niedrigen Konzentrationen von 0,032 µl/ml ätherischem Öl vermag dieses den Kationeninflux bereits um 19,8 % ± 6,5 % zu vermindern, während (-)-Menthol in diesem Konzentrationsbereich noch keine 5-HT<sub>3</sub>-Rezeptor-antagonistischen Wirkungen zeigt.

#### 5.2.1.4 Prüfung auf Unspezifität (Versuche mit Veratridin)

Neben einem spezifischen Antagonismus am 5-HT<sub>3</sub>-Rezeptor können auch unspezifische Mechanismen zu einer Verminderung des Kationeninfluxes führen. Zum einen können unspezifische hydrophobe Interaktionen mit der Zellmembran oder mit hydrophoben Bereichen des Rezeptorproteins Auswirkungen auf den [<sup>14</sup>C]Guanidinium-Influx ausüben. Zum anderen ist eine Hemmung des Kationeninfluxes auch durch unspezifische Blockade von Ionenkanälen allgemein möglich. Diese unspezifische Ionenkanalblockade konnte zum Beispiel für Anästhetika<sup>[167]</sup> und Steroide<sup>[168]</sup> nachgewiesen werden. Die neuronalen N1E-115 Zellen exprimieren neben 5-HT<sub>3</sub>-Rezeptoren auch schnelle, spannungsabhängige Natriumkanäle, die durch Veratridin aktiviert werden und ebenso zu einem Influx von Kationen und auch des [<sup>14</sup>C]Guanidiniums führen. Diese Zelllinie kann daher zur Untersuchung eines unspezifischen Ionenkanaleffekts der in den Kapiteln 5.2.1.1 und 5.2.1.3 getesteten Substanzen verwendet werden, indem die hemmenden Effekte dieser Stoffe an 5-HT<sub>3</sub>-Rezeptoren mit denen an spannungsabhängigen Natriumkanälen verglichen werden. Die antagonistischen Effekte der Testsubstanzen auf den Serotonin-induzierten [<sup>14</sup>C]Guanidinium-Influx wurden den Effekten auf den Veratridin-induzierten Influx gegenübergestellt (siehe Tab. 5.8). Von den Bestandteilen des ätherischen Ingweröls wurden die Effekte von Citral und ar-Curcumen getestet, da sie den durch Serotonin induzierten [<sup>14</sup>C]Guanidinium-Influx am stärksten inhibieren. Der Effekt des Ingweröls auf den Veratridin-induzierten [<sup>14</sup>C]Guanidinium-Influx wurde bereits durch Riyazi<sup>[153]</sup> getestet. Das ätherische Öl zeigte dort keine Veratridin-antagonistischen Wirkungen. Wie in Tab. 5.8 dargestellt, inhibieren auch die im Ingweröl enthaltenen Substanzen ar-Curcumen und Citral den Veratridin-induzierten [<sup>14</sup>C]Guanidinium-Influx nicht.

Das ätherische Pfefferminzöl hingegen hemmt in einer Konzentration von 0,32 µl/ml den durch Veratridin induzierten Influx gleich stark wie den Serotonin-induzierten Kationeninflux. Dessen Hauptbestandteil (-)-Menthol zeigt in einer Konzentration von 1 mM jedoch keine Hemmung des Veratridin-Effekts. In der Konzentration von 0,32 µl/ml Pfefferminzöl

sind ca. 750  $\mu\text{M}$  (-)-Menthol enthalten. (-)-Menthol ist also nicht an der unspezifischen Ionenkanalblockade des Pfefferminzöls beteiligt.

Parameter	Blank	Veratridin (300 $\mu\text{M}$ )/ Serotonin (100 $\mu\text{M}$ )	Citral (250 $\mu\text{M}$ )	ar-Curcu- men (x $\mu\text{M}$ )	Pfefferminzöl (0,32 $\mu\text{l/ml}$ )	Menthol (1 mM)	Tropi- setron (100 $\mu\text{M}$ )
Veratridin- induzierter Influx [%]	0	100	114,6 $\pm$ 16,48 (n = 5)	130,1 $\pm$ 27,25 (n = 3) x = 320	20,60 $\pm$ 7,59 (n = 5)	111,6 $\pm$ 13,76 (n = 6)	94,46 $\pm$ 23,71 (n = 7)
Serotonin- induzierter Influx [%]	0	100	3,44 $\pm$ 8,50 (n = 3)	31,75 $\pm$ 4,43 (n = 4) x = 430	21,23 $\pm$ 7,78 (n = 5)	35,74 $\pm$ 4,24 (n = 4)	0,83 $\pm$ 2,49 (n = 15)

**Tab. 5.8** Inhibitorischer Effekt der Testsubstanzen auf den Veratridin- und Serotonin-induzierten [ $^{14}\text{C}$ ]Guanidinium-Influx in N1E-115 Zellen

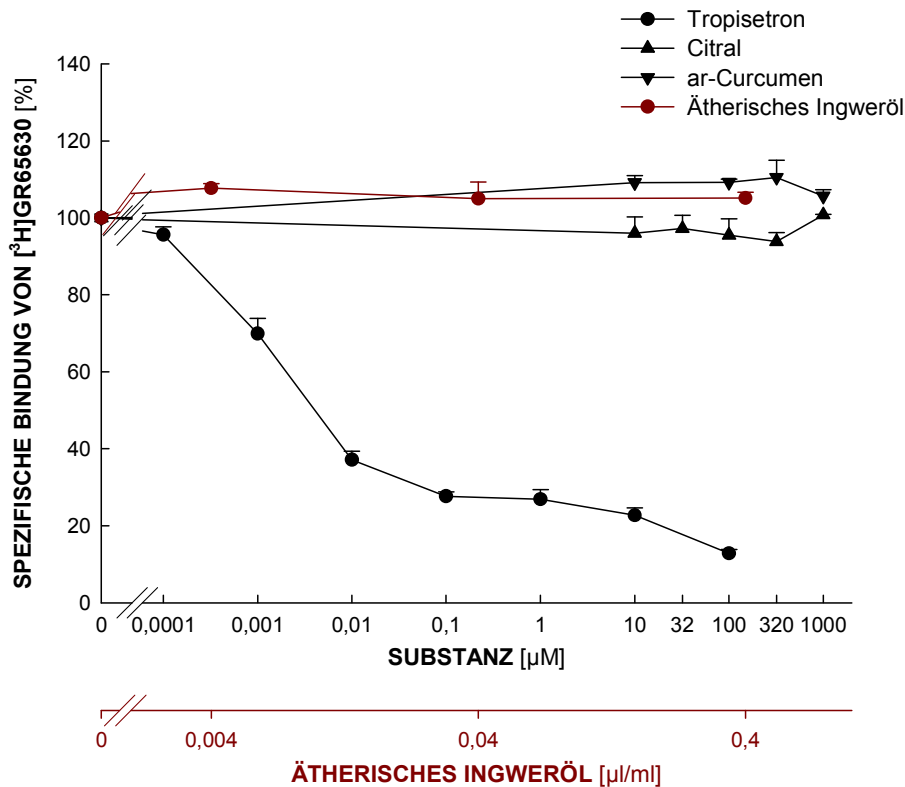
## 5.2.2 Bindungsstudien

Die Bindungsstelle der Ingwerinhaltsstoffe am 5-HT<sub>3</sub>-Rezeptorkanalkomplex wurde bisher nicht identifiziert. Die Scharfstoffe konnten den selektiven 5-HT<sub>3</sub>-Rezeptor-Antagonisten [ $^3\text{H}$ ]GR65630 nicht von seiner Bindungsstelle am 5-HT<sub>3</sub>-Rezeptor verdrängen<sup>[77]</sup>. Sie vermitteln ihre Wirkung somit über eine andere Bindungsstelle als Serotonin und die Setrone, die den Radioliganden kompetitiv verdrängen. Im Folgenden wurde in einer Kompetitionsstudie untersucht, ob die im [ $^{14}\text{C}$ ]Guanidinium-Assay inhibierend wirkenden Inhaltsstoffe des ätherischen Ingweröls und des Pfefferminzöls mit der Bindungsstelle von [ $^3\text{H}$ ]GR65630 interagieren. Die unspezifische Bindung wurde durch Zugabe von 10 mM Serotonin bestimmt und von der Gesamtbindung des Radioliganden subtrahiert (= spezifische Bindung). Alle ermittelten Werte wurden prozentual auf die spezifische Bindung von [ $^3\text{H}$ ]GR65630 als 100 %-Wert bezogen.

### 5.2.2.1 Effekt des Ingweröls und seiner Hauptbestandteile auf die spezifische Bindung von [ $^3\text{H}$ ]GR65630

Zur Untersuchung der Bindungsstelle wurden das ätherische Ingweröl und die Inhaltsstoffe ar-Curcumen und Citral, die zuvor im [ $^{14}\text{C}$ ]Guanidinium-Influx-Assay die stärkste Hemmung auf den Kationeninflux ausübten, getestet.

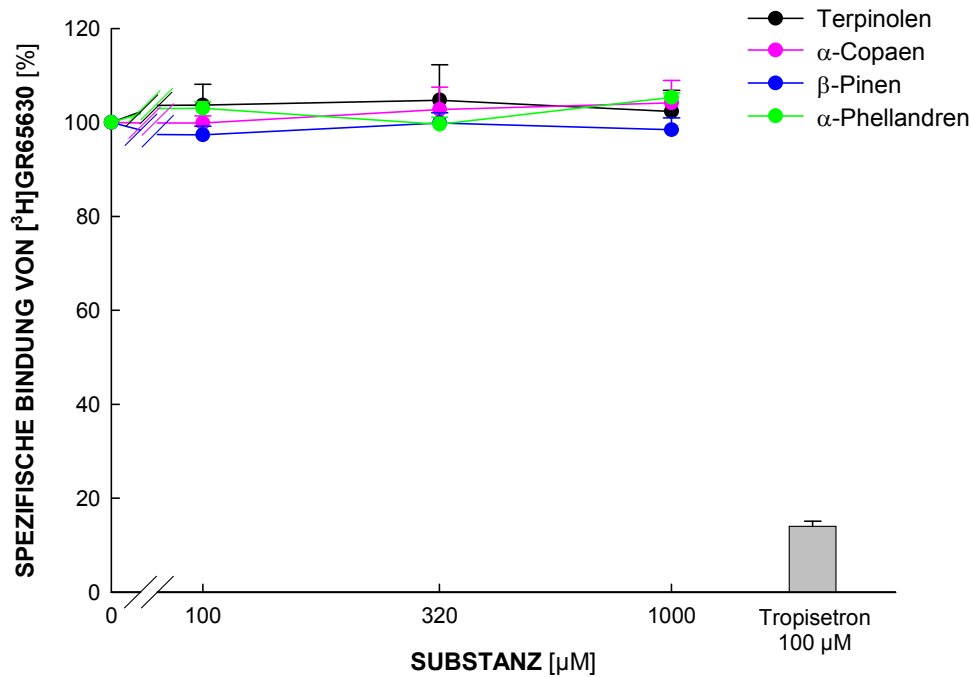
Weder unterschiedliche Konzentrationen des ätherischen Öls noch der Substanzen Citral und ar-Curcumen verdrängen den Radioliganden [ $^3\text{H}$ ]GR65630 von seiner Bindungsstelle. Im Vergleich dazu vermindert Tropisetron die spezifische Bindung des Radioliganden konzentrationsabhängig. Die Ergebnisse sind in Abb. 5.22 graphisch gezeigt.



**Abb. 5.22** Verdrängung von [ $^3\text{H}$ ]GR65630 von 5-HT<sub>3</sub>-Rezeptoren an N1E-115 Zellen durch ätherisches Ingweröl, ar-Curcumen, Citral und Tropisetron

Die Zellen wurden 30 min bei Raumtemperatur mit 0,4 nM [ $^3\text{H}$ ]GR65630 und unterschiedlichen Konzentrationen der Testsubstanzen inkubiert. Nach Waschen und Zellyse wurde die spezifische Bindung des Radioliganden bestimmt; n = 4–5 + SEM.

In vorherigen Arbeiten im Arbeitskreis Verspohl konnte Riyazi<sup>[153]</sup> einen antagonistischen Effekt am 5-HT<sub>3</sub>-Rezeptorkanal für Terpinolen, α-Copaen, β-Pinen und α-Phellandren, weitere Komponenten des ätherischen Ingweröls, belegen. Zur Überprüfung, ob eine der Substanzen mit der Bindungsstelle von [ $^3\text{H}$ ]GR65630 interagiert, wurden auch diese Inhaltsstoffe des Ingweröls in die Bindungsstudie mit einbezogen. Die Ergebnisse, in Abb. 5.23 graphisch dargestellt, belegen jedoch, dass diese Substanzen den Radioliganden ebenso wenig von seiner Bindungsstelle verdrängen wie die bisher getesteten Ingwerinhaltsstoffe.

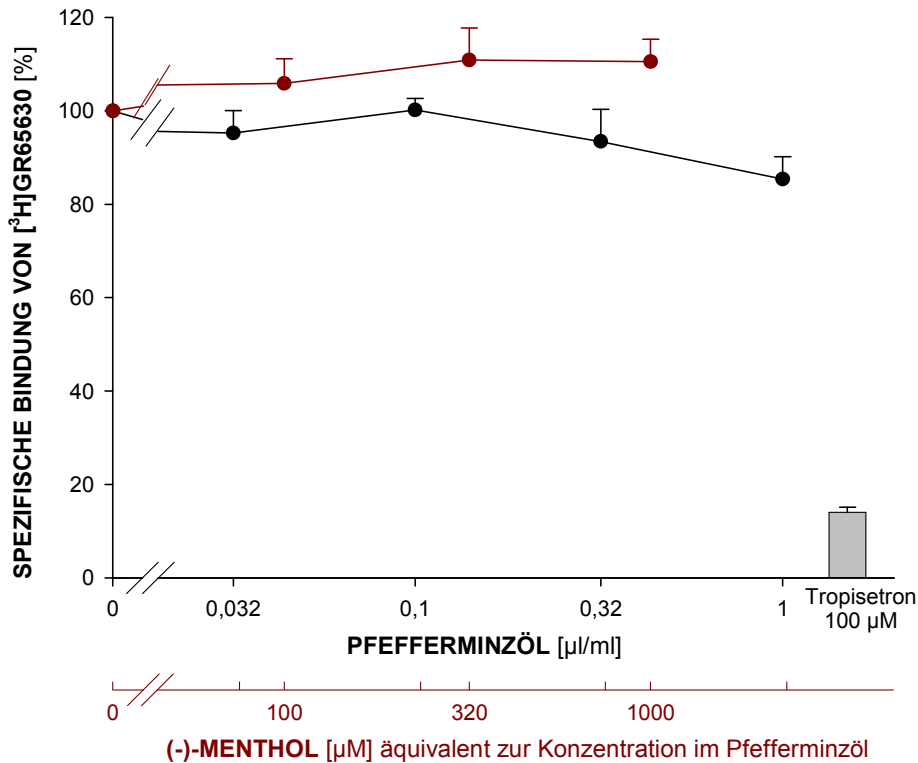


**Abb. 5.23 Verdrängung von  $[^3\text{H}]$ GR65630 von 5-HT<sub>3</sub>-Rezeptoren an N1E-115 Zellen durch Bestandteile des Ingweröls**

Die Zellen wurden 30 min bei Raumtemperatur mit 0,4 nM  $[^3\text{H}]$ GR65630 und unterschiedlichen Konzentrationen der Testsubstanzen inkubiert. Nach Waschen und Zelllyse wurde die spezifische Bindung des Radioliganden bestimmt. Als Positivkontrolle diente 100 µM Tropisetron; n = 4 + SEM.

### 5.2.2.2 Effekt des Pfefferminzöls und des (-)-Menthols auf die spezifische Bindung von $[^3\text{H}]$ GR65630

Trotz eines offenbar unspezifischen Ionenkanaleffekts des Pfefferminzöls wurde in den folgenden Untersuchungen überprüft, ob dieses Naturstoffgemisch und der Hauptbestandteil (-)-Menthol mit der Bindungsstelle des selektiven 5-HT<sub>3</sub>-Rezeptor-Liganden  $[^3\text{H}]$ GR65630 interagieren. Wie in Abb. 5.24 graphisch dargestellt, hemmt (-)-Menthol die spezifische Bindung des Radioliganden nicht. Pfefferminzöl verringert statistisch signifikant in hohen Konzentrationen von 1 µl/ml die spezifische Bindung von  $[^3\text{H}]$ GR65630 auf  $85,4 \pm 4,8 \%$  ( $p = 0,0322$ ). Diese Wirkung kann durch die Interaktion von einer im Pfefferminzöl enthaltenen Substanz mit dem Radioliganden bedingt sein. Des Weiteren könnte die Bindung von  $[^3\text{H}]$ GR65630 auch durch die hohe Konzentration des ätherischen Pfefferminzöls und damit verbundene lipophile Effekte vermindert sein.



**Abb. 5.24 Verdrängung von  $[^3\text{H}]$ GR65630 von  $5\text{-HT}_3$ -Rezeptoren an N1E-115 Zellen durch Pfefferminzöl und seinen Hauptbestandteil (-)-Menthol**

Die Zellen wurden 30 min bei Raumtemperatur mit  $0,4\text{ nM}$   $[^3\text{H}]$ GR65630 und unterschiedlichen Konzentrationen der Testsubstanzen inkubiert. Nach Waschen und Zellyse wurde die spezifische Bindung des Radioliganden bestimmt. Als Positivkontrolle diente  $100\text{ }\mu\text{M}$  Tropisetron;  $n = 4\text{--}5 + \text{SEM}$ .

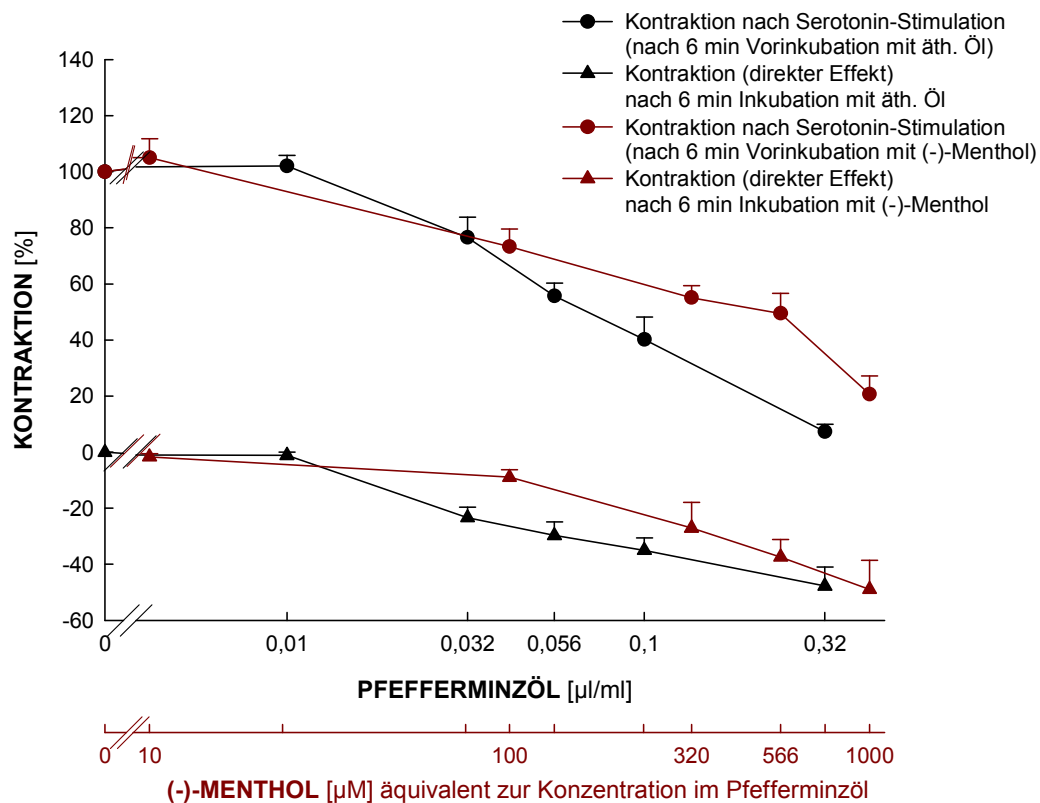
### 5.2.3 Versuche am Ileum der Ratte

Zusätzlich zu den *in vitro*-Untersuchungen an N1E-115 Zellen wurden die anti-serotonergen Effekte des Pfefferminzöls und des (-)-Menthols sowie des Ingwer-Spezial-extraktes am isolierten Rattenileum getestet. Sowohl die Beeinflussung der Serotonin-induzierten Spontankontraktion durch unterschiedliche Testsubstanzenkonzentrationen als auch der nach einer definierten Vorinkubationszeit von 6 bzw. 4 Minuten eingetretene Eigeneffekt der Testsubstanzen wurden erfasst. Alle Effekte wurden auf die vor jedem Versuch durch Zugabe von Serotonin ausgelöste Kontraktion als 100 %-Wert bezogen.

#### 5.2.3.1 Antiserotonerge Wirkung von Pfefferminzöl und (-)-Menthol am Ileum der Ratte

Sowohl das ätherische Pfefferminzöl als auch sein Hauptbestandteil (-)-Menthol hemmen konzentrationsabhängig die durch Serotonin induzierte Spontankontraktion des

Ileums. Beide Substanzen vermindern konzentrationsabhängig während der Vorinkubation den Basistonus des isolierten Organs. In Abb. 5.25 sind die anti-serotonergen und direkt relaxierenden Wirkungen von Pfefferminzöl und (-)-Menthol dargestellt, wobei (-)-Menthol in dieser Abbildung äquivalent zur Konzentration im Pfefferminzöl aufgetragen ist. Als Lösungsmittel wurde in den Versuchen Ethanol eingesetzt. Die im Versuch maximal eingesetzte Ethanolkonzentration von 0,16 % (entsprechend der Konzentration bei 0,32  $\mu\text{l/ml}$  Pfefferminzöl) zeigt keinen Eigeneffekt am Rattenileum.



**Abb. 5.25** Effekt von Pfefferminzöl und (-)-Menthol auf die Serotonin-induzierte Kontraktion am isolierten Rattenileum

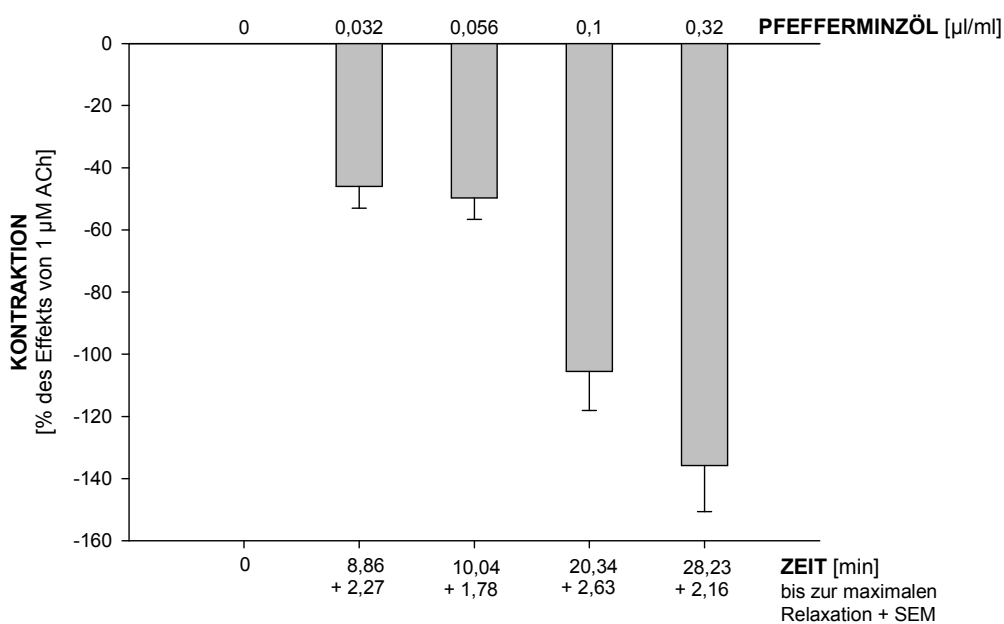
Die Serotonin-Zugabe (10  $\mu\text{M}$ ) erfolgte nach 6-minütiger Vorinkubation mit unterschiedlichen Konzentrationen der Testsubstanzen. Der Eigeneffekt der Substanzen während der Vorinkubation wurde erfasst (direkter Effekt);  $n = 4-8 + \text{SEM}$ .

Die Dosis-Wirkungs-Kurven der Substanzen in Abb. 5.25 zeigen im Vergleich miteinander bei Betrachtung beider Effekte einen annähernd parallelen Verlauf. Dies deutet darauf hin, dass (-)-Menthol zu einem großen Teil die antiserotonerge und auch die tonussenkende Wirkung des Pfefferminzöls bewirkt. Die leichte Rechtsverschiebung der Dosis-Wirkungs-Kurve des (-)-Menthols zeigt aber, dass auch andere im ätherischen Pfefferminzöl enthaltene Substanzen an den Effekten des Öls beteiligt sind. Neben dem Basistonus



werden auch die Eigenkontraktionen des Ileums mit zunehmenden Pfefferminzöl-Konzentrationen vermindert, bis sie schließlich bei einer Konzentration von 0,32  $\mu\text{l/ml}$  vollständig ausbleiben (Daten nicht gezeigt).

Der relaxierende Eigeneffekt des Pfefferminzöls wurde bis hierher stets nach der Vorinkubation von 6 Minuten durch die Zugabe von Serotonin unterbrochen. Daher wurde in einer weiteren Versuchsreihe die tonussenkende Wirkung des Pfefferminzöls am isolierten Ileum der Ratte untersucht. Pfefferminzöl bewirkt konzentrationsabhängig am isolierten Rattenileum eine Senkung des Basistonus. Je höher die Dosis, desto länger dauert es bis zur Einstellung einer neuen Basislinie (siehe Abb. 5.26).



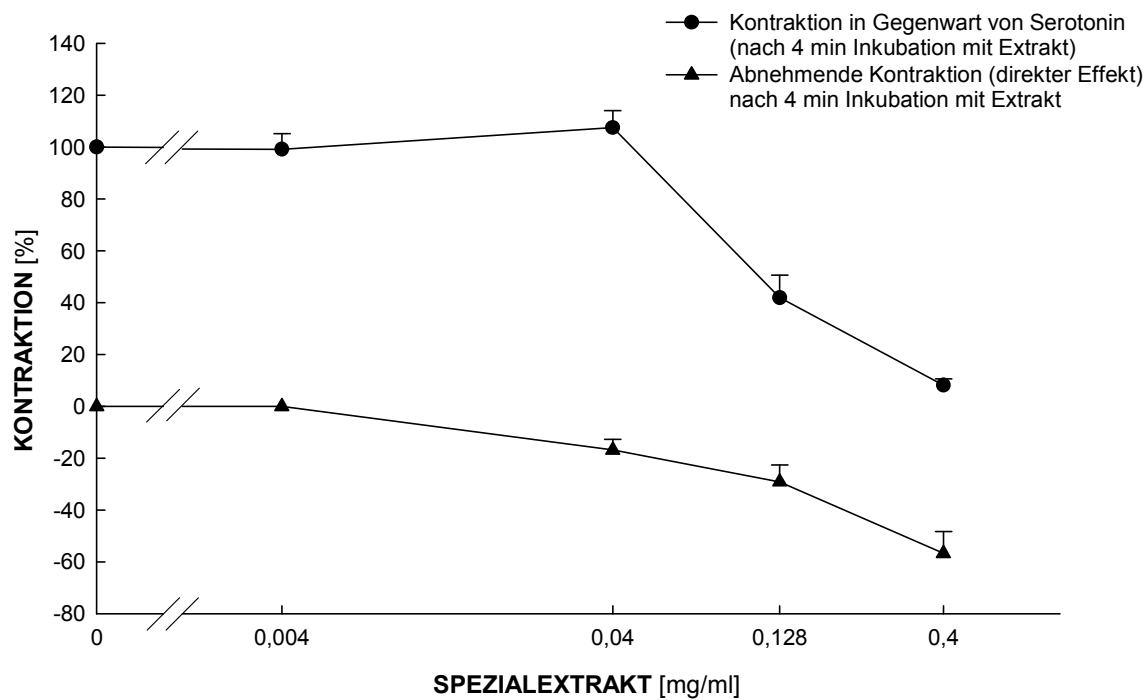
**Abb. 5.26 Eigeneffekt von Pfefferminzöl auf den Basistonus des isolierten Rattenileums**

Das Ileum wurde mit unterschiedlichen Konzentrationen Pfefferminzöl inkubiert. Das Ausmaß der Relaxation und die Zeit bis zur maximalen Relaxation wurden bestimmt. Die durch 1  $\mu\text{M}$  ACh hervorgerufene Kontraktion vor jedem Versuch diente jeweils als Bezugswert;  $n = 9 + \text{SEM}$ .

### 5.2.3.2 Testung des Ingwer-Spezialextraktes am Rattenileum

Der bereits im [ $^{14}\text{C}$ ]Guanidinium-Assay getestete ölige Ingwer-Spezialextrakt der Firma Finzelberg mit einem erhöhten Scharfstoff-Gehalt von  $> 25\%$  wurde zur weiteren Charakterisierung am Ileum der Ratte getestet. Die Wirkung des Spezialextraktes auf die durch Serotonin induzierte Kontraktion des Rattenileums wurde anschließend mit zuvor im Arbeitskreis untersuchten Ingwerextrakten verglichen. Wie in Abb. 5.27 graphisch dargestellt, vermindert der ölige Spezialextrakt konzentrationsabhängig sowohl die Serotonin-induzierte Kontraktion als auch den Basistonus des Ileums während der 4-minütigen Vorinkubation. Ein leichter direkt relaxierender Effekt ( $-16,8 \pm 4,1\%$ ) tritt

bereits in niedrigen Konzentrationen von 0,04 mg/ml auf. Die durch Serotonin induzierte Kontraktion wird in dieser Konzentration noch nicht beeinflusst. Durch 0,4 mg/ml Extrakt wird diese bis zu einer Restkontraktion von  $8,2 \pm 2,5$  % vermindert. Zur Verbesserung der Löslichkeit des Extraktes wurden maximal 0,15 % Ethanol zugesetzt, die in einer Parallelbestimmung keinen Eigeneffekt zeigten.



**Abb. 5.27** Effekt eines Ingwer-Spezialextraktes der Firma Finzelberg auf die Serotonin-induzierte Kontraktion des Rattenileums

Die Serotonin-Zugabe ( $10 \mu\text{M}$ ) erfolgte nach 4-minütiger Vorinkubation mit unterschiedlichen Extraktkonzentrationen. Der Eigeneffekt des Extraktes vor Zugabe des Serotonins wurde erfasst (direkter Effekt);  $n = 4-8 + \text{SEM}$ .

Der bereits im [ $^{14}\text{C}$ ]Guanidinium-Assay für die Wirkung des Ingwer-Spezialextraktes als Vergleichsextrakt herangezogene Ingwer-Spissumextrakt wurde auch hier zur Bewertung verwendet. Der Spissumextrakt wurde in vorherigen Arbeiten im Arbeitskreis Verspohl (Daten nicht veröffentlicht) in einer Konzentration von 0,5 mg/ml am Rattenileum getestet und verminderte nach einer Inkubationszeit von 5 min die Serotonin-induzierte Kontraktion um 58 %. Im Vergleich dazu bewirken 0,4 mg/ml Spezialextrakt eine Hemmung der Serotonin-induzierten Spontankontraktion um 91,8 %. Der Spezialextrakt zeigt am Rattenileum also eine stärkere antiserotonerge Wirkung als der Ingwer-Spissumextrakt.

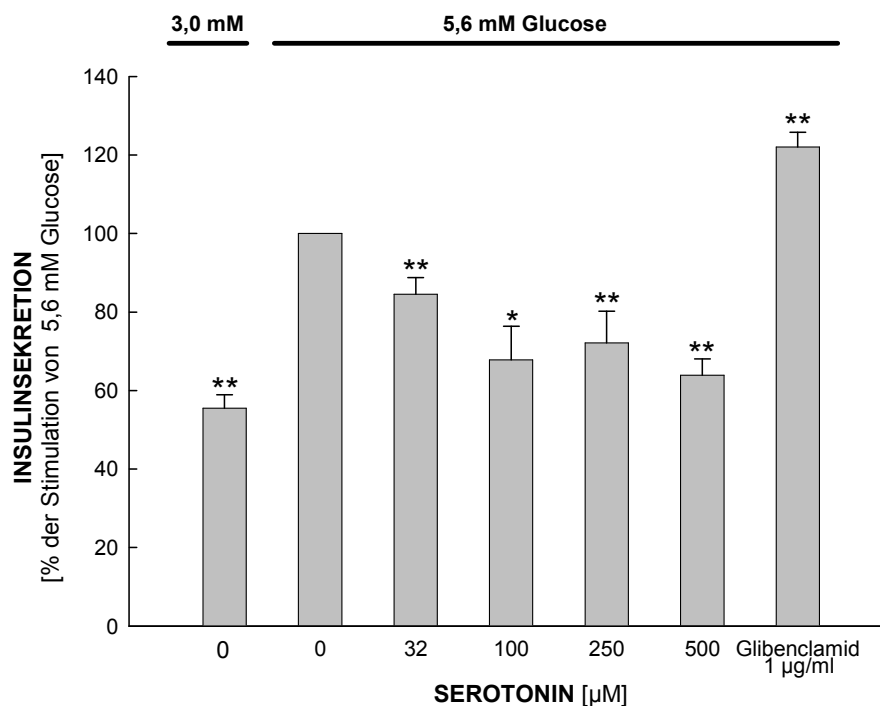
#### 5.2.4 Pharmakologische Untersuchung zum antidiabetischen Wirkungsmechanismus von Ingwerextrakten

Durch Verabreichung von Serotonin und Serotonin-Rezeptoragonisten wurden in unterschiedlichen *in vivo*-Versuchen an Ratten und Mäusen Hyperglykämien induziert<sup>[169-172]</sup>. Zawalich *et al.*<sup>[173]</sup> zeigten 2001, dass 500  $\mu\text{M}$  Serotonin die durch 8 und 15 mM Glucose stimulierte Insulinsekretion aus isolierten, perfundierten  $\beta$ -Zellen der Ratte statistisch signifikant inhibieren. Eine 3-stündige Vorinkubation der  $\beta$ -Zellen mit 500  $\mu\text{M}$  Serotonin resultierte in einer noch stärkeren Hemmung der durch 15 mM Glucose induzierten Insulinsekretion. In einer *in vivo*-Studie von Akhani *et al.* (2004)<sup>[172]</sup> wurde die Auswirkung des antiserotonergen Effekts eines Ingwer-Presssaftes an gesunden Ratten und an Ratten mit Streptozotocin-induziertem Typ 1-Diabetes getestet. Die bei normoglykämischen Ratten durch Serotonin induzierte Hyperglykämie und Hypoinsulinämie wurde durch den Ingwer-Saft inhibiert. Der Ingwer-Saft allein zeigte keine Effekte auf den Glucose- und Insulinspiegel. Die Behandlung der diabetischen Tiere führte zu einer signifikanten Zunahme der Insulinspiegel und zu einer Abnahme des Nüchtern-Glucose-Spiegels. Diese Ergebnisse weisen auf einen eventuellen antidiabetischen Effekt hin, an dem möglicherweise antiserotonerge Wirkungen der Ingwerinhaltsstoffe beteiligt sind. Inwieweit 5-HT<sub>3</sub>-Rezeptoren in diesem Kontext eine Rolle spielen, ist bisher nicht geklärt. In einem *in vivo*-Experiment durch Goyal *et al.* (2003)<sup>[174]</sup> inhibierten jedoch der 5-HT<sub>3</sub>-Rezeptor-Antagonist Ondansetron und der 5-HT<sub>2A</sub>-Rezeptor-Antagonist Sarpogrelat eine Serotonin-induzierte Hyperglykämie.

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurde der Effekt von zwei unterschiedlichen antiserotonerg wirkenden Ingwerextrakten auf die durch Serotonin verminderte Insulinsekretion an INS-1 Zellen getestet. In weiteren Insulinsekretions-Versuchen wurde die Rolle des 5-HT<sub>3</sub>-Rezeptors an der Wirkung des Serotonins untersucht. Die Insulinsekretion der Zellen unter einem Glucosestimulus von 5,6 mM ohne Zusatz weiterer Substanzen diente als Referenzwert (100 %-Wert). Alle ermittelten Ergebnisse wurden prozentual auf diesen Wert bezogen. Als Kontrollwerte wurden die Basalsekretion bei 3,0 mM Glucose und die Insulinsekretion unter Einfluss von Glibenclamid erfasst.

### 5.2.4.1 Effekt von Serotonin auf die Insulinsekretion

Zunächst wurde überprüft, ob und in welchem Ausmaß die durch Zawalich *et al.*<sup>[173]</sup> beschriebene Hemmung der Insulinsekretion an isolierten  $\beta$ -Zellen der Ratte auf die Insulinomazelllinie INS-1 übertragbar ist. Daher wurde die Wirkung von Serotonin auf die durch 5,6 mM Glucose stimulierte Insulinsekretion an INS-1 Zellen bestimmt. Serotonin hemmt in Konzentrationen zwischen 32 und 500  $\mu$ M statistisch signifikant die Glucose-induzierte Insulinsekretion. Die Insulinsekretionshemmung durch 100–500  $\mu$ M Serotonin liegt zwischen  $27,9 \pm 8$  % (durch 250  $\mu$ M Serotonin) und  $36,1 \pm 4,2$  % (durch 500  $\mu$ M Serotonin). Die Insulinsekretion wird durch 100  $\mu$ M Serotonin etwas stärker gehemmt als durch 250  $\mu$ M Serotonin. Dieser Unterschied weist allerdings keine statistische Signifikanz auf. Die Ergebnisse sind graphisch in Abb. 5.28 dargestellt.



**Abb. 5.28** Effekt von Serotonin auf die Glucose-induzierte Insulinsekretion an INS-1 Zellen

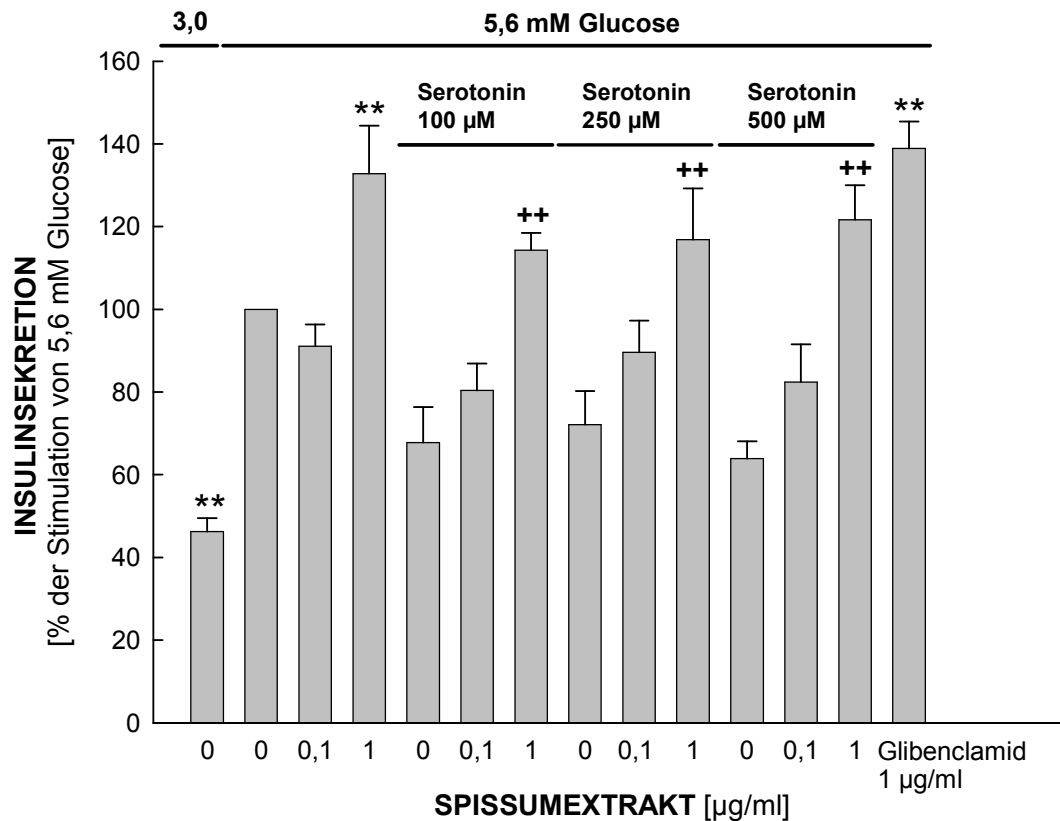
Die Zellen wurden 90 min bei 37 °C mit unterschiedlichen Konzentrationen der Testsubstanzen inkubiert. Die Bestimmung des sezernierten Insulins erfolgte mittels Radioimmunoassay; n = 5–14 + SEM; \*: p < 0,05; \*\*: p < 0,01.

Serotonin bewirkt an INS-1 Zellen in Konzentrationen über 32  $\mu$ M eine Hemmung der Insulinsekretion. Durch Riyazi<sup>[153]</sup> wurden bereits im gleichen Testsystem Serotoninkonzentration ab 10 fM eingesetzt, die allerdings zu keiner Hemmung der Insulinsekretion führten.

#### 5.2.4.2 Beeinflussung der durch Serotonin verminderten Insulinsekretion durch zwei Ingwerextrakte

Die antiserotonerge und vor allem die 5-HT<sub>3</sub>-Rezeptor-antagonistische Wirkung von Ingwerextrakten wurde in zahlreichen *in vitro*-Studien und im Rahmen dieser Arbeit durch Testung des Ingwer-Spezialextraktes im [<sup>14</sup>C]Guanidinium-Influx und am Rattenileum belegt. Unter Verwendung von zwei Ingwerextrakten wurde getestet, ob ein Effekt auf die Serotonin-induzierte Hemmung der Insulinsekretion ausgeübt wird. Da das Inhaltsstoff-Spektrum von Ingwerextrakten nicht standardisiert ist, wurden zwei unterschiedliche antiserotonerg wirkende Ingwerextrakte eingesetzt. Bei dem einen Ingwerextrakt handelt es sich um den bereits in den Kapiteln 5.2.1.2 und 5.2.3.2 getesteten öligen Spezialextrakt mit einem erhöhten Scharfstoff-Gehalt > 25 % (= Spezialextrakt). Der zweite Ingwerextrakt ist ein ethanolischer Ingwer-Spissumextrakt (= Spissumextrakt), der bereits im Rahmen dieser Arbeit zum Vergleich der durch den Ingwer-Spezialextrakt ausgeübten Effekte verwendet wurde. Neben der Bestimmung der antiserotonergen Wirkung wurde der Eigeneffekt oder direkte Effekt der Ingwerextrakte auf die Insulinsekretion der INS-1 Zellen untersucht.

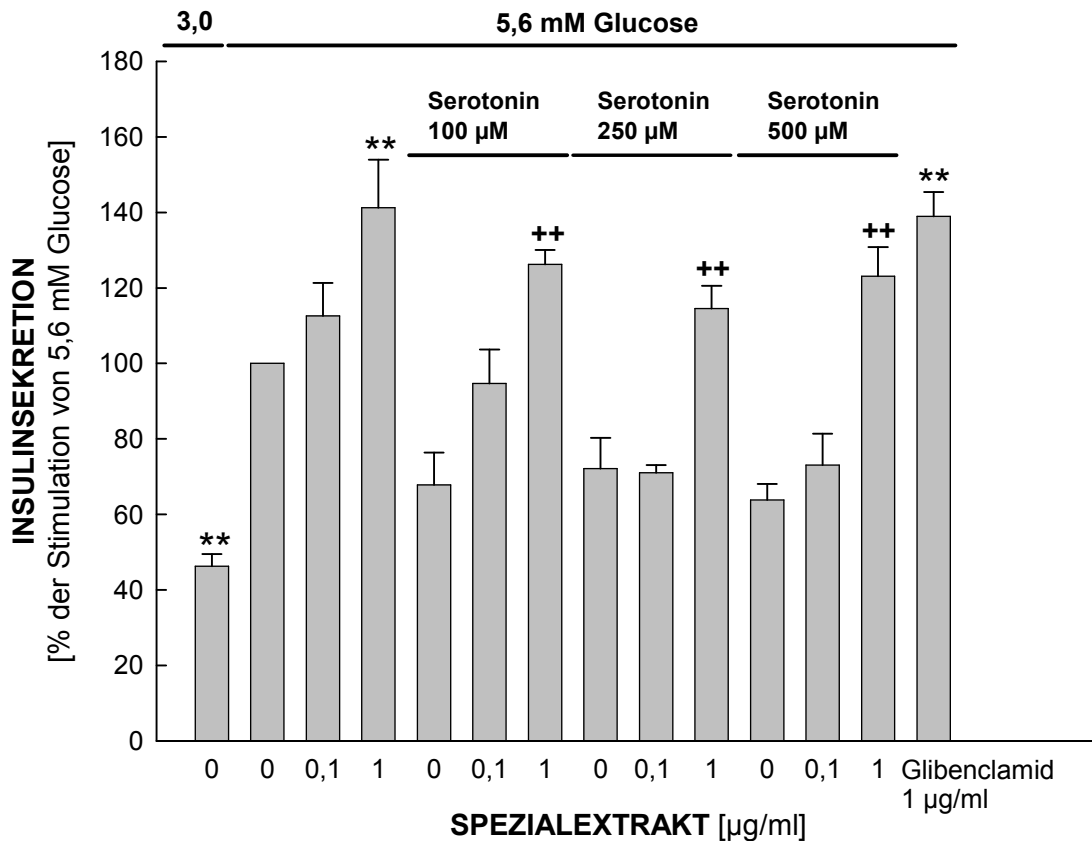
Wie die Abb. 5.29 und Abb. 5.30 graphisch verdeutlichen, bewirken beide Ingwerextrakte in einer Konzentration von 1 µg/ml eine statistisch signifikante Steigerung der Insulinsekretion um  $43 \pm 11,7 \%$  (Spissumextrakt) bzw.  $41,2 \pm 12,8 \%$  (Spezialextrakt). Bei Anwendung von Extraktkonzentrationen zwischen 10 und 20 µg/ml konnte keine signifikante Steigerung der Insulinsekretion beobachtet werden. Die mikroskopische Betrachtung der Zellen führte jedoch zu dem Ergebnis, dass sich bei 10 µg/ml Extrakt die Form der Zellen und ihre Adhäsion am Boden der Wells verändert. Bei einer Extraktkonzentration von 20 µg/ml war das Ablösen der Zellen bereits mit bloßem Auge sichtbar. In Konzentrationen bis 1 µg/ml Extrakt waren mikroskopisch keine Veränderung der INS-1 Zellen sichtbar. In der Arbeit von Riyazi<sup>[153]</sup> zeigte ein Ingwer-Hexanextrakt in Konzentrationen bis 0,004 µl/ml keinen Effekt auf die Insulinsekretion.



**Abb. 5.29** Beeinflussung der durch Serotonin verminderten Insulinsekretion durch einen Ingwer-Spissumextrakt

Die Zellen wurden 90 min bei 37 °C mit unterschiedlichen Konzentrationen der Testsubstanzen inkubiert. Die Bestimmung des sezernierten Insulins erfolgte mittels Radioimmunoassay; n = 4–16 + SEM; \*\*: p < 0,01 (verglichen mit Glucose 5,6 mM); ++: p < 0,01 (verglichen mit dem zugehörigen Serotonin-Wert ohne Extraktzusatz).

Durch Zusatz von 1 µg/ml der beiden Extrakte wird die durch 100 und 500 µM Serotonin induzierte Hemmung der Insulinsekretion vollständig aufgehoben. Dabei kommt es sogar zur Steigerung der Insulinsekretion über den 100 %-Wert (5,6 mM Glucose) hinaus (siehe Abb. 5.29 und Abb. 5.30). Die Zunahme der Insulinsekretion kommt vermutlich einerseits durch den Eigeneffekt der Ingwerextrakte, andererseits aber auch durch einen direkten Antagonismus zustande, da die Steigerung der Sekretion über den Eigeneffekt der Ingwerextrakte hinausgeht. Nur bei einer Serotoninkonzentration von 250 µM entspricht die Zunahme der Insulinsekretion durch 1 µg/ml der Extrakte ungefähr den Eigeneffekten. Für einen Antagonismus der Wirkung des Serotonins spricht aber des Weiteren, dass 0,1 µg/ml des Spissumextraktes die durch 100–500 µM induzierte Hemmung der Insulinsekretion vermindert, obwohl der Extrakt in dieser Konzentration keinen direkten steigernden Effekt auf die Insulinsekretion aufweist. Die Ergebnisse zur Wirkung von 0,1 µg/ml Spissumextrakt waren zwar nicht statistisch signifikant, die Tendenz ist anhand Abb. 5.29 aber deutlich erkennbar.



**Abb. 5.30** Beeinflussung der durch Serotonin verminderten Insulinsekretion durch einen Ingwer-Spezialextrakt

Die Zellen wurden 90 min bei 37 °C mit unterschiedlichen Konzentrationen der Testsubstanzen inkubiert. Die Bestimmung des sezernierten Insulins erfolgte mittels Radioimmunoassay; n = 4–25 + SEM; \*\*: p < 0,01 (verglichen mit Glucose 5,6 mM); \*\*: p < 0,01 (verglichen mit dem zugehörigen Serotonin-Wert ohne Extraktzusatz).

#### 5.2.4.3 Effekt der Ingwerextrakte auf die Insulinsekretion im calciumfreien Medium

Wie zuvor beschrieben, verändern sich die INS-1 Zellen bei Zugabe von Extrakt-Konzentrationen über 10 µg/ml morphologisch. Die durch 1 µg/ml Extrakt hervorgerufene Steigerung der Insulinsekretion könnte theoretisch also auch durch eine mikroskopisch nicht sichtbare Schädigung der Zellen und speziell der Insulingranula bedingt sein. Auch dadurch kann es zu einer massiven Insulinfreisetzung kommen. Zur Überprüfung dieses Aspektes wurde die Insulinsekretion der INS-1 Zellen in calciumfreiem Medium (mit 5,6 mM Glucose) unter Zusatz von jeweils 1 µg Extrakt pro ml untersucht. Das calciumfreie Medium wurde gewählt, da die Glucose-induzierte Insulin-Freisetzung nur Ca<sup>2+</sup>-abhängig verläuft, während eine durch toxische Einflüsse bedingte Insulinfreisetzung auch unabhängig von Ca<sup>2+</sup>-Ionen erfolgen kann.

In den Versuchen wurde gezeigt, dass INS-1 Zellen in calciumfreiem Medium weder unter Einfluss des Spissumextraktes noch des Spezialextraktes größere Mengen an Insulin sezernieren. Bezogen auf die durch 5,6 mM Glucose in calciumhaltigem Medium sezernierte Insulinmenge beläuft sich die Insulinsekretion in diesen calciumfreien Experimenten auf 12 % (Spissumextrakt) bzw. 14,3 % (Spezialextrakt). Dies bedeutet, dass die unter Extrakt-Einfluss gesteigerte Insulinsekretion auf etwa 140 % nicht durch toxische Einflüsse, sondern durch eine Stimulierung der calciumabhängigen Insulinsekretion bewirkt wird.

#### **5.2.4.4 Bindungsstudie zum Nachweis von 5-HT<sub>3</sub>-Rezeptoren auf INS-1 Zellen**

Die Existenz von 5-HT<sub>3</sub>-Rezeptoren in pankreatischen  $\beta$ -Zellen der Ratte wurde bisher nicht nachgewiesen. Um eine Rolle der 5-HT<sub>3</sub>-Rezeptoren an der durch Serotonin induzierten Hemmung der Insulinsekretion untersuchen zu können, musste zunächst belegt werden, dass die INS-1 Zellen 5-HT<sub>3</sub>-Rezeptoren exprimieren. In einem Bindungsexperiment mit dem selektiven 5-HT<sub>3</sub>-Rezeptor-Antagonisten [<sup>3</sup>H]GR65630 konnte die Anwesenheit von 5-HT<sub>3</sub>-Rezeptoren in INS-1 Zellen belegt werden. Die durch Zugabe von 10 mM Serotonin ermittelte unspezifische Bindung beträgt 14,8 % der Maximalbindung (total binding). 100  $\mu$ M Tropisetron verdrängt 34,2 % des an INS-1 Zellen spezifisch gebundenen [<sup>3</sup>H]GR65630 von seiner Bindungsstelle am 5-HT<sub>3</sub>-Rezeptor.

#### **5.2.4.5 Wirkungen der Ingwerextrakte auf die spezifische Bindung von [<sup>3</sup>H]GR65630 an INS-1 Zellen**

Die in den Insulinsekretionsversuchen verwendeten Extrakte vermitteln ihre Wirkung möglicherweise über einen Antagonismus an 5-HT<sub>3</sub>-Rezeptoren. Im Rahmen der Bindungsstudien an N1E-115 Zellen wurde bereits gezeigt, dass die Ingwerinhaltsstoffe den selektiven 5-HT<sub>3</sub>-Rezeptor-Antagonisten [<sup>3</sup>H]GR65630 nicht von seiner Bindungsstelle verdrängen. Zur Absicherung wurde der Effekt der beiden Extrakte auf die spezifische Bindung von [<sup>3</sup>H]GR65630 zusätzlich an INS-1 Zellen untersucht. Wie erwartet, verdrängt keiner der beiden Extrakte in einer Konzentration von 1  $\mu$ g/ml den Radioliganden von seiner Bindungsstelle am 5-HT<sub>3</sub>-Rezeptor.

#### **5.2.4.6 Untersuchungen zur Rolle des 5-HT<sub>3</sub>-Rezeptors an der durch Serotonin induzierten Hemmung der Insulinsekretion**

Bisher ist unklar, über welche Rezeptoren Serotonin die Hemmung der Insulinsekretion induziert. Durch Zugabe unterschiedlicher Serotonin-Antagonisten wurde

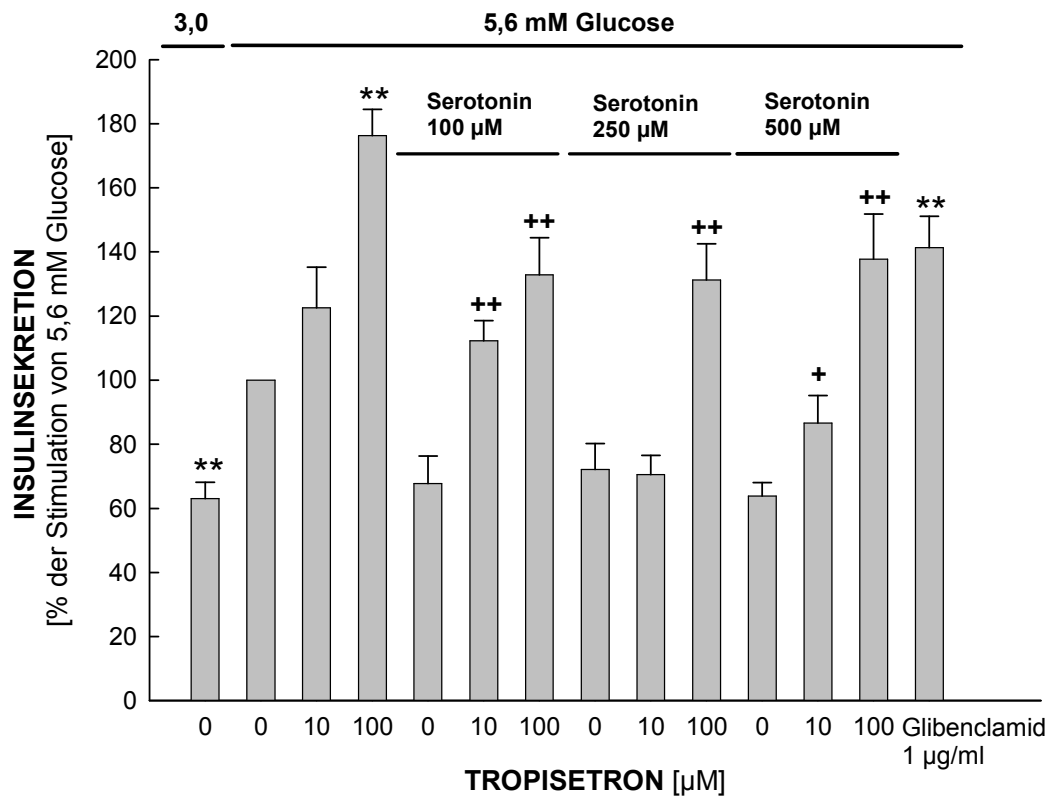


überprüft, welche serotonergen Rezeptoren an der Verminderung der Insulinsekretion durch Serotonin beteiligt sind. Ein besonderes Augenmerk liegt auch hier auf einer möglichen Involvierung von 5-HT<sub>3</sub>-Rezeptoren, um einen Bezug zur 5-HT<sub>3</sub>-Rezeptorkanal-antagonistischen Wirkung der Ingwerextrakte herstellen zu können. Als Serotonin-Antagonisten wurden der 5-HT<sub>3</sub>/(5-HT<sub>4</sub>)-Rezeptor-Antagonist Tropisetron, der unselektive 5-HT<sub>1/2/5/7</sub>-Rezeptor-Antagonist Methysergid und der 5-HT<sub>2A+C</sub>-Rezeptor-Antagonist Ketanserin verwendet.

Zur Bestimmung des Serotonin-antagonistischen Effekts wurden die INS-1 Zellen jeweils gleichzeitig mit Serotonin und dem jeweiligen Antagonisten versetzt. Der direkte Effekt der Substanzen auf die Insulinsekretion wurde ebenfalls erfasst.

Tropisetron selbst bewirkt in einer Konzentration von 100 µM eine statistisch signifikante Steigerung der Insulinsekretion auf  $176,3 \pm 8,2$  %. Bereits 10 µM Tropisetron steigert die Sekretion auf  $122,5 \pm 12,7$  %. Dieser Wert ist zwar ohne statistische Signifikanz, bestärkt aber die Tendenz der konzentrationsabhängigen Steigerung der Insulinsekretion durch diesen Antagonisten. Anhand Abb. 5.31 wird deutlich, dass 100 µM Tropisetron den die Insulinsekretion hemmenden Effekt von 100–500 µM Serotonin aufhebt und insgesamt zu einer Steigerung der Insulinsekretion führt. Die durch 100 und 500 µM Serotonin induzierte Sekretionshemmung wird bereits durch 10 µM Tropisetron statistisch signifikant inhibiert.

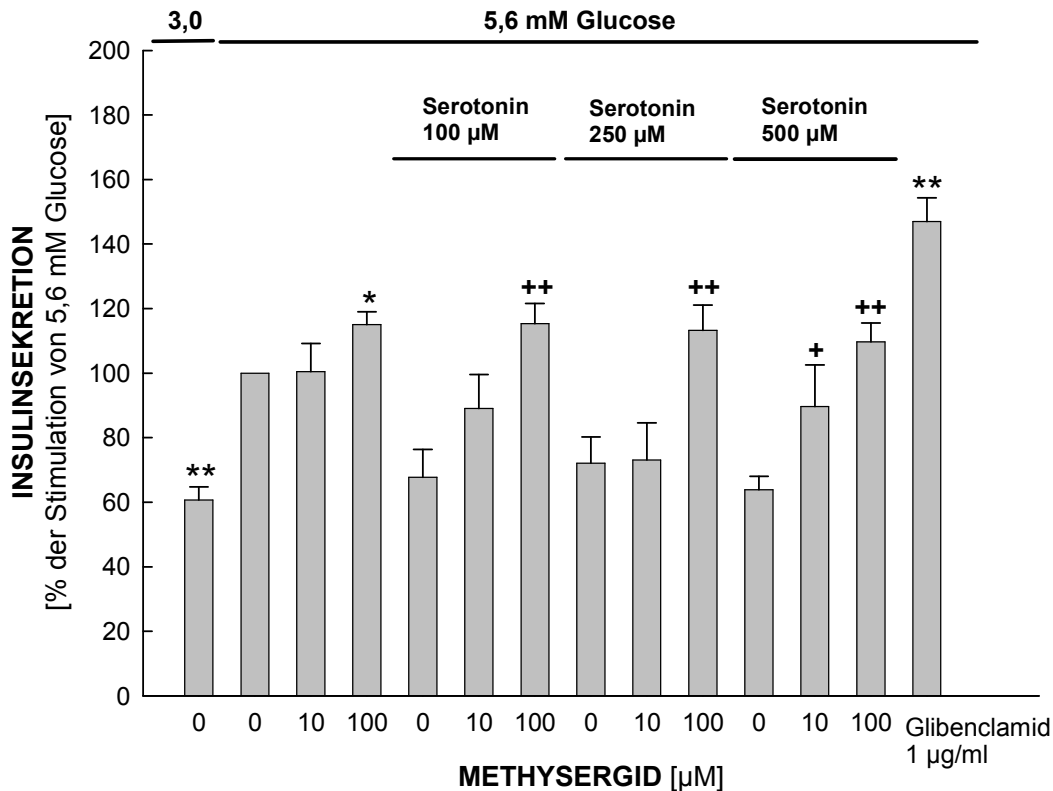
Im Fall des Tropisetrons kann nicht eindeutig beurteilt werden, ob die verstärkte Insulinsekretion durch eine Antagonisierung der Serotonin-Wirkung oder allein durch den Eigeneffekt hervorgerufen wird, da bis auf eine Ausnahme die Steigerung der Sekretion nicht über den Eigeneffekt des Tropisetrons hinausgeht. Ausschließlich die Wirkung von 10 µM Tropisetron auf die durch 100 µM Serotonin induzierte Hemmung der Insulinsekretion deutet auf einen direkten Antagonismus hin, da diese den direkten Effekt des Tropisetrons übersteigt. 5-HT<sub>3</sub>-Rezeptoren und möglicherweise in geringem Maße auch 5-HT<sub>4</sub>-Rezeptoren sind offenbar an der Regulation der Insulinsekretion an INS-1 Zellen beteiligt, da Tropisetron als reiner Antagonist imstande ist, eine verstärkte Insulinsekretion zu bewirken.



**Abb. 5.31 Beeinflussung der durch Serotonin verminderten Insulinsekretion durch Tropisetron**

Die Zellen wurden 90 min bei 37 °C mit unterschiedlichen Konzentrationen der Testsubstanzen inkubiert. Die Bestimmung des sezernierten Insulins erfolgte mittels Radioimmunoassay; n = 5–10 + SEM; \*\*: p < 0,01 (verglichen mit Glucose 5,6 mM); +: p < 0,05; \*\*: p < 0,01 (verglichen mit dem zugehörigen Serotonin-Wert ohne Tropisetron-Zusatz).

Als nächstes wurde die Wirkung des unselektiven 5-HT<sub>1/2/5/7</sub>-Rezeptor-Antagonisten Methysergid auf die durch 100–500 µM Serotonin verminderte Insulinsekretion untersucht. Auf diese Weise wurde überprüft, ob neben 5-HT<sub>3</sub>-Rezeptoren weitere Serotoninrezeptoren an der Serotonin-inuzierten Hemmung der Insulinsekretion beteiligt sind. Methysergid selbst zeigt nur in einer Konzentration von 100 µM einen geringen, aber statistisch signifikanten Anstieg der Insulinsekretion auf 115,1 ± 4 % (siehe Abb. 5.32). 100 µM Methysergid inhibiert die durch 100–500 µM Serotonin verminderte Insulinsekretion vollständig und über den Eigeneffekt des Methysergids hinaus. Durch 10 µM Methysergid wird die Wirkung von 100 und 500 µM Serotonin inhibiert. Der Effekt von 250 µM bleibt durch 10 µM Methysergid unbeeinflusst. Die Ergebnisse sind in Abb. 5.32 graphisch dargestellt.



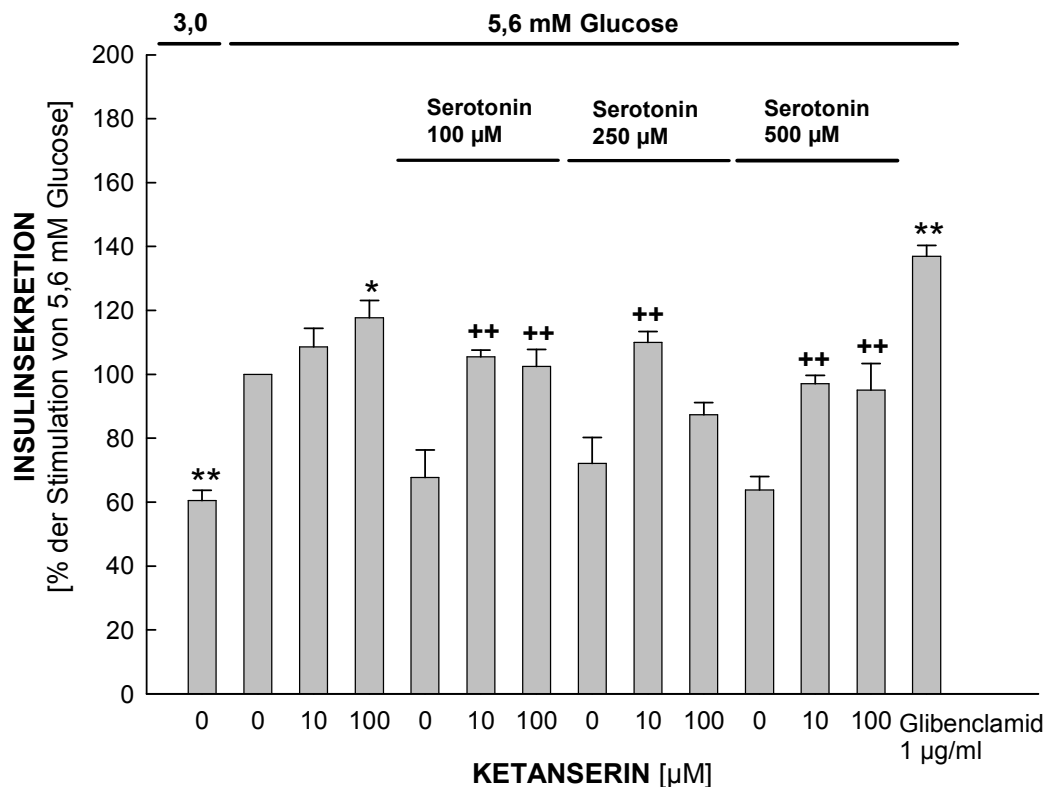
**Abb. 5.32** Beeinflussung der durch Serotonin verminderten Insulinsekretion durch Methysergid

Die Zellen wurden 90 min bei 37 °C mit unterschiedlichen Konzentrationen der Testsubstanzen inkubiert. Die Bestimmung des sezernierten Insulins erfolgte mittels Radioimmunoassay; n = 4–7 + SEM; \*: p < 0,05; \*\*: p < 0,01 (verglichen mit Glucose 5,6 mM); +: p < 0,05; \*\*: p < 0,01 (verglichen mit dem zugehörigen Serotonin-Wert ohne Methysergid-Zusatz).

Die durch 100 µM Methysergid leicht gesteigerte Insulinausschüttung deutet darauf hin, dass einer oder mehrere der antagonisierten Rezeptoren in geringerem Maße wie auch 5-HT<sub>3</sub>- und eventuell 5-HT<sub>4</sub>-Rezeptoren an der Regulation der Insulinsekretion an INS-1 Zellen beteiligt sind. Da die Steigerung der durch Serotonin verminderten Insulinsekretion durch Methysergid in den meisten Fällen über den Eigeneffekt des Antagonisten hinausgeht, ist von einem direkten Antagonismus der Serotoninwirkung auszugehen.

Um den Effekt des Methysergids näher zu charakterisieren, wurde die Wirkung des 5-HT<sub>2A+C</sub>-Rezeptor-Antagonisten Ketanserin auf die Serotonin-vermittelte Hemmung der Insulinsekretion untersucht (siehe Abb. 5.33). Zusätzlich wurde der direkte Effekt des Ketanserins bestimmt. Die Insulinsekretion der INS-1 Zellen wird durch Zusatz von 100 µM Ketanserin statistisch signifikant auf 117,7 ± 5,5 % gesteigert. Durch 10 µM Ketanserin wurde die Insulinsekretion bereits leicht auf 108,6 ± 5,8 % erhöht (ohne statistische Signifikanz). Die durch 100 und 500 µM Serotonin verminderte Insulinsekretion wurde durch 10 und 100 µM Ketanserin in gleichem Maße vollständig inhibiert,

wobei die resultierende Insulinsekretion etwa dem Bezugswert der Insulinausschüttung bei 5,6 mM Glucose (100 %) entspricht. Wie in den vorherigen Versuchen stellt hier wieder die Konzentration von 250  $\mu\text{M}$  Serotonin eine Ausnahme dar. 10  $\mu\text{M}$  Ketanserin steigert die durch 250  $\mu\text{M}$  Serotonin gehemmte Insulinsekretion über den direkten Effekt des Antagonisten hinaus. Im Gegensatz dazu wird die Wirkung von 250  $\mu\text{M}$  Serotonin durch 100  $\mu\text{M}$  Ketanserin nur leicht gehemmt. Diese Hemmung entspricht etwa dem Eigeneffekt von 100  $\mu\text{M}$  Ketanserin. Auffällig ist, dass 10  $\mu\text{M}$  Ketanserin einen gleichen oder sogar stärkeren Effekt zeigt als 100  $\mu\text{M}$  dieser Substanz.



**Abb. 5.33 Beeinflussung der durch Serotonin verminderten Insulinsekretion durch Ketanserin**

Die Zellen wurden 90 min bei 37 °C mit unterschiedlichen Konzentrationen der Testsubstanzen inkubiert. Die Bestimmung des sezernierten Insulins erfolgte mittels Radioimmunoassay;  $n = 4-12 + \text{SEM}$ ; \*:  $p < 0,05$ ; \*\*:  $p < 0,01$  (verglichen mit Glucose 5,6 mM); \*\*:  $p < 0,01$  (verglichen mit dem zugehörigen Serotonin-Wert ohne Ketanserin-Zusatz).

Der direkte Effekt bei 100  $\mu\text{M}$  Ketanserin entspricht ungefähr dem von 100  $\mu\text{M}$  Methysergid. Dies bedeutet, dass an der Regulation der Insulinsekretion neben 5-HT<sub>3</sub>-Rezeptoren auch 5-HT<sub>2</sub>-Rezeptoren beteiligt sind. Auch beim Ketanserin kann von einem Antagonismus der Serotonin-Wirkung ausgegangen werden, da der Effekt des Ketanserins über seinen Eigeneffekt hinausgeht. Die eine Ausnahme bei 250  $\mu\text{M}$  Serotonin wurde in die Auswertung nicht mit einbezogen, da in den Versuchen bei dieser

Serotoninkonzentration häufig schwer zu reproduzierende Effekte auftraten. Die Ergebnisse unter Verwendung von Ketanserin zeigen, dass die hemmende Wirkung des Methysergids auf die Serotonin-induzierte Verminderung der Insulinsekretion zu einem großen Teil durch Antagonisierung von 5-HT<sub>2</sub>-Rezeptoren bedingt ist.

## 6 Diskussion

### 6.1 Ingwer

Ingwer wird seit vielen Jahrhunderten in der Volksmedizin zur Behandlung von Übelkeit und Erbrechen eingesetzt. In klinischen Studien wurde die antiemetische Wirkung des Ingwers nur teilweise belegt; zur endgültigen Bewertung sind weitere Studien erforderlich<sup>[121]</sup>. Zur Aufklärung des Wirkungsmechanismus des Ingwers wurden sowohl Ingwerextrakte als auch isolierte Ingwerinhaltsstoffe auf ihre antiserotonergen Effekte untersucht. Abdel-Aziz *et al.*<sup>[77, 93]</sup> belegten den antagonistischen Effekt am 5-HT<sub>3</sub>-Rezeptorkanal von Ingwerextrakten, Gingerolen, Shogaolen und ätherischem Öl durch Kationeninflux-Versuche und Kontraktionsversuche am Meerschweinchenileum. Die Scharfstoffe werden als die wirksamen Substanzen des Ingwers angesehen. Auch das ätherische Öl und einzelne Komponenten des Ingweröls weisen einen antagonistischen Effekt am 5-HT<sub>3</sub>-Rezeptorkanal auf. Gemessen an den eingesetzten Konzentrationen sind die Komponenten des Ingweröls schwächer wirksam als die Scharfstoffe. Das ätherische Öl kann aber durchaus an der Gesamtwirkung lipophiler Ingwerextrakte beteiligt sein. Riyazi<sup>[153]</sup> testete unterschiedliche Fraktionen eines Ingweröls und einige Reinsubstanzen des ätherischen Öls im [<sup>14</sup>C]Guanidinium-Influx-Assay. Die im Öl enthaltenen Terpene Terpinolen, β-Pinen, α-Phellandren und α-Copaen weisen in Konzentrationen zwischen 100 und 1000 μM eine antagonistische Wirkung am 5-HT<sub>3</sub>-Rezeptorkanal auf, sind aber häufig jeweils nur zu maximal 1 % im Ingweröl enthalten. Unter den durch Riyazi getesteten Fraktionen des ätherischen Ingweröls im [<sup>14</sup>C]Guanidinium-Assay war eine Fraktion mit einem hohen Sesquiterpen-Gehalt von etwa 82 % besonders wirksam. Die Sesquiterpenkohlenwasserstoffe ar-Curcumen, α-Zingiberen, (E,E)-α-Farnesen, β-Bisabolon und β-Sesquiphellandren sind Hauptinhaltsstoffe vieler ätherischer Ingweröle<sup>[164]</sup>. In Ingwerölen australischer Herkunft ist Citral das dominierende Terpen. Ziel der pharmakologischen Untersuchung war, die Hauptbestandteile ätherischer Ingweröle auf ihre 5-HT<sub>3</sub>-Rezeptorkanal-antagonistische Wirkung zu testen und die an der Wirkung des Ingweröls beteiligten Substanzen zu identifizieren.

Zusätzlich zu den Untersuchungen zum antiemetischen Wirkungsmechanismus des ätherischen Ingweröls wurde der Effekt antiserotonerg wirkender Ingwerextrakte auf die durch Serotonin verminderte Insulinsekretion an INS-1 Zellen untersucht. Die Versuche sollten Informationen zu einem möglichen antidiabetischen Effekt des Ingwers liefern, auch hier unter besonderer Berücksichtigung des 5-HT<sub>3</sub>-Rezeptors.

### 6.1.1 Gewinnung des Ingweröls und Isolierung der Sesquiterpenkohlenwasserstoffe

Für die pharmakologische Untersuchung der Sesquiterpenkohlenwasserstoffe wurden diese zunächst aus wasserdampfdestilliertem Ingweröl isoliert. Die Wasserdampfdestillation ist eine geeignete und häufig genutzte Methode zur Gewinnung ätherischer Öle aus pflanzlichen Materialien. In der Literatur untersuchte Ingweröle wurden ebenfalls meist durch Wasserdampfdestillation gewonnen und anschließend analysiert<sup>[73, 75, 76, 164]</sup>. Das zur Destillation eingesetzte getrocknete Ingwerrhizom aus Vietnam enthält 1,5 % ätherisches Öl. Der im EuAB 6 geforderte Gehalt an ätherischem Öl von mindestens 1,5 % ist somit erfüllt<sup>[126]</sup>. Es kann nicht ausgeschlossen werden, dass sich durch die Trocknung des Rhizoms die Zusammensetzung des ätherischen Ingweröls im Vergleich zum frischen Ingwer verändert hat. Gong *et al.*<sup>[175]</sup> beschrieben zwar, dass sich das ätherische Ingweröl von frischem und getrocknetem Ingwer nicht unterscheidet; allerdings gibt es in der Literatur<sup>[71, 76]</sup> Hinweise, dass durch Trocknung des Ingwers vor der Wasserdampfdestillation der Gehalt des Monoterpens Citral um bis zu 74 % abnimmt. Ein Grund für diese unterschiedlichen Angaben kann sein, dass Gong *et al.* ein citralarmes Ingwerrhizom zur Untersuchung einsetzten. Das analysierte Ingweröl enthielt selbst in frischem Zustand nur einen Citral-Gehalt von 0,04 %, so dass ein Verlust an Citral nicht deutlich werden konnte. Auch das Ingweröl aus eigener Herstellung enthält laut GC/MS-Daten kein oder nur Spuren an Citral. Ob dies an der Trocknung oder einer citralarmen Ausgangsdroge liegt, wurde nicht untersucht. Für eine citralarme Droge spricht jedoch der hohe Gehalt an Sesquiterpenkohlenwasserstoffen von 79,5 %, da sich die Konzentrationen an Sesquiterpenen und Citral in ätherischen Ingwerölen aufgrund des gleichen Biogeneseweges häufig umgekehrt proportional zueinander verhalten<sup>[71]</sup>. Da das ätherische Öl als Ausgangssubstanz für die Gewinnung der Sesquiterpene diente, war der hohe Gehalt dieser Stoffe von Vorteil. Das ätherische Ingweröl wurde bis zum Abschluss der Isolierung und der pharmakologischen Untersuchung ca. zehn Monate bei -20 °C gelagert. Die in der Literatur durch Germer<sup>[164]</sup> beschriebene Umsetzung von  $\alpha$ -Zingiberen zu *ar*-Curcumen bei einer Lagerung über acht Monate bei +8 °C wurde nicht beobachtet. Vermutlich hängt dies mit der tieferen Lagerungstemperatur zusammen.

Da das ätherische Ingweröl ein komplexes Vielstoffgemisch darstellt, ist es trotz hoher Trennleistung der GC- und HPLC-Analytik nicht möglich, die einzelnen Komponenten des ätherischen Öls in einem einzigen Arbeitsgang zu isolieren. Daher waren zur Isolierung der Sesquiterpene mehrere chromatographische Schritte notwendig. Zunächst wurde die Trockensäulenchromatographie nach Kubeczka<sup>[152]</sup> durchgeführt, um eine Vortrennung der Inhaltsstoffe entsprechend ihrer Polarität vorzunehmen. Durch diese Art der

Säulenchromatographie wurden mit wenig Aufwand fünf Fraktionen mit Inhaltsstoffen unterschiedlicher Polarität gewonnen. Die erste Fraktion mit 88 % unpolaren Sesquiterpenen eignete sich als Ausgangsmaterial zur weiteren Isolierung dieser Stoffe. Vorteil dieser Methode war, dass durch die Abtrennung vieler und vor allem unbekannter polarer Inhaltsstoffe die nun gewonnene Sesquiterpen-Fraktion mittels GC/MS-Analytik wesentlich besser charakterisiert werden konnte als das ätherische Öl ohne Vortrennung. Zur Gewinnung der Fraktionen 3–5 wurde das Kieselgel in drei Teilen mit einem Löffel aus der Säule entnommen. Bei dieser Methode kann der Verlust an Kieselgel mitsamt adsorbierten Substanzen zu verminderten Ausbeuten führen. Da die Fraktionen 3–5 jedoch aufgrund des Fehlens an Sesquiterpenen nicht weiter verwendet wurden, wurde dieser Aspekt außer acht gelassen. Während bei der Trockensäulenchromatographie die Trennung der unterschiedlichen Stoffgruppen voneinander im Vordergrund stand, sollte durch die FCPC (Fast Centrifugal Partition Chromatography) die Trennung der Sesquiterpene voneinander erreicht werden. Bei der FCPC wird die Vielstoffprobe mittels Flüssig/Flüssig-Verteilungschromatographie aufgetrennt. Ein Vorteil dieser Methode im Vergleich zur HPLC ist, dass sowohl die mobile als auch die stationäre Phase fraktioniert werden können. Dadurch treten keine irreversiblen Adsorptionen auf und es kommt zur 100 %igen Wiederfindung der eingesetzten Probe. Weitere Vorteile sind die Möglichkeit der Injektion von Rohextrakten ohne Probenvorbereitung und die Kostenersparnis aufgrund der nur geringen erforderlichen Lösungsmittelqualität. Diese Art der Chromatographie steht nicht in Konkurrenz zur HPLC, sondern beschleunigt in Kombination mit dieser besonders bei Auftrennung von komplexen Naturstoffgemischen den gesamten chromatographischen Prozess bis hin zur isolierten Reinsubstanz. Auch im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurde die FCPC vor Durchführung der HPLC angewendet und erwies sich, wie die dünnschicht- und gaschromatographische Auswertung der FCPC-Subfraktionen in Kapitel 5.1.2 zeigt, als geeignete Methode zur Auftrennung der Sesquiterpene. Drei der fünf Sesquiterpenderivate (*ar*-Curcumen und (*E,E*)- $\alpha$ -Farnesen/ $\beta$ -Bisabolon) sind in einzelnen FCPC-Fraktionen bis zu einem Gehalt von ca. 93 % angereichert. Eine weitere Fraktion (SF 27 + 28) besteht neben wenigen Begleitsubstanzen zu etwa gleichen Teilen aus den Sesquiterpenkohlenwasserstoffen  $\alpha$ -Zingiberen und  $\beta$ -Sesquiphellandren, die daraufhin mittels HPLC isoliert wurden. Nach Durchführung der HPLC und Analyse der getrennt eluierten Substanzen durch GC/MS-Analytik wurde deutlich, dass neben  $\beta$ -Sesquiphellandren, der Hauptsubstanz des zweiten Hauptpeaks, mit dem ersten Hauptpeak anstelle des  $\alpha$ -Zingiberens *ar*-Curcumen eluiert worden war. Während der Lagerung über einige Tage bei  $-20^{\circ}\text{C}$  hatte die bereits beschriebene Oxidation von  $\alpha$ -Zingiberen zu *ar*-Curcumen stattgefunden. Im ätherischen Öl wurde diese Reaktion bei gleichen Lagerungsbedingungen selbst nach 10 Monaten nicht beobachtet. Ein Grund für die sehr schnell stattfindende Umsetzung in der FCPC-Fraktion kann zum einen eine zu hohe Wärmebelastung beim Verdampfen des



Lösungsmittels nach der FCPC sein. Des Weiteren können eventuell vorhandene Lösungsmittelreste in Verbindung mit Sauerstoff zu einer Instabilität der FCPC-Fraktion während der Lagerung führen. Die Reaktion hätte durch Einleiten von Stickstoff in das Gefäß vor der Lagerung eventuell unterbunden werden können. Zusammenfassend konnte aufgrund dieser Umsetzungsreaktion  $\alpha$ -Zingiberen chromatographisch nicht isoliert werden.

Daher wurde zur Isolierung dieses Sesquiterpens die durch Millar<sup>[157]</sup> beschriebene Methode gewählt, bei der das Dien  $\alpha$ -Zingiberen aus einer durch Vakuumdestillation angereicherten Sesquiterpenfraktion über eine Derivatisierungsreaktion mit einem Dienophil (Diels-Alder-Reaktion) isoliert wird. Diese Methode eignet sich besonders zur Isolierung des  $\alpha$ -Zingiberens aus ätherischem Ingweröl, da  $\alpha$ -Zingiberen in vielen Ingwerölen als Hauptkomponente enthalten ist und somit genügend Material für die Isolierung zur Verfügung steht. Als Ausgangsmaterial für diese Methode sollte möglichst frisches Ingweröl verwendet werden, da der  $\alpha$ -Zingiberen-Gehalt bei gelagertem Ingweröl abnehmen kann<sup>[78]</sup>. Das im Rahmen dieser Arbeit eingesetzte ätherische Ingweröl weist einen hohen  $\alpha$ -Zingiberen-Gehalt von 31 % auf und ist damit gut zur Durchführung dieser Isolierung geeignet. Neben der hohen Konzentration an  $\alpha$ -Zingiberen ist für die Isolierung von Vorteil, dass gaschromatographisch keine oder nur wenige weitere cis-konfigurierte Substanzen im Öl detektierbar sind. In Spuren vorkommende Diene wie zum Beispiel  $\alpha$ -Phellandren werden durch die vor der Diels-Alder-Reaktion durchgeführten Vakuumdestillation entfernt. Diese Methode zur Isolierung eines Diens aus einem Vielstoffgemisch wie dem ätherischen Ingweröl war in der Durchführung der reinen chromatographischen Isolierung überlegen. Von Vorteil waren die Zeitersparnis, die Unkompliziertheit der Methode und die hohe Ausbeute des reinen Endproduktes. Besonders im Fall des instabilen  $\alpha$ -Zingiberens war vorteilhaft, dass alle Schritte, bei denen  $\alpha$ -Zingiberen ungekoppelt vorlag, unter Ausschluss von Sauerstoff durchgeführt werden konnten. So wurde die Oxidation des isolierten  $\alpha$ -Zingiberens zu ar-Curcumen verhindert. Ein Nachteil könnte eventuell das Entstehen von Stereoisomeren des  $\alpha$ -Zingiberens sein. Millar geht nicht darauf ein, ob nach Retro-Diels-Alder-Reaktion unterschiedliche Stereoisomere des  $\alpha$ -Zingiberens entstehen. Der Vergleich des <sup>13</sup>C-NMR-Spektrums des  $\alpha$ -Zingiberens mit Literaturdaten<sup>[165]</sup> zu  $\alpha$ -Zingiberen (7S-konfiguriert) und dem in wilder Tomate vorkommenden Epizingiberen (7R-konfiguriert) zeigt jedoch, dass die Tieffeldverschiebungen eher denen des  $\alpha$ -Zingiberens gleichen.

## 6.1.2 Pharmakologische Untersuchung zum Antagonismus der Hauptinhaltsstoffe des Ingweröls am 5-HT<sub>3</sub>-Rezeptorkanal

### 6.1.2.1 [<sup>14</sup>C]Guanidinium-Influx-Assay

Die antagonistische Wirkung des ätherischen Ingweröls am 5-HT<sub>3</sub>-Rezeptorkanal wurde bereits durch Abdel-Aziz<sup>[90]</sup> und Riyazi<sup>[153]</sup> mit Hilfe der Testung im [<sup>14</sup>C]Guanidinium-Influx-Assay belegt. Zur Identifizierung der für die Wirkung verantwortlichen Substanzen des Ingweröls wurden die Sesquiterpenkohlenwasserstoffe ar-Curcumen, α-Zingiberen, (E,E)-α-Farnesen, β-Bisabolen, β-Sesquiphellandren und die oxidierten Monoterpene Citral und 1,8-Cineol im gleichen Testsystem untersucht.

Bezüglich der antagonistischen Wirkung am 5-HT<sub>3</sub>-Rezeptorkanal ergibt sich innerhalb der Gruppe der Sesquiterpene folgende Reihenfolge der Wirkstärke: ar-Curcumen > β-Sesquiphellandren = β-Bisabolen/(E,E)-α-Farnesen. α-Zingiberen wirkt in Konzentrationen zwischen 10 und 100 μM 5-HT<sub>3</sub>-Rezeptorkanal-agonistisch und erst in Konzentrationen über 100 μM antagonistisch. Beim Vergleich der Wirkung der einzelnen Sesquiterpene in Konzentrationen, die ihrem Anteil im Ingweröl entsprechen, mit der Wirkung des ätherischen Ingweröls, wird deutlich, dass ar-Curcumen an der Wirkung des ätherischen Öls am stärksten beteiligt ist (siehe Abb. 5.17). Der Vergleich der räumlichen Struktur der monozyklischen Sesequiterpene in dem Molecular-Modelling-Programm MOE zeigt, dass ar-Curcumen innerhalb dieser Gruppe als einziges Derivat ein planares Ringsystem aufweist. Dies könnte eine Erklärung dafür sein, dass ar-Curcumen trotz ähnlicher Summenformel eine stärkere Wirkung als die weiteren Sesquiterpene aufweist.

Auffällig ist, dass durch Vereinigung der Sesquiterpene äquivalent zu ihrer Konzentration im Ingweröl eine Abschwächung des Effekts des ar-Curcumens eintritt. Trotz eines hohen Gehalts der Sesquiterpenfraktion von fast 80 % im ätherischen Öl macht diese bei einer Ingweröl-Konzentration von 0,4 μl/ml nur 46 % der Wirkung des ätherischen Öls aus. 0,1 μl/ml ar-Curcumen allein, entsprechend einem Gehalt von ca. 25 % im ätherischen Öl, hemmt den Kationeninflux bereits um etwa 65 %. Der verminderte Effekt könnte dadurch erklärt werden, dass alle Sesquiterpenderivate ihren antagonistischen Effekt am 5-HT<sub>3</sub>-Rezeptorkanal über die gleiche, bisher nicht identifizierte Bindungsstelle ausüben. Das stärker antagonistisch wirksame ar-Curcumen wird durch Sesquiterpene mit geringerer antagonistischer Wirkung verdrängt und erreicht dadurch in der gleichen Konzentration bei Anwesenheit weiterer Sesquiterpene nicht die erwartete antagonistische Wirkung. Da alle Sesquiterpene eine gewisse antagonistische Wirkung am 5-HT<sub>3</sub>-Rezeptorkanal aufweisen, wird trotz der Verdrängung des ar-Curcumens eine Verminderung des

Kationeninfluxes erzielt. Riyazi<sup>[153]</sup> kommt nach Untersuchung einiger Monoterpene des Ingweröls zu dem Schluss, dass keine der Reinsubstanzen die Wirksamkeit eines chemischen Antagonisten erreicht, dass aber viele Substanzen des Ingweröls zur antagonistischen Gesamtwirkung am 5-HT<sub>3</sub>-Rezeptorkanal beitragen. Die Ergebnisse zur Wirkung der Sesquiterpene des Ingweröls bestätigen diese Annahme insofern, dass alle Sesquiterpene eine 5-HT<sub>3</sub>-Rezeptorkanal-antagonistische Wirkung aufweisen und damit zum Gesamteffekt des ätherischen Öls beitragen, diesen jedoch nicht allein bewirken. *ar*-Curcumen ist als Reinsubstanz eine der wirksamsten Substanzen innerhalb des ätherischen Ingweröls. Die Ergebnisse aus dem [<sup>14</sup>C]Guanidinium-Influx-Assay verdeutlichen aber auch, dass Wechselwirkungen innerhalb des ätherischen Öls nicht nur additiv sind. Der pharmakologische Effekt einzelner Substanzen wird durch die Vereinigung mehrerer Komponenten innerhalb des Öls auch abgeschwächt. Trotz dieser Interaktionen innerhalb der mengenmäßig überwiegenden Sesquiterpenfraktion bewirkt 0,4 µl/ml Ingweröl eine vollständige Hemmung des Kationeninfluxes. Dies bedeutet, dass der antiserotonerge Effekt des Ingweröls entweder durch andere in geringeren Mengen enthaltene Komponenten oder durch das ätherische Öl als Vielstoffgemisch verursacht wird. Auch die mittels GC/MS-Analytik im Ingweröl identifizierte Monoterpene Camphen und  $\alpha$ -Pinen bewirken bei Riyazi<sup>[153]</sup> nur in einer hohen Konzentration von 1 mM eine leichte Hemmung des Kationeninfluxes. Das ebenfalls in dem getesteten ätherischen Öl vorliegende oxidierte Monoterpen 1,8-Cineol inhibiert den [<sup>14</sup>C]Guanidinium-Influx nicht und trägt damit als Reinsubstanz nicht zum antagonistischen Gesamteffekt der Ingweröle am 5-HT<sub>3</sub>-Rezeptorkanal bei. Die Wirkung des ätherischen Öls am 5-HT<sub>3</sub>-Rezeptor kommt also vermutlich durch die Gesamtheit aller Komponenten des ätherischen Öls zustande und nicht durch die Wirkung von wenigen Inhaltsstoffen. Einzelne Substanzen, wie *ar*-Curcumen tragen jedoch entscheidend zur Wirkung bei. Wie bereits beschrieben, ist  $\alpha$ -Zingiberen in ätherischen Ingwerölen ein „Frischeindikator“, der bei Lagerung des Öls zu *ar*-Curcumen umgesetzt wird. Bezogen auf den Antagonismus am 5-HT<sub>3</sub>-Rezeptorkanal ist ein *ar*-Curcumen-reiches ätherisches Öl anzustreben. Aus pharmakologischer Sicht ist eine kontrollierte „Alterung“ des Ingweröls daher sogar vorteilhaft.

Von allen bisher im [<sup>14</sup>C]Guanidinium-Influx-Assay getesteten Komponenten ätherischer Ingweröle inhibiert der Monoterpenaldehyd Citral den Kationeninflux am stärksten. Citral weist zwar, gemessen an den eingesetzten Konzentrationen, nicht die Wirkstärke der Gingerole auf, kann aber für die Wirkung des ätherischen Ingweröls durchaus von Bedeutung sein. Da Citral nicht in allen Ingwerölen enthalten ist, wurde die Auswirkung eines bestimmten Citral-Gehalts auf die 5-HT<sub>3</sub>-Rezeptorkanal-antagonistische Wirkung des Ingweröls untersucht. Dazu wurden dem citralarmen/-freien Ingweröl aus eigener

Herstellung 5 und 20 % Citral zugesetzt und im [ $^{14}\text{C}$ ]Guanidinium-Influx-Assay getestet. Diese Konzentrationen entsprechen natürlich vorkommenden Citral-Gehalten in ätherischen Ingwerölen. Für Ingweröle von australischem Ingwer wurden sogar Citral-Gehalte bis zu 71 % beschrieben<sup>[76]</sup>. Ein Gehalt von 20 % entspricht ungefähr den durchschnittlichen Angaben für citralreiche Ingweröle<sup>[71]</sup>. Die Ergebnisse des [ $^{14}\text{C}$ ]Guanidinium-Influx-Assays zeigen, dass ein Citral-Gehalt von 20 % besonders in niedrigen Testkonzentrationen von 0,004  $\mu\text{l/ml}$  Ingweröl die 5-HT<sub>3</sub>-Rezeptorkanal-antagonistische Wirkung des Öls verstärkt. Citral ist ein Gemisch der Stereoisomere Neral und Geranial. Das für die Versuche verwendete Citral hat einen Neral/Geranial-Quotient von 0,88. Wohlmuth *et al.*<sup>[76]</sup> ermittelten in den von ihnen untersuchten australischen Ingwerölen einen relativ konstanten Neral/Geranial-Quotient zwischen 0,55 und 0,64. In der Literatur variieren die Angaben zum Neral/Geranial-Quotient in weiteren Ingwerölen zwischen 0,3 und 0,9<sup>[76]</sup>. Da der Quotient des verwendeten Citrals in diesem Rahmen liegt, wurde es für die pharmakologischen Untersuchungen im [ $^{14}\text{C}$ ]Guanidinium-Influx-Assay verwendet. Zur Überprüfung, ob beide Stereoisomere eine antagonistische Wirkung am 5-HT<sub>3</sub>-Rezeptorkanal aufweisen oder ob nur eines der Stereoisomere für die Wirkung des Citrals verantwortlich ist, bedarf es weiterer Untersuchungen.

Von den Hauptinhaltsstoffen ätherischer Ingweröle weisen Citral und ar-Curcumen die stärkste 5-HT<sub>3</sub>-Rezeptorkanal-antagonistische Wirkung auf. Riyazi<sup>[153]</sup> weist darauf hin, dass als Ausgangsdroge für die arzneiliche Verwendung Ingwerarten mit einem hohen Gehalt an ätherischem Öl gewählt werden sollten, weil dieses zur Gesamtwirkung von Ingwerextrakten beiträgt. Die Ergebnisse im Rahmen dieser Arbeit unterstützen diese Aussage. Zusätzlich sollte das ätherische Ingweröl reich an Citral und ar-Curcumen sein, um die antagonistische Wirkung des Öls am 5-HT<sub>3</sub>-Rezeptorkanal zu fördern. Der Citral-Gehalt kann zum einen durch Auswahl citralreicher Ingwerarten und zum anderen durch schonende Trocknungsmaßnahmen erhöht werden. Der ar-Curcumen-Gehalt im Extrakt ist vermutlich nicht so einfach beeinflussbar wie der des Citrals. Die Oxidation von  $\alpha$ -Zingiberen zu ar-Curcumen wurde bisher nur für das gelagerte ätherische Öl beschrieben. Ob diese Reaktion auch in gelagerten Rhizomen oder Extrakten stattfindet, wurde bisher nicht beschrieben. Um einen entsprechenden Gehalt der beiden Substanzen in einem Extrakt sicherzustellen, könnten diese auch nachträglich zugesetzt werden. Die Verstärkung der 5-HT<sub>3</sub>-Rezeptorkanal-antagonistischen Wirkung des Ingweröls durch Zusatz von Citral wurde im Rahmen dieser Arbeit bereits gezeigt. Es sollte jedoch noch einmal betont werden, dass das ätherische Ingweröl die Scharfstoffe als Hauptwirksubstanzen des Ingwers nur in ihrer Wirkung unterstützt. Die Auswahl der Ingwerart zur antiemetischen Therapie sollte also vor allem abhängig vom Scharfstoff-Gehalt erfolgen. Die richtige Zusammensetzung des ätherischen Öls könnte den

antagonistischen Effekt des Gesamtextraktes am 5-HT<sub>3</sub>-Rezeptorkanal zusätzlich verstärken. Aus den Ergebnissen des [<sup>14</sup>C]Guanidinium-Influx-Assays kann man schlussfolgern, dass zur antiemetischen Therapie ein citralreiches Ingwerrhizoms mit hohem Scharfstoffgehalt angewendet werden sollte.

### 6.1.2.2 Untersuchung der Rezeptor-Bindungsstelle

Die Bindungsstelle von Inhaltsstoffen des Ingwers wurde bisher nicht identifiziert. Bindungsstudien durch Abdel-Aziz<sup>[77]</sup> mit dem selektiven 5-HT<sub>3</sub>-Rezeptor-Antagonisten [<sup>3</sup>H]GR65630 belegen, dass Gingerole und Shogaole den Radioliganden nicht von seiner Bindungsstelle an N1E-115 Zellen und humanen 5-HT<sub>3A</sub>-Rezeptor-Membranpräparationen verdrängen. Wie die Ergebnisse der Bindungsstudien in Abb. 5.22 und Abb. 5.23 zeigen, inhibieren auch die im [<sup>14</sup>C]Guanidinium-Influx-Assay als wirksam getesteten Inhaltsstoffe des ätherischen Ingweröls die spezifische Bindung von [<sup>3</sup>H]GR65630 nicht. Die Substanzen scheinen somit allosterisch modulatorisch an einem von der Serotonin- und Tropisetron-Bindestelle abweichenden Ort am Rezeptor anzugreifen. Die Existenz von allosterischen Bindungsstellen am 5-HT<sub>3</sub>-Rezeptor wurde bereits früher diskutiert. Barann *et al.*<sup>[176]</sup> zeigten 2002, dass Cannabinoid-Rezeptor-Agonisten humane 5-HT<sub>3A</sub>-Rezeptoren antagonisieren ohne jedoch die spezifische Bindung des Radioliganden [<sup>3</sup>H]GR65630 zu beeinflussen. Des Weiteren wurden an mehreren Rezeptoren innerhalb der „Cys-loop“-Superfamilie der Liganden-gesteuerten Ionenkanäle, zu denen auch der 5-HT<sub>3</sub>-Rezeptor zählt, allosterisch modulatorische Bindungsstellen identifiziert: Zum Beispiel greifen Benzodiazepine, Barbiturate und Ethanol allosterisch an GABA<sub>A</sub>-Rezeptoren an<sup>[177]</sup>. Auch nicotinerge Acetylcholinrezeptoren werden durch endogene Substanzen wie Steroide, Fettsäuren, Serotonin oder Substanz P<sup>[178]</sup> oder andere Liganden wie Kristallviolett<sup>[179]</sup> über Angriff an allosterischen Bindungsstellen moduliert. Eine allosterische Modulation von 5-HT<sub>3</sub>-Rezeptorkanälen durch die Komponenten des ätherischen Ingweröls wäre somit möglich.

Neben dem Angriff an einer allosterischen Bindungsstelle könnten auch unspezifische Effekte der getesteten Substanzen eine Blockade des Kationeninfluxes im [<sup>14</sup>C]Guanidinium-Influx-Assays bewirken. Ein unspezifischer Effekt kann nach Barann *et al.*<sup>[167]</sup> in einer allgemeinen unspezifischen Blockade von Ionenkanälen bestehen. Dieser Effekt kann bestimmt werden, indem man anstelle des Serotonins im [<sup>14</sup>C]Guanidinium-Influx-Assay an N1E-Zellen das Alkaloid Veratridin einsetzt, das spannungsabhängige Ionenkanäle öffnet und so ebenfalls zu einem Kationeninflux führt. Der Serotonin-induzierte Kationeninflux wird dann mit dem Veratridin-induzierten Influx verglichen. Riyazi<sup>[153]</sup> berichtete im Jahr 2006, dass das ätherische Ingweröl den Veratridin-

induzierten Kationeninflux nicht beeinflusst. Wie die Versuchsergebnisse in Tab. 5.8 zeigen, inhibieren auch die Komponenten Citral und *α*-Curcumen nur den Serotonin-induzierten [<sup>14</sup>C]Guanidinium-Influx, während der Veratridin-induzierte Kationeninflux statistisch nicht signifikant verändert wird. Diese Ergebnisse zeigen, dass die 5-HT<sub>3</sub>-Rezeptorkanal-antagonistisch wirkenden Inhaltsstoffe des Ingweröls ihren Effekt nicht über allgemeine unspezifische Mechanismen an Ionenkanälen vermitteln. Wie bei den Scharfstoffen des Ingwers kann von einer allosterischen Modulation des 5-HT<sub>3</sub>-Rezeptors ausgegangen werden. Ob die Scharfstoffe und die Substanzen des ätherischen Ingweröls an der gleichen Bindungsstelle des Rezeptors angreifen, obliegt weiteren Untersuchungen.

### 6.1.3 Bestimmung der 5-HT<sub>3</sub>-Rezeptorkanal-antagonistischen Wirkung eines Ingwer-Spezialextraktes

Ein öliger Ingwer-Spezialextrakt der Firma Finzelberg mit mehr als 25 % Scharfstoffen wurde im [<sup>14</sup>C]Guanidinium-Influx-Assay und am Rattenileum getestet und mit einem zuvor im Arbeitskreis Verspohl untersuchten ethanolischen Ingwer-Spissumextrakt verglichen. Die Auswirkung des erhöhten Scharfstoff-Gehalts auf die antiserotonerge Wirkung des Extraktes sollte bestimmt werden. Der Scharfstoff-Gehalt des Spissumextraktes wurde vor Anwendung des Extraktes nicht bestimmt. Somit sind die beiden Extrakte nur eingeschränkt vergleichbar. Für methanolische Ingwerextrakte ermittelten Rai *et al.*<sup>[180]</sup> 2006 mittels HPTLC einen durchschnittlichen [6]-Gingerol-Gehalt von 6,4 %. In einer weiteren Studie<sup>[181]</sup> enthält ein methanolischer Ingwerextrakt 3 % und ein mit Ethylacetat gewonnener Extrakt 1,6 % [6]-Gingerol. Da [6]-Gingerol das Hauptderivat der Scharfstoffgruppe darstellt, repräsentiert der Gehalt dieses Derivats ungefähr den Gesamtgehalt an Scharfstoffen. Auch wenn zur Gewinnung des Ingwer-Spissumextraktes Ethanol anstelle von Methanol oder Ethylacetat verwendet wurde, kann davon ausgegangen werden, dass der Scharfstoff-Gehalt des Ingwer-Spissumextraktes bei weitem nicht so hoch ist wie der des Ingwer-Spezialextraktes. Das Ergebnis aus dem [<sup>14</sup>C]Guanidinium-Influx-Assay im Kapitel 5.2.1.2 zeigt im Vergleich mit dem von Riyazi<sup>[153]</sup> getesteten Ingwer-Spissumextrakt, dass der Spezialextrakt trotz des hohen Gehalts an Scharfstoffen nicht stärker 5-HT<sub>3</sub>-Rezeptorkanal-antagonistisch wirksam ist als der Vergleich. In Testkonzentrationen im Mikrogrammbereich ist die Wirkung des Ingwer-Spezialextraktes sogar schwächer, in höheren Konzentrationen von 100 µg/ml hemmen beide Extrakte den Kationeninflux annähernd gleich stark. Im Gegensatz dazu vermindert der Spezialextrakt die Serotonin-induzierte Spontankontraktion am Ileum der Ratte bereits in niedrigeren Dosen als der Ingwer-Spissumextrakt und weist damit in diesem Testmodell eine stärkere antiserotonerge Wirksamkeit auf (siehe Kapitel 5.2.3.2). Die

pharmakologische Testung am isolierten Ileum der Ratte stellt ein wesentlich komplexeres Modell dar als die Testung des Kationeninfluxes an N1E-115-Zellen. Wie in Kapitel 1.1.4 beschrieben, wird die Wirkung des Serotonins im Gastrointestinaltrakt über mehrere Serotoninrezeptoren vermittelt, deren Aktivierung zum Teil zur Ausschüttung weiterer Transmitter wie ACh, CGRP und Substanz P führt, die ihrerseits die Kontraktion des Ileums beeinflussen. Obwohl der Spezialextrakt im [<sup>14</sup>C]Guanidinium-Assay den Kationeninflux nicht stärker hemmt als der Spissumextrakt, ist der hemmende Effekt des Spezialextraktes auf die Serotonin-induzierte Kontraktion des Rattenileums stärker. Dies bedeutet, dass der Spezialextrakt neben der 5-HT<sub>3</sub>-Rezeptorkanal-antagonistischen Wirkung stärker als der Spissumextrakt mit anderen Rezeptoren interagiert, über die Serotonin eine Kontraktion auslöst. Abdel-Aziz<sup>[90]</sup> zeigte, dass Gingerole und Shogaole auch die ACh- und Substanz P-induzierten Kontraktionen am isolierten Meerschweinchenileum hemmen, was auch hier in Betracht gezogen werden könnte. Insgesamt zeigt der Spezialextrakt also eine stärkere antiserotonerge Wirkung am isolierten Ileum der Ratte als der Spissumextrakt, die über andere Mechanismen als die antagonistische Wirkung am 5-HT<sub>3</sub>-Rezeptorkanal induziert wird. Warum der Spezialextrakt trotz eines höheren Scharfstoff-Gehalts keine stärkere Wirkung auf den Serotonin-induzierten Kationeninflux an N1E-115 Zellen ausübt als der Spissumextrakt, konnte nicht geklärt werden.

Generell eignet sich das isolierte Rattenileum nur bedingt zur Untersuchung von Wirkungen an 5-HT<sub>3</sub>-Rezeptoren, da Agonisten wie SR57227A und 2-Methyl-5-hydroxytryptamin nicht oder nur in geringem Ausmaß kontrahierend wirken. Riyazi<sup>[153]</sup> beschreibt jedoch, dass 100 µM Ondansetron das isolierte Rattenileum leicht relaxieren und dass die ohne Auswaschen des Antagonisten vorgenommene Maximalkontraktion des Ileums mit Serotonin deutlich schwächer ausfällt als die Kontrollkontraktion. Wie die Ergebnisse in Abb. 5.27 zeigen, reduziert auch der Spezialextrakt sowohl den Basistonus vor Serotonin-Zugabe als auch die durch Serotonin induzierte Kontraktion und zeigt somit eine dem Ondansetron ähnliche, also 5-HT<sub>3</sub>-Rezeptor-antagonistische Wirkung am Ileum der Ratte. Das Ileum des Meerschweinchens ist zur genauen Untersuchung der Wirkung von Testsubstanzen an 5-HT<sub>3</sub>-Rezeptoren besser geeignet als das der Ratte<sup>[90]</sup>.

#### 6.1.4 Wirkung von Ingwerextrakten auf die Serotonin-induzierte Hemmung der Insulinsekretion

Die antidiabetische Wirkung von Ingwerextrakten ist durch *in vivo*-Studien an Ratten mit Streptozotocin-induziertem Diabetes mellitus ausführlich belegt<sup>[83, 172, 182-185]</sup>. Neben hypoglykämischen Effekten wirken Ingwerextrakte im Tierversuch insulinotrop<sup>[183]</sup>, induzieren eine Verringerung von Gesamtcholesterol- und Triglycerid-Spiegeln sowie eine Steigerung des HDL-Cholesterols<sup>[184]</sup> und sind blutdrucksenkend<sup>[172]</sup>. Diese Wirkungen könnten zur Verbesserung einer diabetischen Stoffwechsellage beitragen. Möglicherweise ist die antiserotonerge Wirkung von Ingwerextrakten an den antidiabetischen Effekten beteiligt. Auf die 5-HT<sub>3</sub>-Rezeptorkanal-antagonistische Wirkung der Ingwerinhaltsstoffe in Bezug auf die antiemetische Therapie wurde im Rahmen dieser Arbeit bereits ausführlich eingegangen. Auch weitere Effekte von Ingwerextrakten wie z.B. die anxiolytische Wirkung werden der 5-HT<sub>3</sub>-Rezeptorkanal-antagonistischen Wirkung zugeschrieben<sup>[186]</sup>.

Serotonin scheint bei der Insulinsekretion aus Insulin-sezernierenden Pankreaszellen eine besondere Rolle zu spielen. Das Monoamin wird in pankreatische  $\beta$ -Zellen aufgenommen und in den Granula zusammen mit Insulin gespeichert<sup>[187]</sup>. Eine Insulinsekretion resultiert damit auch in der Ausschüttung von Serotonin<sup>[188]</sup>. An INS-1 Zellen wurde mit <sup>3</sup>H-Serotonin die Verwendung von Serotonin als Marker für die Insulinsekretion validiert<sup>[189]</sup>. Welche genaue Funktion Serotonin in der  $\beta$ -Zelle hat, ist bisher unklar. Zawalich *et al.*<sup>[173]</sup> zeigten in ihrer Untersuchung an isolierten  $\beta$ -Zellen, dass Serotonin in Konzentrationen von 500  $\mu$ M die Glucose-induzierte Insulinsekretion inhibiert. Wie bereits beschrieben, induzierten Serotonin und Serotonin-Rezeptor-Agonisten in unterschiedlichen *in vivo*-Versuchen an Ratten und Mäusen Hyperglykämien<sup>[169-172]</sup>. Die Ergebnisse in Kapitel 5.2.4.1 zeigen, dass die von Zawalich *et al.* beobachtete Hemmung der Insulinsekretion durch Serotonin auch an INS-1 Zellen eintritt. Serotonin in Konzentrationen von 32–500  $\mu$ M hemmt die durch 5,6 mM Glucose stimulierte Insulinfreisetzung (siehe Abb. 5.28). Riyazi<sup>[153]</sup> zeigte, dass niedrigere Serotoninkonzentrationen zwischen 10 fM und 10  $\mu$ M keinen Effekt auf die Glucose-stimulierte Insulinsekretion ausüben. Plasmaserotoninkonzentrationen von 32–500  $\mu$ M würden Intoxikationen bewirken. Man muss aber zwischen systemischen (Blutkreislauf) und lokalen Konzentrationen (hier: in der Nähe der Insulin-sezernierenden Zellen) unterscheiden. Lokale Konzentrationen in diesem Bereich könnten aufgrund der hohen Serotoninaufnahme-Kapazität der  $\beta$ -Zellen bei entsprechender Insulinausschüttung auftreten und zu einer Verminderung der weiteren Insulinsekretion führen.



In einer *in vivo*-Studie von Akhani *et al.*<sup>[172]</sup> inhibierte ein Ingwer-Presssaft die Serotonin-induzierte Hyperglykämie und Hypoinsulinämie an gesunden Ratten und führt bei diabetischen Tieren zu einer signifikanten Zunahme des Insulinspiegels und zu einer Abnahme des Nüchtern-Glucose-Spiegels. Diese Ergebnisse weisen auf einen antidiabetischen Effekt des Ingwers hin, an dem möglicherweise antiserotonerge Wirkungen der Ingwerinhaltsstoffe beteiligt sind. Goyal *et al.*<sup>[174]</sup> beobachteten nach Serotonin-Gabe (1–2 mg/kg i.p.) eine dosisabhängige Hyperglykämie bei normoglykämischen Wistar-Ratten, die durch Gabe des 5-HT<sub>2A</sub>-Rezeptor-Antagonisten Sarpogrelat und des 5-HT<sub>3</sub>-Rezeptor-Antagonisten Ondansetron inhibiert wurde. An der Wirkung des Serotonins scheinen also 5-HT<sub>2A</sub> und 5-HT<sub>3</sub>-Rezeptoren beteiligt zu sein.

An INS-1 Zellen wurde der Effekt von zwei Ingwerextrakten auf die durch Serotonin verursachte Hemmung der Insulinsekretion getestet, um den Einfluss der 5-HT<sub>3</sub>-Rezeptorkanal-antagonistischen Wirkung des Ingwers auf die Insulinsekretion weiter zu untersuchen. Dazu wurde durch Bindungsstudien mit dem selektiven 5HT<sub>3</sub>-Rezeptor-Antagonisten [<sup>3</sup>H]GR65630 zunächst nachgewiesen, dass der 5-HT<sub>3</sub>-Rezeptor von dieser Zelllinie exprimiert wird. In der Literatur ist die Existenz von 5-HT<sub>3</sub>-Rezeptoren an  $\beta$ -Zellen bisher nicht beschrieben. Die Bindungsstudien an INS-1 und N1E-115 Zellen wurden unter identischen Bedingungen durchgeführt. Die INS-1 Zellen weisen wie erwartet, gemessen an den cpm-Werten (counts per minute), eine wesentlich geringere Dichte an 5-HT<sub>3</sub>-Rezeptoren auf als die neuronale N1E-115 Zelllinie. Es findet jedoch durchaus eine spezifische Bindung des Radioliganden an den Zellen statt, die durch 100  $\mu$ M Tropicsetron um ca. 35 % verringert wird. Die antagonistische Wirkung der beiden in den Insulinsekretionsversuchen eingesetzten Ingwerextrakte am 5-HT<sub>3</sub>-Rezeptorkanal wurde bereits im [<sup>14</sup>C]Guanidinium-Influx-Assay in dieser Arbeit und bei Riyazi<sup>[153]</sup> belegt. Wie die Ergebnisse in Abb. 5.29 und Abb. 5.30 zeigen, inhibieren beide Ingwerextrakte in einer Konzentration von 1  $\mu$ g/ml an INS-1 Zellen die durch 100–500  $\mu$ M Serotonin induzierte Hemmung der Insulinsekretion. Zur Überprüfung, welche Serotoninrezeptoren an der Serotoninwirkung und somit auch am Effekt der Extrakte beteiligt sind, wurde der Effekt der Serotonin-Rezeptor-Antagonisten Tropicsetron (5-HT<sub>3/4</sub>), Methysergid (5-HT<sub>1/2/5/7</sub>) und Ketanserin (5-HT<sub>2A+2C</sub>) untersucht. Alle drei Antagonisten (siehe Abb. 5.31, Abb. 5.32, Abb. 5.33) heben in einer Konzentration von 100  $\mu$ M die durch 100–500  $\mu$ M Serotonin induzierte Hemmung der Insulinsekretion auf. Auffällig ist, dass alle Antagonisten einschließlich der Ingwerextrakte in der höheren der jeweils getesteten Konzentrationen einen signifikanten die Insulinsekretion steigernden Eigeneffekt aufweisen. Pharmakologisch gesehen hat ein reiner Antagonist keine eigene Wirkung. In der *in vivo*-Studie durch Akhani *et al.*<sup>[172]</sup> wurde kein Eigeneffekt des Ingwer-Presssaftes beobachtet. Der Eigeneffekt der Substanzen ist vermutlich in einem „Serotonin-Tonus“ der INS-1

Zellen begründet. Wie zuvor beschrieben, wird Serotonin gemeinsam mit Insulin aus der  $\beta$ -Zelle des Pankreas sezerniert. Deeney *et al.*<sup>[189]</sup> validierten die Serotoninfreisetzung als Marker der Insulinsekretion an der INS-1 Zelllinie und zeigten, dass die Zelllinie im Stande ist, Serotonin in ihren Granula zu speichern. Die Freisetzung des Serotonins könnte daraufhin eventuell eine Limitierung der Insulinsekretion bewirken. Die eingesetzten Antagonisten verhindern durch Blockade der jeweiligen Serotoninrezeptoren eine Verminderung der Insulinsekretion. Bei der Auswertung der Daten muss also beachtet werden, dass zum einen die Wirkung des endogenen Serotonins der Zellen und zum anderen die des zugesetzten Serotonins antagonistisiert wird.

Der Eigeneffekt der Ingwerextrakte in einer Konzentration von 1  $\mu\text{g/ml}$  entspricht ungefähr der Steigerung der Insulinsekretion durch 1  $\mu\text{g/ml}$  Glibenclamid. Eine noch stärkere Steigerung der Insulinsekretion wird nur durch 100  $\mu\text{M}$  Tropisetron erreicht. Durch 100  $\mu\text{M}$  Methysergid und Ketanserin wird nur eine leichte Verstärkung der Insulinsekretion induziert. Dies zeigt, dass an dem „Serotonin-Tonus“ der INS-1 Zelle vor allem 5-HT<sub>3</sub>-Rezeptoren beteiligt sind. Eventuell spielen in geringem Ausmaß auch 5-HT<sub>4</sub>-Rezeptoren eine Rolle, da Tropisetron in hohen Konzentrationen auch 5-HT<sub>4</sub>-Rezeptoren blockiert. Da Methysergid und Ketanserin annähernd gleiche Eigeneffekte bewirken, obwohl Methysergid neben dem 5-HT<sub>2</sub> Rezeptor noch drei weitere Serotoninrezeptoren blockiert, kann davon ausgegangen werden, dass 5-HT<sub>2</sub>-Rezeptoren für eine leichte Steigerung der Insulinsekretion verantwortlich sind. Neben 5-HT<sub>3</sub>-Rezeptoren sind also auch 5-HT<sub>2</sub>-Rezeptoren an der Wirkung des Serotonins auf die Insulinsekretion der INS-1 Zelle beteiligt. Diese Ergebnisse bestätigen somit die Beobachtungen von Goyal *et al.*<sup>[174]</sup>.

Betrachtet man die Effekte der Antagonisten auf die durch Zusatz von 100–500  $\mu\text{M}$  Serotonin verminderte Insulinsekretion, wird deutlich, dass auch hier die Steigerung der Insulinsekretion durch Tropisetron und die Ingwerextrakte stärker ausfällt als durch Methysergid und Ketanserin. In den meisten Fällen geht die Steigerung der Insulinsekretion über den zuvor bestimmten Eigeneffekt der Substanzen hinaus. Dies bedeutet, dass neben dem „Serotonin-Tonus“ der Zelle auch die Wirkung des exogen zugeführten Serotonins antagonistisiert wird. Nur im Fall von 100  $\mu\text{M}$  Tropisetron entspricht die Steigerung der Insulinsekretion etwa dem Eigeneffekt. Eine Erklärung hierfür könnte sein, dass der Eigeneffekt bereits so stark ist, dass keine weitere Steigerung der Insulinsekretion über den Eigeneffekt hinaus mehr möglich ist. Die Ergebnisse zeigen, dass auch an der durch Serotonin induzierten Hemmung vor allem 5-HT<sub>3</sub>- und eventuell 5-HT<sub>4</sub>-Rezeptoren beteiligt sind. Auch in diesem Fall sind die Effekte von Methysergid und Ketanserin nicht signifikant unterschiedlich, so dass neben dem 5-HT<sub>3</sub>-Rezeptor-Antagonismus offensichtlich auch eine 5-HT<sub>2</sub>-Rezeptor-antagonistische Wirkung zur Steigerung der Insulinsekretion führt.

Vergleicht man das Wirkprofil der Extrakte mit dem der chemischen Antagonisten, deutet vor allem das Ausmaß der Steigerung der Insulinsekretion auf eine dem Tropisetron ähnliche Wirkung hin, die nur etwas schwächer ausfällt. Dass Ingwerextrakte etwas schwächer 5-HT<sub>3</sub>-Rezeptorkanal-antagonistisch wirksam sind als Tropisetron, wurde bereits im [<sup>14</sup>C]Guanidinium-Influx-Assay gezeigt. Des Weiteren können auch antagonistische Wirkungen der Inhaltsstoffe der Ingwerextrakte an 5-HT<sub>2</sub>-Rezeptoren zur Wirkung beitragen. Ein toxischer Effekt der Ingwerextrakte, der durch Zerstörung der Granula zu einer erhöhten Insulinfreisetzung führen würde, wurde durch Insulinsekretionsversuche in calciumfreiem Medium ausgeschlossen.

Die Ergebnisse des Zellassays bestätigen also die durch Akhani *et al.*<sup>[172]</sup> beschriebene Hypothese, in der die antiserotonerge Wirkung des Ingwers zur antidiabetischen Wirkung beiträgt. Bisher liegen zur antidiabetischen Wirkung des Ingwers am Menschen keine Studien vor. Diese sind notwendig, um zu überprüfen, ob die Ergebnisse des Zellassays und der *in vivo*-Versuche an der Ratte auf den menschlichen Organismus übertragbar sind.

## 6.2 Pfefferminzöl

Pfefferminzöl wird in magensaftresistent verkapselter Arzneiform zur Behandlung des Reizdarmsyndroms eingesetzt. Präparate wie Colpermin® sind bereits im Handel und mit dieser Indikation zugelassen. Die Mehrzahl der durchgeführten klinischen Studien belegen, dass durch Pfefferminzöl eine statistisch signifikante Verbesserung der RDS-Symptome erzielt wird (siehe Kapitel 1.4.4). Als Wirkungsmechanismus wird der konzentrationsabhängige antispasmodische Effekt des Pfefferminzöls und des (-)-Menthols auf die glatte Muskulatur des Gastrointestinaltrakts beschrieben<sup>[128]</sup>. Dieser wird zum Teil durch den Calcium-Kanal-modulierenden Effekt des (-)-Menthols bewirkt<sup>[133, 134]</sup>. Neben antispasmodischen Substanzen werden in der Therapie des Reizdarmsyndroms 5-HT<sub>3</sub>-Rezeptor-Antagonisten eingesetzt. Wie in Kapitel 1.2.2 beschrieben, ist eine Rolle des Serotonins an der Pathogenese des RDS wahrscheinlich. Auf die Involvierung von 5-HT<sub>3</sub>-Rezeptoren deutet vor allem die beim RDS auftretende viszerale Sensibilität hin, da diese Rezeptoren an der Weiterleitung der Reize vom ENS ans ZNS entscheidend beteiligt sind. Des Weiteren regulieren 5-HT<sub>3</sub>-Rezeptoren auch im Darmnervensystem neben anderen Rezeptoren die Motilität, die ebenfalls beim RDS gestört ist. Zur Untersuchung weiterer Wirkungsmechanismen des Pfefferminzöls wurde im Rahmen dieser Arbeit die 5-HT<sub>3</sub>-Rezeptor-antagonistische Wirkung des ätherischen Öls und des (-)-Menthols getestet.

## 6.2.1 Pharmakologische Untersuchung zur antagonistischen Wirkung von Pfefferminzöl und (-)-Menthol am 5-HT<sub>3</sub>-Rezeptorkanal

### 6.2.1.1 [<sup>14</sup>C]Guanidinium-Influx-Assay

Die Ergebnisse des [<sup>14</sup>C]Guanidinium-Influx-Assays in Kapitel 5.2.1.3 zeigen, dass sowohl Pfefferminzöl als auch (-)-Menthol den Serotonin-induzierten Kationeninflux in N1E-115 Zellen konzentrationsabhängig inhibieren. In Konzentrationen über 0,1 µl/ml Pfefferminzöl wird der Effekt des ätherischen Öls etwa zur Hälfte durch (-)-Menthol verursacht. Am Gesamteffekt des Öls sind also neben (-)-Menthol noch weitere Komponenten beteiligt. Das Pfefferminzöl weist somit eine 5-HT<sub>3</sub>-Rezeptorkanal-antagonistische Wirkung auf, die möglicherweise die gestörte Motilität und viszerale Sensibilität beim RDS positiv beeinflusst und neben weiteren Wirkungsmechanismen zum Gesamteffekt des Pfefferminzöls beiträgt.

### 6.2.1.2 Untersuchung der Rezeptor-Bindungsstelle

Zur Untersuchung der Bindungsstelle des Pfefferminzöls und des (-)-Menthols am 5-HT<sub>3</sub>-Rezeptor wurde wie zuvor mit den Substanzen des Ingweröls eine Bindungsstudie mit dem selektiven 5-HT<sub>3</sub>-Rezeptor-Antagonisten [<sup>3</sup>H]GR65630 durchgeführt (siehe Kapitel 5.2.2.2). Die spezifische Bindung des Radioliganden wird durch (-)-Menthol in Konzentrationen bis zu 1 mM nicht verringert. Das Pfefferminzöl zeigt nur in einer hohen Konzentration von 1 µl/ml eine leichte, wenn auch signifikante Verminderung der spezifischen Bindung von [<sup>3</sup>H]GR65630. Eventuell interagiert eine andere Substanz im Pfefferminzöl mit der Bindungsstelle des Radioliganden. Wahrscheinlicher ist aber, dass durch die hohe Ölkonzentration die Bindung des 5-HT<sub>3</sub>-Rezeptor-Antagonisten aufgrund lipophiler Effekte beeinflusst wird. Ähnlich wie beim ätherischen Ingweröl scheint der 5-HT<sub>3</sub>-Rezeptorkanal-antagonistische Effekt des Pfefferminzöls über eine allosterische modulierende Bindungsstelle am 5-HT<sub>3</sub>-Rezeptor zu erfolgen. In einigen Literaturstellen wird beschrieben, dass (-)-Menthol mit Ionenkanal-Rezeptoren interagiert. Hall *et al.*<sup>[130]</sup> zeigten in Zelltests, dass (-)-Menthol ein potenter positiv allosterischer Modulator an GABA<sub>A</sub>- und Glycinrezeptoren ist, die zur gleichen Familie gehören wie der 5-HT<sub>3</sub>-Rezeptor. Des Weiteren wirkt (-)-Menthol lokalanästhetisch<sup>[190]</sup> und antinozizeptiv<sup>[191]</sup>. Diese Wirkungen werden laut Haeseler *et al.*<sup>[192]</sup> eventuell durch Blockade spannungsabhängiger neuronaler Natrium-Kanäle verursacht. (-)-Menthol aktiviert TRPM8-Kanäle aus der Gruppe der Vanilloid-Rezeptoren und induziert über den folgenden Kationeneinstrom ein Kältegefühl<sup>[132]</sup>.

Zur Überprüfung eines unspezifischen Ionenkanaleffekts des Pfefferminzöls und des (-)-Menthols wurde zusätzlich zum Serotonin-induzierten [<sup>14</sup>C]Guanidinium-Influx an

N1E-115 Zellen auch der Veratridin-induzierte Kationeninflux bestimmt. Entgegen der zuvor beschriebenen Wirkung des (-)-Menthols an unterschiedlichen Ionenkanälen wird der Veratridin-induzierte Kationeninflux an spannungsabhängigen Natrium-Kanälen selbst durch 1 mM (-)-Menthol nicht beeinflusst. Pfefferminzöl hingegen hemmt in einer Konzentration von 0,32 µl/ml sowohl den Serotonin- als auch den Veratridin-induzierten [<sup>14</sup>C]Guanidinium-Influx gleich stark um etwa 80 %. Dies bedeutet, dass die 5-HT<sub>3</sub>-Rezeptorkanal-antagonistische Wirkung des Pfefferminzöls zum einen durch eine negative allosterische Modulation des 5-HT<sub>3</sub>-Rezeptors durch (-)-Menthol erfolgt. Zum anderen könnten weitere Komponenten des Pfefferminzöls durch eine unspezifische Blockade von Ionenkanälen zum antagonistischen Effekt des ätherischen Öls am 5-HT<sub>3</sub>-Rezeptorkanal beitragen.

### 6.2.1.3 Antiserotonerge Wirkung von Pfefferminzöl und (-)-Menthol am Ileum der Ratte

Die spasmolytische und antispasmodische Wirkung des Pfefferminzöls wurde in zahlreichen Untersuchungen an isolierten Organen belegt. Eine Übersicht dieser Studien wird in einem Review von Grigoleit *et al.*<sup>[128]</sup> zur Pharmakologie und präklinischen Pharmakokinetik des Pfefferminzöls gegeben. Wie die Ergebnisse in Kapitel 5.2.3.1 zeigen, hemmt 0,01–0,32 µl/ml Pfefferminzöl konzentrationsabhängig die durch Serotonin induzierte Spontankontraktion am Ileum der Ratte. Außerdem übt Pfefferminzöl einen konzentrationsabhängigen relaxierenden Eigeneffekt auf den Basistonus des isolierten Organs aus. Sowohl der hemmende Effekt auf die Kontraktion als auch der relaxierende Eigeneffekt des Pfefferminzöls werden zum größten Teil durch (-)-Menthol verursacht. Die leichte Rechtsverschiebung der Dosis-Wirkungs-Kurve des Menthols im Vergleich zur Pfefferminzöl-Kurve zeigt aber, dass weitere Komponenten des Öls zur Gesamtwirkung beitragen (siehe Abb. 5.25). Wie bereits beschrieben, wird die spasmolytische Wirkung des Pfefferminzöls durch die Calcium-Kanal-modulierende Wirkung des (-)-Menthols und die dadurch induzierte Hemmung des Ca<sup>2+</sup>-Influsses in glatte Muskelzellen verursacht. Hill *et al.*<sup>[133]</sup> stellten in Kontraktionsstudien an der isolierten Taenie des Meerschweinchens fest, dass die durch Serotonin, Histamin und Substanz P induzierte Kontraktion durch Pfefferminzöl nicht-kompetitiv gehemmt wird. Pfefferminzöl inhibiert die durch Serotonin induzierte motorische Antwort wesentlich stärker als die der anderen Stimuli. Die im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Experimente am isolierten Rattenileum zeigen nur, dass die Serotonin-induzierte Kontraktion durch Pfefferminzöl inhibiert wird und in welchem Ausmaß (-)-Menthol an der Wirkung des Öls beteiligt ist. Vermutlich ist sowohl an der antispasmodischen als auch an der spasmolytischen Wirkung des Öls der Calcium-Kanal-modulatorische Effekt des (-)-Menthols beteiligt. Aufgrund der Ergebnisse aus dem [<sup>14</sup>C]Guanidinium-Influx könnte aber eine 5-HT<sub>3</sub>-Rezeptor-antagonistische

Wirkung ebenfalls an dem Effekt des ätherischen Öls beteiligt sein. Ein relaxierender Eigeneffekt wurde, wie zuvor beschrieben, auch bei dem 5-HT<sub>3</sub>-Rezeptor-Antagonisten Ondansetron beobachtet. Weitere Untersuchungen zum Beispiel am isolierten Meerschweinchenileum mit selektiven 5-HT<sub>3</sub>-Rezeptor-Antagonisten und -Agonisten könnten mehr Aufschluss über eine antagonistische Wirkkomponente des Pfefferminzöls am 5-HT<sub>3</sub>-Rezeptorkanal in einem komplexeren Modellen als dem Zell-Assay liefern.

#### **6.2.1.4 Biologische Relevanz der eingesetzten Konzentrationen des Pfefferminzöls**

Die in den Untersuchungen eingesetzten Konzentrationen an Pfefferminzöl lagen zwischen 0,01 und 1 µl/ml. In der RDS-Therapie liegt die Dosierungsempfehlung bei dreimal täglich 0,2–0,4 ml Pfefferminzöl. Bei Anwendung der höchsten Dosierung werden täglich 1,2 ml Pfefferminzöl eingenommen. Geht man von einem Verteilungsvolumen von 70 l und einer vollständigen Resorption der Substanzen des ätherischen Öls aus, so erhält man eine Konzentration an ätherischem Öl von 0,017 µl/ml Körpervolumen. Diese Konzentration liegt im unteren Bereich der eingesetzten Konzentrationen und repräsentiert einen Effekt an 5-HT<sub>3</sub>-Rezeptoren außerhalb des enterischen Nervensystems wie zum Beispiel den Afferenzen zum ZNS. Die höheren getesteten Konzentrationen zeigen mögliche Effekte im Darmnervensystem. Aufgrund der magensaftresistenten Formulierung der Pfefferminzöl-Präparate ergeben sich im Darmbereich wesentlich höhere Konzentrationen des Wirkstoffs als im Plasma.

## 7 Zusammenfassung

### Ingwer

#### Pharmakologische Untersuchung zur antiemetischen Wirkung des Ingwers

Das ätherische Öl des Ingwerwurzelstocks (*Zingiberis rhizoma*) weist eine antagonistische Wirkung am 5-HT<sub>3</sub>-Rezeptorkanal auf und trägt damit in einem Gesamtextrakt zur antiemetischen Wirksamkeit des Ingwers bei. Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurde untersucht, ob und in welchem Ausmaß die im Ingweröl als Hauptbestandteile enthaltenen Sesquiterpenkohlenwasserstoffe ar-Curcumen,  $\alpha$ -Zingiberen, (E,E)- $\alpha$ -Farnesen,  $\beta$ -Bisabolen und  $\beta$ -Sesquiphellandren und der Monoterpenaldehyd Citral an der antiserotonergen Wirkung des ätherischen Ingweröls maßgeblich beteiligt sind. In einem *in vitro*-Assay wurde durch Bestimmung des Kationeninfluxes in N1E-115 Zellen die antagonistische Wirkung der zuvor aus dem ätherischen Ingweröl isolierten Hauptinhaltsstoffe am 5-HT<sub>3</sub>-Rezeptorkanal getestet. Mittels Bindungsstudien wurde die Rezeptorbindungsstelle untersucht.

#### Ergebnisse

- Jede der getesteten Substanzen hemmt den Kationeninflux konzentrationsabhängig.
- Gemessen an den eingesetzten Konzentrationen weist Citral, gefolgt von ar-Curcumen, den stärksten antagonistischen Effekt am 5-HT<sub>3</sub>-Rezeptorkanal auf, während  $\alpha$ -Zingiberen die schwächste antagonistische Wirkung zeigt.
- Die gesamte Sesquiterpenfraktion verursacht trotz eines hohen Anteils am Öl von 80 % nur ca. 46 % der Wirkung des Ingweröls.
- Citral, das abhängig von der Herkunft des Ingwers als Hauptbestandteil im Ingweröl vorkommen kann, verstärkt nach Zusatz zu einem citralfreien Ingweröl dessen 5-HT<sub>3</sub>-Rezeptorkanal-antagonistische Wirkung.
- In Bindungsstudien mit dem selektiven 5-HT<sub>3</sub>-Rezeptor-Antagonisten [<sup>3</sup>H]GR65630 vermindern weder das ätherische Ingweröl, noch die Reinstoffe Citral und ar-Curcumen die spezifische Bindung des Radioliganden.

## Schlussfolgerungen

- Die Gesamtwirkung des ätherischen Öls kommt zum einen durch additive Wirkungen einzelner Hauptkomponenten zustande. Das Monoterpen Citral und die Sesquiterpenkohlenwasserstoffe, hier vor allem ar-Curcumen, sind bedeutend an der antagonistischen Wirkung des Ingweröls am 5-HT<sub>3</sub>-Rezeptor beteiligt. Zum anderen tragen auch Inhaltsstoffe mit geringer Konzentration oder Interaktionen der Substanzen im Vielstoffgemisch des Ingweröls zur Gesamtwirkung bei.
- ar-Curcumen, das bei Lagerung aus  $\alpha$ -Zingiberen gebildet wird, weist eine stärkere antagonistische Wirkung am 5-HT<sub>3</sub>-Rezeptorkanal auf als  $\alpha$ -Zingiberen. Eine kontrollierte Lagerung des Öls zur Erhöhung des ar-Curcumen-Anteils wäre bezüglich der antiserotonergen Wirkung von Vorteil.
- Die 5-HT<sub>3</sub>-Rezeptorkanal-antagonistischen Komponenten des Ingweröls wirken nicht über einen kompetitiven Mechanismus an der Bindungsstelle des Serotonins.
- Eventuell modulieren die Ingwerölbestandteile den 5-HT<sub>3</sub>-Rezeptorkanal über eine allosterische Bindungsstelle. Die Identifizierung dieser Bindungsstelle könnte zur weiteren Aufklärung des Wirkungsmechanismus der Substanzen beitragen.
- Bei der Auswahl von Ingwer zur antiemetischen Therapie sollte auf einen möglichst hohen Gehalt an ätherischem Öl geachtet werden. Ideal wäre ein citralreicher Ingwer mit hohem Scharfstoff-Gehalt.
- Zur besseren Vergleichbarkeit klinischer Studien zur antiemetischen Wirkung des Ingwers sollten diese mit standardisierten Extrakten durchgeführt werden. Neben einem ausreichenden Scharfstoff-Gehalt sollte auch der Gehalt des ätherischen Öls und bestimmter Komponenten wie ar-Curcumen und Citral standardisiert werden.

## Pharmakologische Untersuchungen zum antidiabetischen Wirkungsmechanismus des Ingwers

In *in vivo*-Tierversuchen wurde eine positive Wirkung von Ingwer bei einer diabetischen Stoffwechsellage belegt. Der Wirkungsmechanismus wurde bisher nur wenig untersucht. Durch Insulinsekretionsversuche an INS-1 Zellen wurde getestet, ob die antagonistische Wirkung am 5-HT<sub>3</sub>-Rezeptorkanal für die antidiabetische Wirkung des Ingwers von Bedeutung sein könnte.

## Ergebnisse

- Der selektive 5-HT<sub>3</sub>-Rezeptor-Antagonist [<sup>3</sup>H]GR65630 bindet spezifisch an INS-1 Zellen; 35 % der spezifischen Bindung ist durch Tropicsetron antagonisierbar.
- Serotonin vermindert die durch Glucose stimulierte Insulinsekretion.



- Ingwerextrakte bewirken als Eigeneffekt eine Steigerung der Insulinsekretion, die nicht gering ist im Vergleich zu Glibenclamid.
- Die chemischen Serotoninrezeptor-Antagonisten Tropisetron (5-HT<sub>3/(4)</sub>), Methysergid (5-HT<sub>1/2/5/7</sub>) und Ketanserin (5-HT<sub>2A+2C</sub>) üben einen die Insulinsekretion steigernden Eigeneffekt aus. Tropisetron steigert die Sekretion über die Wirkung des Glibenclamids hinaus. Methysergid und Ketanserin bewirken eine nur geringe Verstärkung der Insulinsekretion in ungefähr gleichem Ausmaß.
- Ingwerextrakte inhibieren die Hemmung der Insulinsekretion durch Serotonin und steigern die Sekretion über den Eigeneffekt hinaus.
- Tropisetron, Methysergid und Ketanserin inhibieren die durch Serotonin verminderte Insulinsekretion.
- Methysergid und Ketanserin steigern die Sekretion über den Eigeneffekt hinaus. Die Effekte dieser beiden Serotoninrezeptor-Antagonisten unterscheiden sich nicht statistisch signifikant voneinander.

### Schlussfolgerungen

- INS-1 Zellen verfügen über 5-HT<sub>3</sub>-Rezeptoren.
- Serotonin, das in den Granula mit Insulin gespeichert ist, wird gemeinsam mit Insulin sezerniert und inhibiert vor allem über die Aktivierung von 5-HT<sub>3</sub>-Rezeptoren und in geringerem Maße von 5-HT<sub>2</sub>-Rezeptoren eine weitere Insulinsekretion. Dies zeigen die Eigeneffekte der Serotoninrezeptor-Antagonisten.
- Exogen zugesetztes Serotonin führt vermutlich über die zuvor genannten Serotoninrezeptoren zu einer verminderten Insulinsekretion.
- Diese verminderte Insulinsekretion wird durch Zugabe der Ingwerextrakte inhibiert. Die dem Tropisetron ähnliche Wirkung der Extrakte zeigt, dass die Steigerung der Insulinsekretion vor allem über die 5-HT<sub>3</sub>-Rezeptorkanal-antagonistische Wirkung erfolgt; in geringerem Maße kann auch ein 5-HT<sub>2</sub>-Rezeptor-antagonistischer Effekt zur Steigerung der Insulinsekretion durch die Ingwerextrakte beitragen.
- Eine antidiabetische Wirkung des Ingwers könnte durchaus in seiner antiserotonergen Wirkung begründet sein.

## Pfefferminzöl

Pfefferminzöl vermindert die Symptome des Reizdarmsyndroms. Serotonin ist vermutlich unter anderem über die Wirkung an 5-HT<sub>3</sub>-Rezeptoren an der Pathogenese des Reizdarmsyndroms beteiligt. Zur Untersuchung einer möglichen antagonistischen Wirkung des Pfefferminzöls am 5-HT<sub>3</sub>-Rezeptorkanal wurden Kationeninflux-Versuche, Bindungsstudien und Kontraktionsversuche am Ileum der Ratte durchgeführt.

## Ergebnisse

- Pfefferminzöl und sein Hauptbestandteil (-)-Menthol hemmen konzentrationsabhängig den Kationeninflux an N1E-115 Zellen. (-)-Menthol bewirkt ungefähr die Hälfte der Wirkung des ätherischen Öls.
- Beide Substanzen verdrängen nicht den 5-HT<sub>3</sub>-Rezeptor-Antagonisten [<sup>3</sup>H]GR65630 von seiner Bindungsstelle.
- Pfefferminzöl zeigt unspezifische Ionenkanaleffekte, (-)-Menthol dagegen nicht.
- Am isolierten Ileum der Ratte vermindern sowohl das ätherische Öl als auch (-)-Menthol die durch Serotonin induzierte Spontankontraktion; beide Substanzen üben einen relaxierenden Eigeneffekt auf den Basistonus des Organs aus. Die Wirkung des ätherischen Öls wird zu einem großen Teil durch (-)-Menthol verursacht, daneben sind jedoch weitere Komponenten des Pfefferminzöls an der Gesamtwirkung beteiligt.

## Schlussfolgerungen

- Pfefferminzöl weist eine antagonistische Wirkung am 5-HT<sub>3</sub>-Rezeptorkanal auf, die zum einen durch einen unspezifischen Ionenkanaleffekt und zum anderen durch die antagonistische Wirkung des (-)-Menthols am 5-HT<sub>3</sub>-Rezeptorkanal zustande kommt.
- Pfefferminzöl und (-)-Menthol greifen nicht an der Bindungsstelle des Serotonins an, sondern modulieren den Rezeptor möglicherweise über eine allosterische Bindungsstelle, die bisher nicht identifiziert wurde.
- Die antispasmodischen und relaxierenden Effekte des Pfefferminzöls und des (-)-Menthols am Ileum der Ratte sind vermutlich zu einem großen Teil durch die bereits bewiesene Calcium-Kanal-modulierende Wirkung der Testsubstanzen begründet. Eventuell trägt zusätzlich auch ein antagonistischer Effekt am 5-HT<sub>3</sub>-Rezeptorkanal zur Wirkung bei.
- Die Wirksamkeit des Pfefferminzöls in der Therapie des Reizdarmsyndroms könnte also neben weiteren Wirkungsmechanismen auch auf einer 5-HT<sub>3</sub>-Rezeptorkanal-antagonistischen Wirkung des Öls und des (-)-Menthols beruhen.

## 8 Abbildungsverzeichnis

Abb. 1.1	Biosynthese von Serotonin.....	2
Abb. 1.2	Schematische Darstellung einer „Cys-loop“-Rezeptoruntereinheit.....	4
Abb. 1.3	Schematische Darstellung der Beteiligung von 5-HT <sub>3</sub> - und 5-HT <sub>4</sub> -Rezeptoren an der Darm-Peristaltik.....	7
Abb. 1.4	Auslösende Faktoren für CINV nach Nemeč (2006).....	10
Abb. 1.5	Hypothetisches Modell der Pathophysiologie der postoperativen Nausea und Emesis .....	11
Abb. 1.6	Algorithmus zur RDS-Therapie .....	17
Abb. 1.7	<i>Zingiber officinale</i> ROSCOE aus Köhler's Medizinal-Pflanzen.....	18
Abb. 1.8	<i>Zingiberis rhizoma</i> (Ingwerwurzelstock).....	19
Abb. 1.9	Kondensation von DMAPP und IPP zu C <sub>10</sub> - und C <sub>15</sub> -Einheiten.....	22
Abb. 1.10	Chemische Struktur einiger Terpene des Ingweröls.....	23
Abb. 1.11	Homologe Reihe der Gingerole.....	24
Abb. 1.12	Umsetzung von [6]-Gingerol durch thermische Belastung oder Lagerung.....	25
Abb. 1.13	Umsetzung von $\alpha$ -Zingiberen zu ar-Curcumen während der Lagerung des ätherischen Öls .....	26
Abb. 1.14	<i>Mentha x piperita</i> L. aus Köhler's Medizinal-Pflanzen.....	33
Abb. 1.15	Biosynthese der C-3-oxidierten p-Menthanderivate des Pfefferminz- und Minzöls .....	35
Abb. 4.1	Schematische Darstellung des Mechanismus der Diels-Alder-Reaktion.....	61
Abb. 4.2	Cycloaddition von $\alpha$ -Zingiberen an PTAD .....	62
Abb. 4.3	Grundschritte von Rezeptorbindungsstudien .....	67
Abb. 4.4	Fotographien des im Organbad eingehängten Ileums .....	69
Abb. 5.1	Gaschromatogramm des destillierten ätherischen Öls zeitnah zur Gewinnung .....	75
Abb. 5.2	Gaschromatogramme des frisch destillierten (links) und des 10 Monate gelagerten Ingweröls (rechts).....	77
Abb. 5.3	Dünnschichtchromatogramm des ätherischen Öls und der fünf Fraktionen.....	78
Abb. 5.4	Dünnschichtchromatogramm der gesammelten Unterfraktionen mittels FCPC .....	80
Abb. 5.5	Gaschromatogramm der SF 24 mit (E,E)- $\alpha$ -Farnesen/ $\beta$ -Bisabolen als Hauptkomponente.....	81
Abb. 5.6	Gaschromatogramm der vereinigten SF 27 und 28 .....	82
Abb. 5.7	HPLC-Spektrum der SF 27 und 28 .....	83
Abb. 5.8	Gaschromatogramme des isolierten ar-Curcumens (links) und des angereicherten $\beta$ -Sesquiphellandrens (rechts) nach der präparativen HPLC .....	84
Abb. 5.9	Gaschromatogramme der SF 27 + 28 kurz nach Gewinnung (links) und nach zweiwöchiger Lagerung (rechts).....	84
Abb. 5.10	Übersicht der chromatographischen Isolierung und Anreicherung der Sesquiterpenkohlenwasserstoffe .....	86
Abb. 5.11	Gaschromatogramm des ätherischen Ingweröls der Firma Caelo .....	88
Abb. 5.12	Gaschromatogramme der durch Vakuumdestillation gewonnenen ersten beiden Fraktionen.....	89

Abb. 5.13	Gaschromatogramme der dritten und vierten Fraktion der Vakkumdestillation.....	90
Abb. 5.14	Gaschromatogramm des isolierten Produktes der Retro-Diels-Alder-Reaktion .....	93
Abb. 5.15	Isolierung des $\alpha$ -Zingiberens .....	95
Abb. 5.16	Effekt der Sesquiterpene auf den Serotonin-induzierten [ $^{14}\text{C}$ ]Guanidinium-Influx in N1E-115 Zellen.....	97
Abb. 5.17	Anteil der Sesquiterpenkohlenwasserstoffe am Effekt des ätherischen Ingweröls auf den Serotonin-induzierten [ $^{14}\text{C}$ ]Guanidinium-Influx.....	99
Abb. 5.18	Effekt von Citral und Eucalyptol auf den Serotonin-induzierten [ $^{14}\text{C}$ ]Guanidinium-Influx in N1E-115 Zellen .....	100
Abb. 5.19	Beeinflussung des Serotonin-induzierten [ $^{14}\text{C}$ ]Guanidinium-Influxes in N1E-115 Zellen durch ätherisches Öl ohne Citral und versetzt mit 5 % und 20 % Citral .....	102
Abb. 5.20	Beeinflussung des Serotonin-induzierten [ $^{14}\text{C}$ ]Guanidinium-Influxes in N1E-115 Zellen durch einen Ingwer-Spezialextrakt der Firma Finzelberg .....	103
Abb. 5.21	Effekt von Pfefferminzöl und (-)-Menthol auf den Serotonin-induzierten [ $^{14}\text{C}$ ]Guanidinium-Influx in N1E-115 Zellen .....	104
Abb. 5.22	Verdrängung von [ $^3\text{H}$ ]GR65630 von 5-HT <sub>3</sub> -Rezeptoren an N1E-115 Zellen durch ätherisches Ingweröl, ar-Curcumen, Citral und Tropisetron .....	107
Abb. 5.23	Verdrängung von [ $^3\text{H}$ ]GR65630 von 5-HT <sub>3</sub> -Rezeptoren an N1E-115 Zellen durch Bestandteile des Ingweröls .....	108
Abb. 5.24	Verdrängung von [ $^3\text{H}$ ]GR65630 von 5-HT <sub>3</sub> -Rezeptoren an N1E-115 Zellen durch Pfefferminzöl und seinen Hauptbestandteil (-)-Menthol .....	109
Abb. 5.25	Effekt von Pfefferminzöl und (-)-Menthol auf die Serotonin-induzierte Kontraktion am isolierten Rattenileum .....	110
Abb. 5.26	Eigeneffekt von Pfefferminzöl auf den Basistonus des isolierten Rattenileums .....	111
Abb. 5.27	Effekt eines Ingwer-Spezialextraktes der Firma Finzelberg auf die Serotonin-induzierte Kontraktion des Rattenileums.....	112
Abb. 5.28	Effekt von Serotonin auf die Glucose-induzierte Insulinsekretion an INS-1 Zellen .....	114
Abb. 5.29	Beeinflussung der durch Serotonin verminderten Insulinsekretion durch einen Ingwer-Spissumextrakt .....	116
Abb. 5.30	Beeinflussung der durch Serotonin verminderten Insulinsekretion durch einen Ingwer-Spezialextrakt .....	117
Abb. 5.31	Beeinflussung der durch Serotonin verminderten Insulinsekretion durch Tropisetron.....	120
Abb. 5.32	Beeinflussung der durch Serotonin verminderten Insulinsekretion durch Methysergid .....	121
Abb. 5.33	Beeinflussung der durch Serotonin verminderten Insulinsekretion durch Ketanserin.....	122

## 9 Literaturverzeichnis

1. Rapport, M.M., *The discovery of serotonin*. *Perspect Biol Med*, 1997. **40**(2): p. 260-73.
2. Erspamer, V. and B. Asero, *Identification of enteramine, the specific hormone of the enterochromaffin cell system, as 5-hydroxytryptamine*. *Nature*, 1952. **169**(4306): p. 800-1.
3. Rapport, M.M., A.A. Green, and I.H. Page, *Serum vasoconstrictor, serotonin; isolation and characterization*. *J Biol Chem*, 1948. **176**(3): p. 1243-51.
4. Rapport, M.M., *Serum vasoconstrictor (serotonin) the presence of creatinine in the complex; a proposed structure of the vasoconstrictor principle*. *J Biol Chem*, 1949. **180**(3): p. 961-9.
5. Rex, A., B. Bert, and H. Fink, *[History and new developments. The pharmacology of 5-HT<sub>3</sub> antagonists]*. *Pharm Unserer Zeit*, 2007. **36**(5): p. 342-53.
6. Mutschler, E., et al., *Arzneimittelwirkungen - Lehrbuch der Pharmakologie und Toxikologie*. 2008, 9.Auflage.
7. Kim, D.Y. and M. Camilleri, *Serotonin: a mediator of the brain-gut connection*. *Am J Gastroenterol*, 2000. **95**(10): p. 2698-709.
8. Grahame-Smith, D.G., *Tryptophan hydroxylation in brain*. *Biochem Biophys Res Commun*, 1964. **16**(6): p. 586-92.
9. Fagervall, I. and S.B. Ross, *A and B forms of monoamine oxidase within the monoaminergic neurons of the rat brain*. *J Neurochem*, 1986. **47**(2): p. 569-76.
10. Hoyer, D., J.P. Hannon, and G.R. Martin, *Molecular, pharmacological and functional diversity of 5-HT receptors*. *Pharmacol Biochem Behav*, 2002. **71**(4): p. 533-54.
11. Reeves, D.C. and S.C. Lummis, *The molecular basis of the structure and function of the 5-HT<sub>3</sub> receptor: a model ligand-gated ion channel (review)*. *Mol Membr Biol*, 2002. **19**(1): p. 11-26.
12. Thompson, A.J. and S.C. Lummis, *The 5-HT<sub>3</sub> receptor as a therapeutic target*. *Expert Opin Ther Targets*, 2007. **11**(4): p. 527-40.
13. Thompson, A.J., L. Zhang, and S.C.R. Lummis, *The 5-HT<sub>3</sub> receptor*, in *The Serotonin Receptors: From Molecular Pharmacology to Human Therapeutics*, B.L. Roth, Editor. 2006.
14. Dubin, A.E., et al., *The pharmacological and functional characteristics of the serotonin 5-HT<sub>3A</sub> receptor are specifically modified by a 5-HT<sub>3B</sub> receptor subunit*. *J Biol Chem*, 1999. **274**(43): p. 30799-810.
15. Thompson, A.J. and S.C. Lummis, *5-HT<sub>3</sub> receptors*. *Curr Pharm Des*, 2006. **12**(28): p. 3615-30.
16. Melis, C., et al., *Exploring the binding of serotonin to the 5-HT<sub>3</sub> receptor by density functional theory*. *J Phys Chem B*, 2006. **110**(51): p. 26313-9.
17. Farber, L., et al., *Physiology and pathophysiology of the 5-HT<sub>3</sub> receptor*. *Scand J Rheumatol Suppl*, 2004(119): p. 2-8.
18. Jackson, M.B. and J.L. Yakel, *The 5-HT<sub>3</sub> receptor channel*. *Annu Rev Physiol*, 1995. **57**: p. 447-68.
19. Riering, K., C. Rewerts, and W. Zieglgansberger, *Analgesic effects of 5-HT<sub>3</sub> receptor antagonists*. *Scand J Rheumatol Suppl*, 2004(119): p. 19-23.
20. Gershon, M.D., *Review article: roles played by 5-hydroxytryptamine in the physiology of the bowel*. *Aliment Pharmacol Ther*, 1999. **13 Suppl 2**: p. 15-30.
21. Gershon, M.D., *Review article: serotonin receptors and transporters -- roles in normal and abnormal gastrointestinal motility*. *Aliment Pharmacol Ther*, 2004. **20 Suppl 7**: p. 3-14.
22. Gershon, M.D., *Nerves, reflexes, and the enteric nervous system: pathogenesis of the irritable bowel syndrome*. *J Clin Gastroenterol*, 2005. **39**(5 Suppl 3): p. S184-93.
23. Crowell, M.D., *Role of serotonin in the pathophysiology of the irritable bowel syndrome*. *Br J Pharmacol*, 2004. **141**(8): p. 1285-93.

24. Tonini, M. and F. Pace, *Drugs acting on serotonin receptors for the treatment of functional GI disorders*. Dig Dis, 2006. **24**(1-2): p. 59-69.
25. McLean, P.G., R.A. Borman, and K. Lee, *5-HT in the enteric nervous system: gut function and neuropharmacology*. Trends Neurosci, 2007. **30**(1): p. 9-13.
26. Tebbe, J.J. and R. Arnold, *Serotonin und Serotoninrezeptoren*. Deutsches Ärzteblatt, 2004. **101**: p. A936-942.
27. Carter, D., et al., *Characterization of a postjunctional 5-HT receptor mediating relaxation of guinea-pig isolated ileum*. Eur J Pharmacol, 1995. **280**(3): p. 243-50.
28. Hesketh, P.J., *Understanding the pathobiology of chemotherapy-induced nausea and vomiting. Providing a basis for therapeutic progress*. Oncology (Williston Park), 2004. **18**(10 Suppl 6): p. 9-14.
29. Nemeč, K., *[Nausea and vomiting in oncologic therapy. Guidelines for use of setrone]*. Pharm Unserer Zeit, 2007. **36**(5): p. 362-7.
30. Rubenstein, E.B., et al., *New approaches to chemotherapy-induced nausea and vomiting: from neuropharmacology to clinical investigations*. Cancer J, 2006. **12**(5): p. 341-7.
31. Gregory, R.E. and D.S. Ettinger, *5-HT<sub>3</sub> receptor antagonists for the prevention of chemotherapy-induced nausea and vomiting. A comparison of their pharmacology and clinical efficacy*. Drugs, 1998. **55**(2): p. 173-89.
32. Apfel, C.C. and N. Roewer, *[Postoperative nausea and vomiting]*. Anaesthesist, 2004. **53**(4): p. 377-89; quiz 390-1.
33. Kris, M.G., et al., *American Society of Clinical Oncology guideline for antiemetics in oncology: update 2006*. J Clin Oncol, 2006. **24**(18): p. 2932-47.
34. Apro, M., *5-HT<sub>3</sub>-Receptor Antagonists in the Management of Nausea and Vomiting in Cancer and Cancer Treatment*. Oncology, 2005(69): p. 97-109.
35. du Bois, A., H. Kriesinger-Schroeder, and H.G. Meerpohl, *The role of serotonin as a mediator of emesis induced by different stimuli*. Support Care Cancer, 1995. **3**(5): p. 285-90.
36. Wurglics, M. and F. Spiegl, *[Physiopathology, risk factors and therapy. Postoperative Nausea and vomiting (PONV)]*. Pharm Unserer Zeit, 2007. **36**(5): p. 368-72.
37. Kreis, M.E., *Postoperative nausea and vomiting*. Auton Neurosci, 2006. **129**(1-2): p. 86-91.
38. Quinla, J.D. and D.A. Hill, *Nausea and vomiting of pregnancy*. Am Fam Physician, 2003. **68**(1): p. 121-8.
39. Thews, G., E. Mutschler, and P. Vaupel, *Anatomie, Physiologie, Pathophysiologie*. 1999, 5. Auflage.
40. Zajonc, T.P. and P.S. Roland, *Vertigo and motion sickness. Part I: vestibular anatomy and physiology*. Ear Nose Throat J, 2005. **84**(9): p. 581-4.
41. Golding, J.F. and M.A. Gresty, *Motion sickness*. Curr Opin Neurol, 2005. **18**(1): p. 29-34.
42. Pausch, N.C., M. Reiss, and G. Reiss, *[Motion sickness. Findings and treatment]*. Med Monatsschr Pharm, 2003. **26**(4): p. 130-5.
43. Sheehan, P., *Hyperemesis gravidarum--assessment and management*. Aust Fam Physician, 2007. **36**(9): p. 698-701.
44. Schroder, O., *[Nausea and vomiting in pregnancy]*. Med Monatsschr Pharm, 2004. **27**(9): p. 304-8; quiz 309-10.
45. Borgeat, A., M. Fathi, and A. Valiton, *Hyperemesis gravidarum: is serotonin implicated?* Am J Obstet Gynecol, 1997. **176**(2): p. 476-7.
46. Guikontes, E., A. Spantideas, and J. Diakakis, *Ondansetron and hyperemesis gravidarum*. Lancet, 1992. **340**(8829): p. 1223.
47. Siu, S.S., et al., *Treatment of intractable hyperemesis gravidarum by ondansetron*. Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol, 2002. **105**(1): p. 73-4.
48. Sullivan, C.A., et al., *A pilot study of intravenous ondansetron for hyperemesis gravidarum*. Am J Obstet Gynecol, 1996. **174**(5): p. 1565-8.
49. Tucker, M.L., et al., *Ondansetron: pre-clinical safety evaluation*. Eur J Cancer Clin Oncol, 1989. **25** Suppl 1: p. S79-93.

50. Propst, A., et al., [Guidelines on diagnosis and therapy of the irritable bowel syndrome]. *Z Gastroenterol*, 2003. **41**(4): p. 356-60.
51. Ritchie, J., *Pain from distension of the pelvic colon by inflating a balloon in the irritable colon syndrome*. *Gut*, 1973. **14**(2): p. 125-32.
52. Kellow, J.E., C.M. Eckersley, and M.P. Jones, *Enhanced perception of physiological intestinal motility in the irritable bowel syndrome*. *Gastroenterology*, 1991. **101**(6): p. 1621-7.
53. Serra, J., F. Azpiroz, and J.R. Malagelada, *Impaired transit and tolerance of intestinal gas in the irritable bowel syndrome*. *Gut*, 2001. **48**(1): p. 14-9.
54. Trimble, K.C., et al., *Heightened visceral sensation in functional gastrointestinal disease is not site-specific. Evidence for a generalized disorder of gut sensitivity*. *Dig Dis Sci*, 1995. **40**(8): p. 1607-13.
55. Zighelboim, J., et al., *Visceral perception in irritable bowel syndrome. Rectal and gastric responses to distension and serotonin type 3 antagonism*. *Dig Dis Sci*, 1995. **40**(4): p. 819-27.
56. Holtmann, G., H. Goebell, and N.J. Talley, *Functional dyspepsia and irritable bowel syndrome: is there a common pathophysiological basis?* *Am J Gastroenterol*, 1997. **92**(6): p. 954-9.
57. Kellow, J.E., et al., *Dysmotility of the small intestine in irritable bowel syndrome*. *Gut*, 1988. **29**(9): p. 1236-43.
58. Kozlowski, C.M., et al., *The 5-HT(3) receptor antagonist alosetron inhibits the colorectal distention induced depressor response and spinal c-fos expression in the anaesthetised rat*. *Gut*, 2000. **46**(4): p. 474-80.
59. Coates, M.D., et al., *Molecular defects in mucosal serotonin content and decreased serotonin reuptake transporter in ulcerative colitis and irritable bowel syndrome*. *Gastroenterology*, 2004. **126**(7): p. 1657-64.
60. Houghton, L.A., et al., *Increased platelet depleted plasma 5-hydroxytryptamine concentration following meal ingestion in symptomatic female subjects with diarrhoea predominant irritable bowel syndrome*. *Gut*, 2003. **52**(5): p. 663-70.
61. Atkinson, W., et al., *Altered 5-hydroxytryptamine signaling in patients with constipation- and diarrhea-predominant irritable bowel syndrome*. *Gastroenterology*, 2006. **130**(1): p. 34-43.
62. Chen, J.J., et al., *Maintenance of serotonin in the intestinal mucosa and ganglia of mice that lack the high-affinity serotonin transporter: Abnormal intestinal motility and the expression of cation transporters*. *J Neurosci*, 2001. **21**(16): p. 6348-61.
63. Tack, J., et al., *Systematic review: the efficacy of treatments for irritable bowel syndrome--a European perspective*. *Aliment Pharmacol Ther*, 2006. **24**(2): p. 183-205.
64. Hadley, S.K. and S.M. Gaarder, *Treatment of irritable bowel syndrome*. *Am Fam Physician*, 2005. **72**(12): p. 2501-6.
65. Köhler, F.E., *Köhler's Medizinal-Pflanzen in naturgetreuen Abbildungen mit kurz erläuterndem Texte*, Gera, 1887.
66. Blaschek, W., et al., *Hagers Handbuch der Pharmazeutischen Praxis*. 2007 - Auflage 6: Schneider, G.
67. Falch, B., J. Reichling, and R. Saller, *Ingwer - nicht nur ein Gewürz*. *Dtsch. Apothek. Ztg.*, 1997. **137**: p. 47-60.
68. Langner, E., S. Greifenberg, and J. Gruenwald, *Ingwer*. *Balance*, 1997. **1**: p. 5-16.
69. Teuscher, E., U. Bauermann, and M. Werner, *Gewürzdrogen: Ein Handbuch der Gewürze, Gewürzkräuter, Gewürzmischungen und ihrer Ätherischen Öle*. 2003.
70. Germer, S. and G. Franz, *Ingwer - Eine vielseitige Arzneidroge*. *Dtsch. Apothek. Ztg.*, 1997. **47**: p. 40-46.
71. Govindarajan, V.S., *Ginger--chemistry, technology, and quality evaluation: part 1*. *Crit Rev Food Sci Nutr*, 1982. **17**(1): p. 1-96.
72. Hänsel R, S.O., *Pharmakognosie – Phytopharmazie*. 2007.
73. Erler, J., et al., *Über ätherische Öle des Ingwer, Zingiber officinalis Roscoe*. *Z Lebensm Unters Forsch*, 1988. **186**: p. 231-234.
74. Smith, R.M. and A.M. Robinson, *The essential oil of ginger from Fiji*. *Phytochemistry*, 2006. **20**: p. 203-206.

75. Connell, D.W. and R.A. Jordan, *Composition and Distinctive Volatile Flavour Characteristics of the Essential Oil from Australian-grown Ginger (Zingiber officinale)*. Journal of the Science of Food and Agriculture, 1971. **22**: p. 93-95.
76. Wohlmuth, H., et al., *Essential oil composition of diploid and tetraploid clones of ginger (Zingiber officinale Roscoe) grown in Australia*. J Agric Food Chem, 2006. **54**(4): p. 1414-9.
77. Abdel-Aziz, H., et al., *Mode of action of gingerols and shogaols on 5-HT<sub>3</sub> receptors: binding studies, cation uptake by the receptor channel and contraction of isolated guinea-pig ileum*. Eur J Pharmacol, 2006. **530**(1-2): p. 136-43.
78. Germer, S., *Untersuchungen zu Qualitätskriterien und zum antiemetischen Wirkmechanismus von Ingwer*. 1996 - Universität Regensburg (Dissertation).
79. Grant, K.L. and R.B. Lutz, *Ginger*. Am J Health Syst Pharm, 2000. **57**(10): p. 945-7.
80. *Monographien: Zingiberis rhizoma und Zingiberis rhizoma praeparata*. Arzneibuch der Chinesischen Medizin, 2006.
81. *WHO Monographie: Rhizoma Zingiberis*.
82. Chrubasik, S., M.H. Pittler, and B.D. Roufogalis, *Zingiberis rhizoma: a comprehensive review on the ginger effect and efficacy profiles*. Phytomedicine, 2005. **12**(9): p. 684-701.
83. Mascolo, N., et al., *Ethnopharmacologic investigation of ginger (Zingiber officinale)*. J Ethnopharmacol, 1989. **27**(1-2): p. 129-40.
84. Kiuchi, F., M. Shibuya, and U. Sankawa, *Inhibitors of prostaglandin biosynthesis from ginger*. Chem Pharm Bull (Tokyo), 1982. **30**(2): p. 754-7.
85. Kiuchi, F., et al., *Inhibition of prostaglandin and leukotriene biosynthesis by gingerols and diarylheptanoids*. Chem Pharm Bull (Tokyo), 1992. **40**(2): p. 387-91.
86. Nurtjahja-Tjendraputra, E., et al., *Effective anti-platelet and COX-1 enzyme inhibitors from pungent constituents of ginger*. Thromb Res, 2003. **111**(4-5): p. 259-65.
87. Tjendraputra, E., et al., *Effect of ginger constituents and synthetic analogues on cyclooxygenase-2 enzyme in intact cells*. Bioorg Chem, 2001. **29**(3): p. 156-63.
88. Ghayur, M.N., et al., *Muscarinic, Ca(++) antagonist and specific butyrylcholinesterase inhibitory activity of dried ginger extract might explain its use in dementia*. J Pharm Pharmacol, 2008. **60**(10): p. 1375-83.
89. Suekawa, M., et al., *Pharmacological studies on ginger. I. Pharmacological actions of pungent constituents, (6)-gingerol and (6)-shogaol*. J Pharmacobiodyn, 1984. **7**(11): p. 836-48.
90. Abdel-Aziz, A., *Isolation of some Active Constituents of Zingiber officinale and Characterization of their Effect on 5-HT<sub>3</sub> Receptors*. Doktorarbeit an der Universität Münster, Pharmakologie. 2004.
91. Yamahara, J., et al., *Active Components of Ginger Exhibiting Antiserotonergic Action*. Phytotherapy Research, 1989. **3**(2): p. 70-71.
92. Huang, Q.R., et al., *Anti-5-hydroxytryptamine<sub>3</sub> effect of galanolactone, diterpenoid isolated from ginger*. Chem Pharm Bull (Tokyo), 1991. **39**(2): p. 397-9.
93. Abdel-Aziz, H., et al., *5-HT<sub>3</sub> receptor blocking activity of arylalkanes isolated from the rhizome of Zingiber officinale*. Planta Med, 2005. **71**(7): p. 609-16.
94. Huang, Q., et al., *[The effect of ginger on serotonin induced hypothermia and diarrhea]*. Yakugaku Zasshi, 1990. **110**(12): p. 936-42.
95. Yamahara, J., et al., *Gastrointestinal motility enhancing effect of ginger and its active constituents*. Chem Pharm Bull (Tokyo), 1990. **38**(2): p. 430-1.
96. Hashimoto, K., et al., *Component of Zingiber officinale that improves the enhancement of small intestinal transport*. Planta Med, 2002. **68**(10): p. 936-9.
97. Riyazi, A., et al., *The effect of the volatile oil from ginger rhizomes (Zingiber officinale), its fractions and isolated compounds on the 5-HT<sub>3</sub> receptor complex and the serotonergic system of the rat ileum*. Planta Med, 2007. **73**(4): p. 355-62.
98. Reiter, M. and W. Brandt, *Relaxant effects on tracheal and ileal smooth muscles of the guinea pig*. Arzneimittelforschung, 1985. **35**(1A): p. 408-14.



99. Sadraei, H., A. Ghannadi, and K. Malekshahi, *Relaxant effect of essential oil of Melissa officinalis and citral on rat ileum contractions*. Fitoterapia, 2003. **74**(5): p. 445-52.
100. Yamahara, J., et al., *The anti-ulcer effect in rats of ginger constituents*. J Ethnopharmacol, 1988. **23**(2-3): p. 299-304.
101. Yamahara, J., et al., *[Stomachic principles in ginger. II. Pungent and anti-ulcer effects of low polar constituents isolated from ginger, the dried rhizoma of Zingiber officinale Roscoe cultivated in Taiwan. The absolute stereostructure of a new diarylheptanoid]*. Yakugaku Zasshi, 1992. **112**(9): p. 645-55.
102. Pace, J.C., *Oral ingestion of encapsulated ginger and reported self-care actions or the relief of chemotherapy associated nausea and vomiting*. Diss Abstr Int, 1987. **47**: p. 3297-B.
103. Meyer, K., et al., *Zingiber officinale (ginger) used to prevent 8-Mop associated nausea*. Dermatol Nurs, 1995. **7**(4): p. 242-4.
104. Bone, M.E., et al., *Ginger root--a new antiemetic. The effect of ginger root on postoperative nausea and vomiting after major gynaecological surgery*. Anaesthesia, 1990. **45**(8): p. 669-71.
105. Phillips, S., R. Ruggier, and S.E. Hutchinson, *Zingiber officinale (ginger)--an antiemetic for day case surgery*. Anaesthesia, 1993. **48**(8): p. 715-7.
106. Eberhart, L.H., et al., *Ginger does not prevent postoperative nausea and vomiting after laparoscopic surgery*. Anesth Analg, 2003. **96**(4): p. 995-8, table of contents.
107. Arfeen, Z., et al., *A double-blind randomized controlled trial of ginger for the prevention of postoperative nausea and vomiting*. Anaesth Intensive Care, 1995. **23**(4): p. 449-52.
108. Morin, A.M., et al., *[Is ginger a relevant antiemetic for postoperative nausea and vomiting?]*. Anesthesiol Intensivmed Notfallmed Schmerzther, 2004. **39**(5): p. 281-5.
109. Chaiyakunapruk, N., et al., *The efficacy of ginger for the prevention of postoperative nausea and vomiting: a meta-analysis*. Am J Obstet Gynecol, 2006. **194**(1): p. 95-9.
110. Stewart, J.J., et al., *Effects of ginger on motion sickness susceptibility and gastric function*. Pharmacology, 1991. **42**(2): p. 111-20.
111. Lien, H.C., et al., *Effects of ginger on motion sickness and gastric slow-wave dysrhythmias induced by circularvection*. Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol, 2003. **284**(3): p. G481-9.
112. Wood, C.D., et al., *Comparison of efficacy of ginger with various antimotion sickness drugs*. Clin Res Pr Drug Regul Aff, 1988. **6**(2): p. 129-36.
113. Mowrey, D.B. and D.E. Clayson, *Motion sickness, ginger, and psychophysics*. Lancet, 1982. **1**(8273): p. 655-7.
114. Grontved, A., et al., *Ginger root against seasickness. A controlled trial on the open sea*. Acta Otolaryngol, 1988. **105**(1-2): p. 45-9.
115. Schmid, R., et al., *Comparison of Seven Commonly Used Agents for Prophylaxis of Seasickness*. J Travel Med, 1994. **1**(4): p. 203-206.
116. Fischer-Rasmussen, W., et al., *Ginger treatment of hyperemesis gravidarum*. Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol, 1991. **38**(1): p. 19-24.
117. Vutyavanich, T., T. Kraissarin, and R. Ruangsri, *Ginger for nausea and vomiting in pregnancy: randomized, double-masked, placebo-controlled trial*. Obstet Gynecol, 2001. **97**(4): p. 577-82.
118. Keating, A. and R.A. Chez, *Ginger syrup as an antiemetic in early pregnancy*. Altern Ther Health Med, 2002. **8**(5): p. 89-91.
119. Sripramote, M. and N. Lekhyananda, *A randomized comparison of ginger and vitamin B6 in the treatment of nausea and vomiting of pregnancy*. J Med Assoc Thai, 2003. **86**(9): p. 846-53.
120. Betz, O., et al., *[Is ginger a clinically relevant antiemetic? A systematic review of randomized controlled trials]*. Forsch Komplementarmed Klass Naturheilkd, 2005. **12**(1): p. 14-23.
121. Ernst, E. and M.H. Pittler, *Efficacy of ginger for nausea and vomiting: a systematic review of randomized clinical trials*. Br J Anaesth, 2000. **84**(3): p. 367-71.

122. Lumb, A.B., *Mechanism of antiemetic effect of ginger*. *Anaesthesia*, 1993. **48**(12): p. 1118.
123. Holtmann, S., et al., *The anti-motion sickness mechanism of ginger. A comparative study with placebo and dimenhydrinate*. *Acta Otolaryngol*, 1989. **108**(3-4): p. 168-74.
124. Wichtl, M., et al., *Teedrogen und Phytopharmaka*, ed. S. WVGmbH. 1997 - 3. Auflage.
125. Windhaber, R., *Feuilleton: Arzneipflanze des Jahres 2004: Die Pfefferminze*. Dtsch. Apothek. Ztg., 2003. **51**.
126. *Pharmacopoea Europaea*. Grundwerk 2008, 6. Ausgabe.
127. Croteau, R., *Metabolism of monoterpenes in mint (mentha) species*. *Planta Med*, 1991. **57**(7 Suppl): p. S10-4.
128. Grigoleit, H.G. and P. Grigoleit, *Pharmacology and preclinical pharmacokinetics of peppermint oil*. *Phytomedicine*, 2005. **12**(8): p. 612-6.
129. Della Loggia, R., A. Tubaro, and T.L. Lunder, *Evaluation of some pharmacological activities of a peppermint extract*. *Fitoterapia*, 1990. **61**(3): p. 215-221.
130. Hall, A.C., et al., *Modulation of human GABAA and glycine receptor currents by menthol and related monoterpenoids*. *Eur J Pharmacol*, 2004. **506**(1): p. 9-16.
131. Forster, H.B., H. Niklas, and S. Lutz, *Antispasmodic Effects of Some Medicinal Plants*. *Planta Med*, 1980. **40**: p. 309-319.
132. Peier, A.M., et al., *A TRP channel that senses cold stimuli and menthol*. *Cell*, 2002. **108**(5): p. 705-15.
133. Hills, J.M. and P.I. Aaronson, *The mechanism of action of peppermint oil on gastrointestinal smooth muscle. An analysis using patch clamp electrophysiology and isolated tissue pharmacology in rabbit and guinea pig*. *Gastroenterology*, 1991. **101**(1): p. 55-65.
134. Hawthorn, M., et al., *The actions of peppermint oil and menthol on calcium channel dependent processes in intestinal, neuronal and cardiac preparations*. *Aliment Pharmacol Ther*, 1988. **2**(2): p. 101-18.
135. Rogers, J., H.H. Tay, and J.J. Misiewicz, *Peppermint oil*. *Lancet*, July 9, 1988.
136. Hiki, N., et al., *Peppermint oil reduces gastric spasm during upper endoscopy: a randomized, double-blind, double-dummy controlled trial*. *Gastrointest Endosc*, 2003. **57**(4): p. 475-82.
137. Leicester, R.J. and R.H. Hunt, *Peppermint oil to reduce colonic spasm during endoscopy*. *Lancet*, 1982. **2**(8305): p. 989.
138. May, B., S. Kohler, and B. Schneider, *Efficacy and tolerability of a fixed combination of peppermint oil and caraway oil in patients suffering from functional dyspepsia*. *Aliment Pharmacol Ther*, 2000. **14**(12): p. 1671-7.
139. Inamori, M., et al., *Early effects of peppermint oil on gastric emptying: a crossover study using a continuous real-time 13C breath test (BreathID system)*. *J Gastroenterol*, 2007. **42**(7): p. 539-42.
140. Dalvi, S.S., et al., *Effect of peppermint oil on gastric emptying in man: a preliminary study using a radiolabelled solid test meal*. *Indian J Physiol Pharmacol*, 1991. **35**(3): p. 212-4.
141. Grigoleit, H.G. and P. Grigoleit, *Peppermint oil in irritable bowel syndrome*. *Phytomedicine*, 2005. **12**(8): p. 601-6.
142. Cappello, G., et al., *Peppermint oil (Mintoil) in the treatment of irritable bowel syndrome: a prospective double blind placebo-controlled randomized trial*. *Dig Liver Dis*, 2007. **39**(6): p. 530-6.
143. Liu, J.H., et al., *Enteric-coated peppermint-oil capsules in the treatment of irritable bowel syndrome: a prospective, randomized trial*. *J Gastroenterol*, 1997. **32**(6): p. 765-8.
144. Kline, R.M., et al., *Enteric-coated, pH-dependent peppermint oil capsules for the treatment of irritable bowel syndrome in children*. *J Pediatr*, 2001. **138**(1): p. 125-8.
145. Amano, T., E. Richelson, and M. Nirenberg, *Neurotransmitter synthesis by neuroblastoma clones (neuroblast differentiation-cell culture-choline acetyltransferase-acetylcholinesterase-tyrosine hydroxylase-axons-dendrites)*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1972. **69**(1): p. 258-63.

146. Hoyer, D. and H.C. Neijt, *Identification of serotonin 5-HT<sub>3</sub> recognition sites in membranes of N1E-115 neuroblastoma cells by radioligand binding*. Mol Pharmacol, 1988. **33**(3): p. 303-9.
147. Lummis, S.C., G.J. Kilpatrick, and I.L. Martin, *Characterization of 5-HT<sub>3</sub> receptors in intact N1E-115 neuroblastoma cells*. Eur J Pharmacol, 1990. **189**(2-3): p. 223-7.
148. Neijt, H.C., I.J. te Duits, and H.P. Vijverberg, *Pharmacological characterization of serotonin 5-HT<sub>3</sub> receptor-mediated electrical response in cultured mouse neuroblastoma cells*. Neuropharmacology, 1988. **27**(3): p. 301-7.
149. Lambert, J.J., et al., *The properties of 5-HT<sub>3</sub> receptors in clonal cell lines studied by patch-clamp techniques*. Br J Pharmacol, 1989. **97**(1): p. 27-40.
150. Asfari, M., et al., *Establishment of 2-mercaptoethanol-dependent differentiated insulin-secreting cell lines*. Endocrinology, 1992. **130**(1): p. 167-78.
151. Barann, M., et al., *Increasing effect of ethanol on 5-HT<sub>3</sub> receptor-mediated <sup>14</sup>C-guanidinium influx in N1E-115 neuroblastoma cells*. Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol, 1995. **352**(2): p. 149-56.
152. Kubeczka, K.-H., *Vortrennung ätherischer Öle und ähnlich komplexer Stoffgemische für die GC-Analyse durch modifizierte Trockensäulenchromatographie*. Chromatographia, 1973. **6**: p. 106-8.
153. Riyazi, A., *Pharmakologische Untersuchungen zum antiemetischen Wirkungsmechanismus des ätherischen Öls von Ingwer (Zingiber officinale ROSCOE)*. 2006.
154. Kovats, E., *Retentionsindices aliphatischer Halogenide, Alkohole, Aldehyde und Ketone*. Helv. Chim. Acta., 1958. **41**: p. 1915-32.
155. Vandendool, H. and P.D. Kratz, *A Generalization Of The Retention Index System Including Linear Temperature Programmed Gas-Liquid Partition Chromatography*. J Chromatogr, 1963. **11**: p. 463-71.
156. Adams, R.P., *Identification of Essential Oil Components by Gas Chromatography / Mass Spectrometry*. 1995: Carol Stream, Illinois: Allured Publishing Corporation.
157. Millar, J.G., *Rapid and simple isolation of zingiberene from ginger essential Oil*. J Nat Prod, 1998. **61**(8): p. 1025-6.
158. Vollhardt K.P.C. and N.E. Schore, *Organische Chemie*. 2005, 4. Auflage.
159. Becker H.G.O., Berger W., and D. G., *Organikum*. 2001, 21. Auflage.
160. Bonisch, H., et al., *Characterization of 5-HT<sub>3</sub> receptors of N1E-115 neuroblastoma cells by use of the influx of the organic cation [<sup>14</sup>C]-guanidinium*. Br J Pharmacol, 1993. **108**(2): p. 436-42.
161. Reith, M.E., *[<sup>14</sup>C]guanidinium ion influx into Na<sup>+</sup> channel preparations from mouse cerebral cortex*. Eur J Pharmacol, 1990. **188**(1): p. 33-41.
162. Bylund, D.B. and M.L. Toews, *Radioligand binding methods: practical guide and tips*. Am J Physiol, 1993. **265**(5 Pt 1): p. L421-9.
163. Hales, C.N. and P.J. Randle, *Immunoassay of insulin with insulin-antibody precipitate*. Biochem J, 1963. **88**: p. 137-46.
164. van Beek, T.A. and G.P. Lelyveld, *Isolation and identification of the five major sesquiterpene hydrocarbons of ginger*. Phytochemical Analysis, 1991. **2**(1): p. 26-34.
165. Breeden, D.C. and R.M. Coates, *7-Epizingiberene, A Novel Bisabolane Sesquiterpene from Wild Tomato Leaves*. Tetrahedron, 1994. **50**(38): p. 11123-11132.
166. Reiser, G., K. Folkers, and B. Hamprecht, *Substance P enhances cation permeability of neuronal cell lines*. Regul Pept, 1982. **5**(1): p. 85-93.
167. Barann, M., et al., *Inhibition by anaesthetics of <sup>14</sup>C-guanidinium flux through the voltage-gated sodium channel and the cation channel of the 5-HT<sub>3</sub> receptor of N1E-115 neuroblastoma cells*. Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol, 1993. **347**(2): p. 125-32.
168. Barann, M., et al., *Inhibition by steroids of [<sup>14</sup>C]-guanidinium flux through the voltage-gated sodium channel and the cation channel of the 5-HT<sub>3</sub> receptor of N1E-115 neuroblastoma cells*. Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol, 1999. **360**(3): p. 234-41.

169. Yamada, J., Y. Sugimoto, and K. Inoue, *Selective serotonin reuptake inhibitors fluoxetine and fluvoxamine induce hyperglycemia by different mechanisms*. Eur J Pharmacol, 1999. **382**(3): p. 211-5.
170. Yamada, J., et al., *Effects of the non-selective 5-HT receptor agonist, 5-carboxamidotryptamine, on plasma glucose levels in rats*. Eur J Pharmacol, 1998. **359**(1): p. 81-6.
171. Chaouloff, F. and B. Jeanrenaud, *5-HT<sub>1A</sub> and alpha-2 adrenergic receptors mediate the hyperglycemic and hypoinsulinemic effects of 8-hydroxy-2-(di-n-propylamino)tetralin in the conscious rat*. J Pharmacol Exp Ther, 1987. **243**(3): p. 1159-66.
172. Akhani, S.P., S.L. Vishwakarma, and R.K. Goyal, *Anti-diabetic activity of Zingiber officinale in streptozotocin-induced type I diabetic rats*. J Pharm Pharmacol, 2004. **56**(1): p. 101-5.
173. Zawulich, W.S., G.J. Tesz, and K.C. Zawulich, *Are 5-hydroxytryptamine-preloaded beta-cells an appropriate physiologic model system for establishing that insulin stimulates insulin secretion?* J Biol Chem, 2001. **276**(40): p. 37120-3.
174. Goyal, R.K., et al., *Usefulness of 5-HT<sub>2A</sub> receptor antagonists for the treatment of cardiovascular complications in diabetes*, in *Atherosclerosis, hypertension and diabetes*, G.N. Pierce, et al., Editors. 2003, Kluwer Academic Publisher, Boston. p. 317-326.
175. Gong, F., Y.S. Fung, and Y.Z. Liang, *Determination of volatile components in ginger using gas chromatography-mass spectrometry with resolution improved by data processing techniques*. J Agric Food Chem, 2004. **52**(21): p. 6378-83.
176. Barann, M., et al., *Direct inhibition by cannabinoids of human 5-HT<sub>3A</sub> receptors: probable involvement of an allosteric modulatory site*. Br J Pharmacol, 2002. **137**(5): p. 589-96.
177. Mehta, A.K. and M.K. Ticku, *An update on GABA<sub>A</sub> receptors*. Brain Res Brain Res Rev, 1999. **29**(2-3): p. 196-217.
178. Arias, H.R., *Noncompetitive inhibition of nicotinic acetylcholine receptors by endogenous molecules*. J Neurosci Res, 1998. **52**(4): p. 369-79.
179. Arias, H.R., et al., *Molecular mechanisms and binding site location for the noncompetitive antagonist crystal violet on nicotinic acetylcholine receptors*. Biochemistry, 2006. **45**(7): p. 2014-26.
180. Rai, S., et al., *Determination of 6-gingerol in ginger (Zingiber officinale) using high-performance thin-layer chromatography*. J Sep Sci, 2006. **29**(15): p. 2292-5.
181. Kadnur, S.V. and R.K. Goyal, *Beneficial effects of Zingiber officinale Roscoe on fructose induced hyperlipidemia and hyperinsulinemia in rats*. Indian J Exp Biol, 2005. **43**(12): p. 1161-4.
182. Ojewole, J.A., *Analgesic, antiinflammatory and hypoglycaemic effects of ethanol extract of Zingiber officinale (Roscoe) rhizomes (Zingiberaceae) in mice and rats*. Phytother Res, 2006. **20**(9): p. 764-72.
183. Islam, M.S. and H. Choi, *Comparative effects of dietary ginger (Zingiber officinale) and garlic (Allium sativum) investigated in a type 2 diabetes model of rats*. J Med Food, 2008. **11**(1): p. 152-9.
184. Bhandari, U., R. Kanojia, and K.K. Pillai, *Effect of ethanolic extract of Zingiber officinale on dyslipidaemia in diabetic rats*. J Ethnopharmacol, 2005. **97**(2): p. 227-30.
185. Al-Amin, Z.M., et al., *Anti-diabetic and hypolipidaemic properties of ginger (Zingiber officinale) in streptozotocin-induced diabetic rats*. Br J Nutr, 2006. **96**(4): p. 660-6.
186. Hasenohrl, R.U., et al., *Anxiolytic-like effect of combined extracts of Zingiber officinale and Ginkgo biloba in the elevated plus-maze*. Pharmacol Biochem Behav, 1996. **53**(2): p. 271-5.
187. Hellman, B., et al., *Transport and storage of 5-hydroxytryptamine in pancreatic - cells*. Biochem Pharmacol, 1972. **21**(5): p. 695-706.
188. Gylfe, E., *Association between 5-hydroxytryptamine release and insulin secretion*. J Endocrinol, 1978. **78**(2): p. 239-48.

- 
189. Deeney, J.T., et al., *3H-serotonin as a marker of oscillatory insulin secretion in clonal beta-cells (INS-1)*. FEBS Lett, 2007. **581**(21): p. 4080-4.
  190. Galeotti, N., et al., *Local anaesthetic activity of (+)- and (-)-menthol*. Planta Med, 2001. **67**(2): p. 174-6.
  191. Galeotti, N., et al., *Menthol: a natural analgesic compound*. Neurosci Lett, 2002. **322**(3): p. 145-8.
  192. Haeseler, G., et al., *Voltage-dependent block of neuronal and skeletal muscle sodium channels by thymol and menthol*. Eur J Anaesthesiol, 2002. **19**(8): p. 571-9.

# DANKSAGUNG

Ich möchte mich an erster Stelle ganz herzlich bei meinem „Doktorvater“ Herrn Prof. Dr. Eugen J. Verspohl für die Überlassung des Promotionsthemas und die hervorragende Betreuung während meiner Promotionszeit bedanken. Für Diskussionen und bei Problemstellungen stand er jederzeit hilfsbereit zur Verfügung. Mit Filmbeiträgen zu seinen Reisen, einem nigerianischen Abend und einer Segway-Tour durch Münster hat er meine Promotionszeit neben der beruflichen Begleitung zusätzlich bereichert.

Ganz besonders möchte ich meinem Arbeitskreis für eine sehr schöne Zeit danken. Ihr habt mit vielen guten Ratschlägen und Hilfestellungen vor allem beim „Absaugen“ in den Zellversuchen zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen. Wir sind eben die Besten! Ich hoffe, dass die Freundschaften, die ich während dieser Zeit schließen konnte, auch nach meiner Promotion bestehen bleiben. Jonas, Corinna und Julia danke ich außerdem für das Korrekturlesen.

Am Institut für Pharmazeutische und Medizinische Chemie und am Institut für Pharmazeutische Biologie und Phytochemie möchte ich mich bei allen Mitarbeitern bedanken, die mich durch ihre Mitarbeit unterstützt haben. Im Besonderen gilt mein Dank Prof. Dr. A. Hensel, der es mir ermöglichte, die chromatographischen Isolierungen in seinem Institut durchzuführen und der mir bei Sperrung unserer Räume einen eigenen Arbeitsplatz verschaffte. Bedanken möchte ich mich außerdem bei Herrn Dr. Matthias Lechtenberg, Herrn Dr. Frank Petereit und Frau Ursula Liefländer-Wulf, die mir in analytischen und phytochemischen Fragestellungen immer ein großes Stück weitergeholfen haben. Bei Herrn Dr. J. Fabian bedanke ich mich für die Unterstützung bei der Isolierung des  $\alpha$ -Zingiberens.

Meinen Wahlpflichtfach-Studenten Sonja Reidegeld, Nina-Kim Ottenjann, Florian Hauk und Birte Alhorn danke ich für die tatkräftige Unterstützung, ihr Interesse und das Einbringen eigener Ideen in die Projekte.

Bei meiner Mutter möchte ich mich dafür bedanken, dass sie mir diese Ausbildung erst ermöglicht hat. Mit Deinem unglaublichen Kampfgeist, Deiner positiven Lebenseinstellung und viel Verständnis hast Du die Grundlage für diese Arbeit geschaffen. Meine Geschwister haben mich ebenso in den letzten Jahren tatkräftig unterstützt. Auch Euch danke ich für den Rückhalt, den Ihr mir während meiner gesamten Ausbildung gegeben habt.

Bei meinem Freund Michael bedanke ich mich für seine Unterstützung, viel Verständnis und sein unermüdliches Korrekturlesen, das der Arbeit den letzten Schliff gegeben hat. Dass ich Dich während der Promotion kennenlernen durfte, trägt für mich zur Bedeutung dieser Arbeit bei.

