

Forschungsbericht

über die

**Untersuchungen zu den Wirkungen von
wässrigem Torfextrakt aus Badetorf der Bäder
Bad Kohlgrub und Bad Bayersoien auf die
spontane kontraktile Aktivität der glatten
Muskeln**

ANDRÉ-MICHAEL BEER, JULIAN LUKANOV & PLAMEN SAGORTCHEV

November 2004

Inhaltsverzeichnis

- 1 Einführung in die Thematik (S. 3-9)
- 2 Einleitung (S. 10)
- 3 Material und Methodik (S. 11-21)
 - 3.1 Herstellung verschiedener Torffractionen (S. 11-14)
 - 3.2 Herstellung der Fraktionen der Fulvin-, Ulmin- und Huminsäuren aus Torf (S. 15-17)
 - 3.3 Verwendete Substanzen (S. 17)
 - 3.4 Messung der spontanen kontraktilen Aktivität der glatten Muskulatur (S. 18-21)
- 4 Versuchsergebnisse (S. 22-63)
 - 4.1 Wirkungen der wässrigen Torfextrakte WEMP I, II und III auf die spontane kontraktile Aktivität glatter Muskelstreifen (S. 22-34)
 - 4.2 Wirkungsmechanismus der anregenden Wirkungen der WEMP's von Bad Kohlgrub und Bad Bayersoien auf die spontane Kontraktilität glatter Muskelstreifen (S. 34-39)
 - 4.3 Isolierung von Fulvin- und Ulminsäuren aus dem Torf, der in Bad Kohlgrub und Bad Bayersoien für medizinische Ziele eingesetzt wird (S. 39-59)
 - 4.4 Untersuchungen mit längerfristige Einwirkzeiten wässriger Extrakte der Moorproben I, II und III und der aus ihnen isolierten Fulvin- und Ulminsäuren (S. 60-63)
- 5 Schlussfolgerungen (S. 64)
- 6 Anhang (S. 65-71)
 - 6.1 Der Einfluss der Temperatur bei der Zubereitungstechnologie von Badetorf
 - 6.2 Der Einfluss des Verdünnungsmediums bei der Zubereitung von Badetorf: Vergleich zweier Moorproben

1 Einführung in die Thematik

Untersuchungen zu den Eigenschaften von biologisch aktiven Substanzen (BAS) mittels glatter Muskelstreifen (GMS) (in vitro) stellen eine weitverbreitete Methode in der experimentellen Pharmakologie der Arzneimittelforschung dar. Vergleichbar jeder anderen analytischen Methodik hat sie auch ihre Besonderheiten und Anwendungsgrenzen, die berücksichtigt werden müssen, um fehlerbehaftete oder nicht eindeutige Aussagen zu vermeiden. Wir wollen daher einige der Besonderheiten dieser Methodik im Vorfeld darstellen, die in einem engen Kontext zu unseren Untersuchungen stehen.

Entnahmeorte der glattmuskulären Präparate

Glatte Muskelstreifen (GMS) besitzen im Hinblick auf ihre spontane kontraktile Aktivität (SKA) nicht nur organspezifische Besonderheiten, sondern lassen auch Unterschiede in den verschiedenen Arealen ein und desselben Organs erkennen. So verstärkt sich beispielsweise die tonische Komponente der SKA von GMS aus der Fundusregion des Meerschweinchenmagens unter Einwirkung von Acetylcholin (Ach), während die phasischen Komponenten der SKA nahezu unbeeinflusst bleiben. Bei GMS aus der Corpusregion hingegen sind beide Komponenten beeinflusst, und bei den GMS der Antrumregion kommt es vor allem zu einer Wirkung auf die Frequenz und Amplitude der SKA (Abbildung 1).

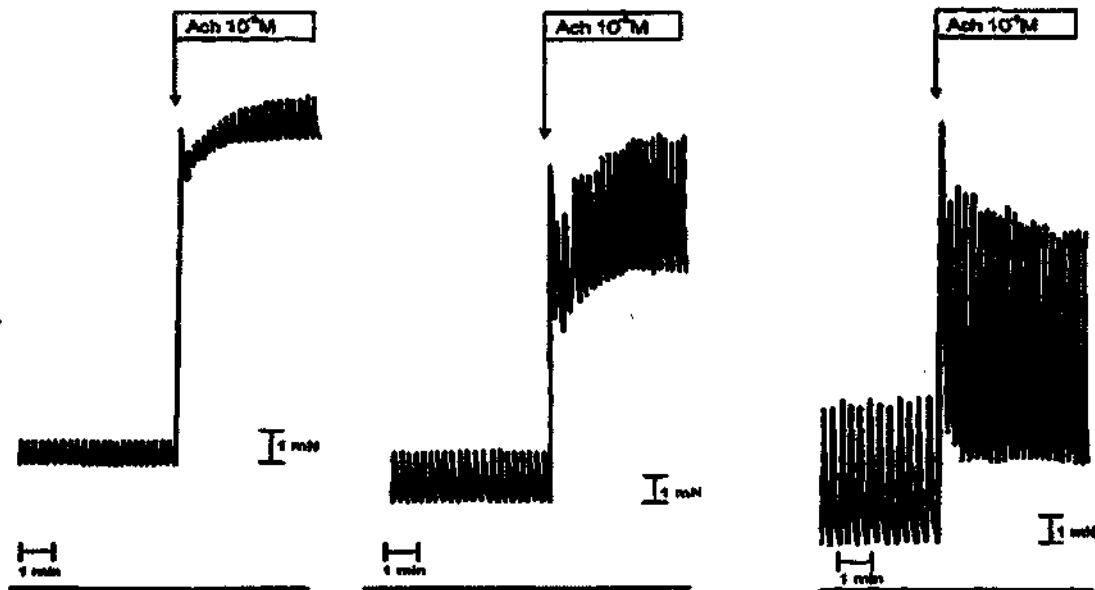


Abb. 1: Messungen in den unterschiedlichen Magenarealen

- Einflussfaktoren auf die Kontraktilität glatter Muskelstreifen

Glatte Muskelstreifen können in ein- und demselben Areal eine unterschiedlich ausgeprägte SKA aufweisen und eine unterschiedliche Auslenkung nach Zugabe von Acetylcholin (ACh) zeigen. Dies hängt mit verschiedenen Faktoren zusammen wie u.a. von der Schnittführung entlang den Muskelfasern, der Präparatlänge und -dicke und dem jeweiligen hormonellen Zustand der Versuchstiere. Diese Faktoren bestimmen die Synchronisierung der SKA der glatten Muskelzellen (GMZ), die das Ausmaß der Reaktion bestimmt.

Letztere ist von der Zahl der Bindungen (sog. Nexus) zwischen den GMZ abhängig. Einige Substanzen supprimieren (u.a. Progesteron, PGE_2), andere verstärken die Nexusbildung (u.a. Estradiol, $PGF_{2\alpha}$).

Um trotz dieser Einflussfaktoren vergleichbare Messergebnisse zu erzielen, wird regelmäßig eine Eichung auf die maximale kontraktile Aktivität [%] unter Einwirkung von 10^{-5} M ACh auf die SKA der GMS als 100 % vorgenommen (Abb. 2).

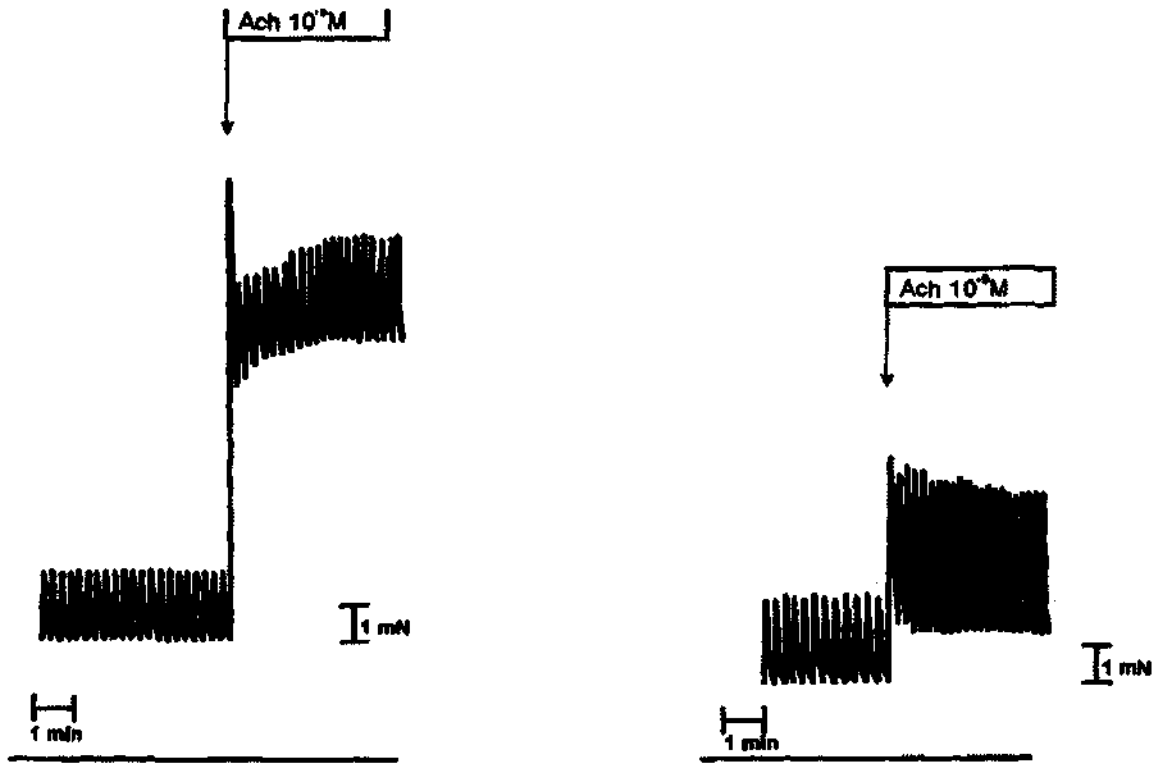


Abb. 2: Eichung auf die maximale kontraktile Aktivität [%] unter Einwirkung von 10^{-5} M Ach auf die SKA der GMS

- **Besonderheiten, die sich aus dem Rezeptorenbesatz und der -dichte ergeben**

Im Prinzip besitzen glatte Muskelzellen Rezeptoren für fast alle Mediatoren und BAS, da sie u.a. ein phylogenetisch sehr altes Gewebe sind. In verschiedenen Organen und Organarealen werden aber sehr deutliche Unterschiede gemessen. In den GMS vom Corpusteil des Meerschweinchenmagens findet man Präparate mit einem sehr geringen oder fehlenden α - oder β - Adreno-Rezeptorenbesatz. Das gilt auch für D_2 - Dopaminrezeptoren.

Abbildung 3 zeigt GMS, die bei einer Einwirkung von α - und β - Adrenoagonisten keine Änderungen der SKA gezeigt haben.

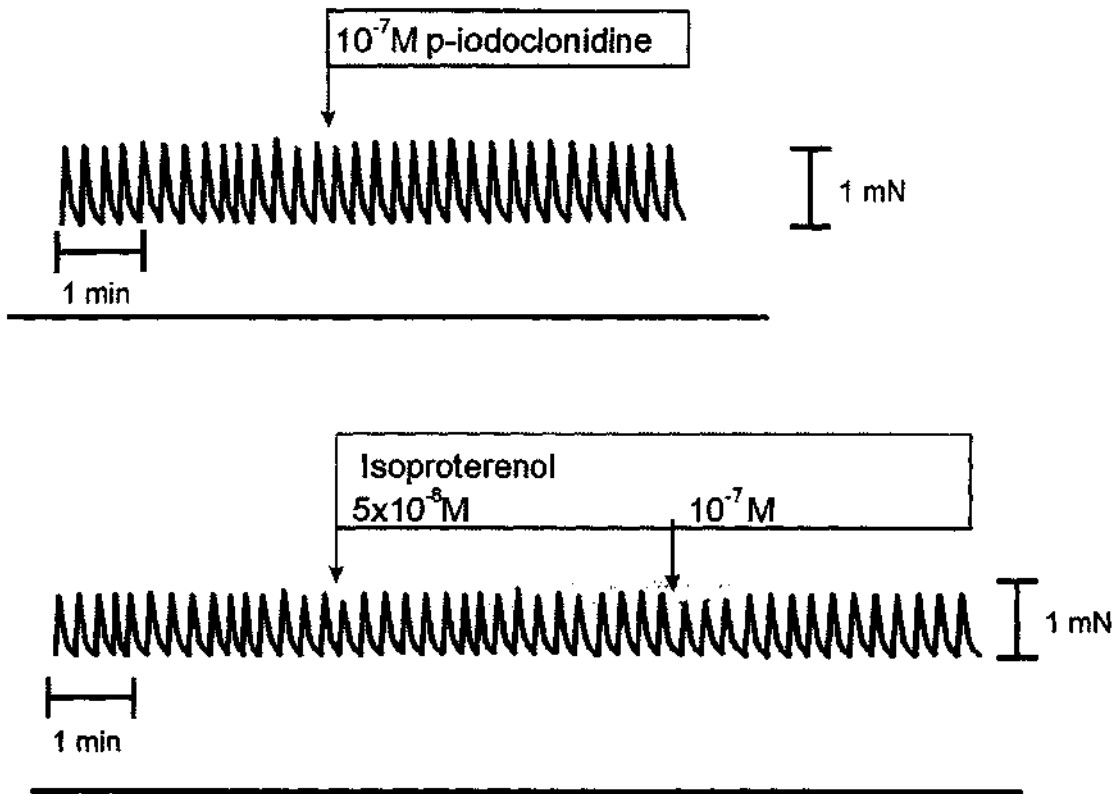


Abb. 3: Einwirkung von α - und β -Adrenoagonisten auf die glatten Muskelstreifen

- **Besonderheiten in der Art des Zusammenwirkens zwischen Rezeptor und Agonist**

Die Reaktivität der Rezeptoren ist von der Konzentration und der Einwirkzeit des Agonisten abhängig. Am besten untersucht ist dies bei den β -Adrenorezeptoren. Die Bindung von Rezeptor und Agonist führt zu Konformationsänderungen am Rezeptor. Die damit eingeleitete Freisetzung von G-Proteinen setzt die Effekte der Agonisten um. Gleichzeitig werden die Konformationsänderungen von einer Proteinart, die nach ihrem Wirkungsmechanismus als Rezeptorkinasen bezeichnet werden, erkannt. Diese phosphorylieren eine Rezeptorpolypeptidkette und verhindern damit die Bindung des Agonisten an den Rezeptor. Dies ermöglicht die Bindung einer weiteren Proteingruppe, die entsprechend ihres Wirkungsmechanismus als sog. „Arestine“ bezeichnet wird, an den phosphorylierten Rezeptor und ermöglicht somit die Endozytose in die Zelle mittels Einschleussung dieser Komplexe in die Vakuolen der Membranen. Im Zellinneren löst sich die Bindung aufgrund des niedrigen pH-Wertes, wobei es zur Freisetzung der

Agonist-Rezeptor-Arestin-Komplexe kommt. Es kommt zur Dephosphorylierung des Rezeptors und in Folge zu seiner Exprimierung an der Membranoberfläche. Mit hoher Wahrscheinlichkeit gibt es vergleichbare Prozesse auch bei den α_2 Adreno- und teilweise auch bei den D₂ Dopaminrezeptoren. Bei langfristigen Einwirkzeiten von Agonisten auf die glatten Muskelfasern wird eine abnehmende Aktivierung der Rezeptoren registriert. Abbildung 4 zeigt dies bei einer längerfristigen Einwirkzeit von α_2 - und D₂-Agonisten und im Vergleich auch zu wässrigem Torfextrakt (WTE), der ebenfalls diese zwei Rezeptorenarten agonistisch beeinflusst. Die Abbildung zeigt, dass nach einer 93-minütigen Einwirkzeit die Reaktivität der α_2 -Adrenorezeptoren zu 100% gehemmt ist. Die Reaktivität der D₂-Rezeptoren jedoch ist, obwohl stark reduziert (6-7 mal), auch noch nach 303 Minuten messbar.

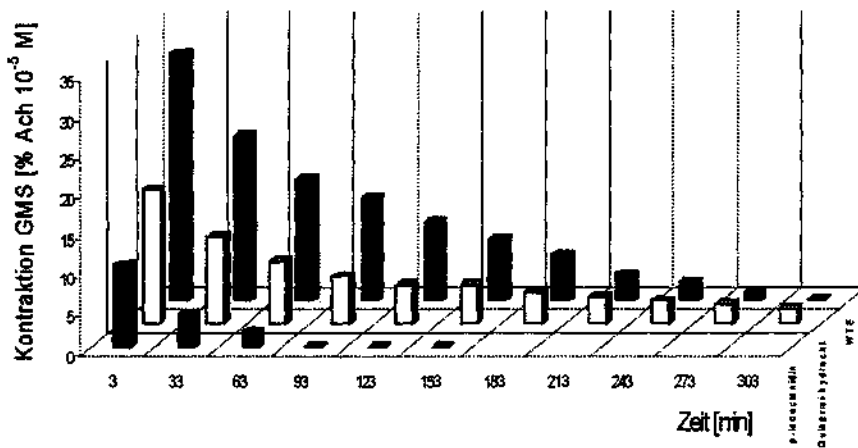


Abb. 4: Wiederholte Wirkungen von α_2 Adrenoagonisten (■ - 10^{-7} M p-Iodoclonidin), D₂ Dopaminagonisten (□ - 10^{-5} M Quinpirol-dihydrochlorid) und wässrigem Torfextrakt (WTE) (150 μ l WTE ■) über einen längeren Zeitraum auf die spontane kontraktile Aktivität der glatten Muskelstreifen

Diese Effekte von α_2 -Adrenorezeptoren sind zudem von der Konzentration der Agonisten abhängig (Abb.5)

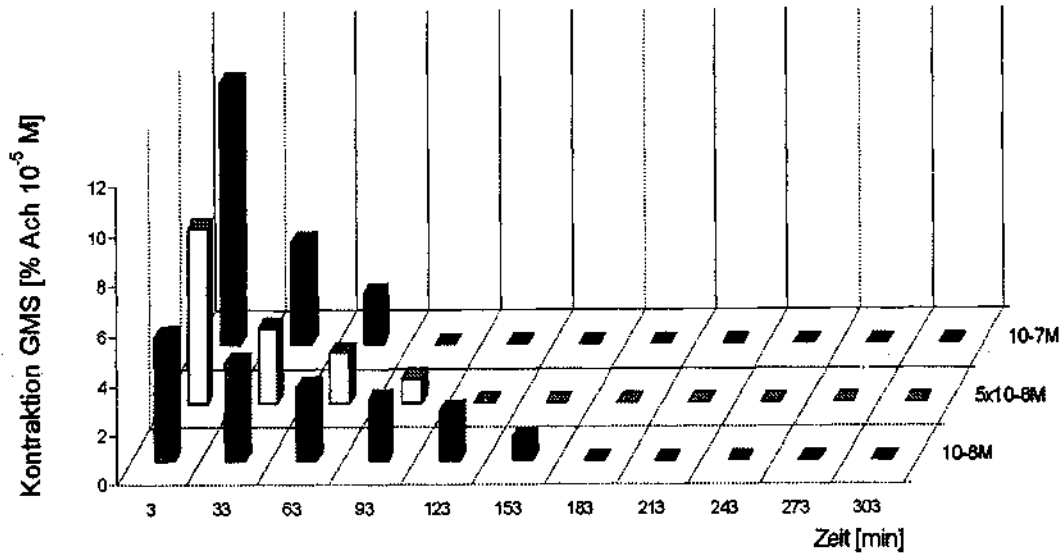


Abb. 5: Langfristige Einwirkung verschiedener Konzentrationen von p-Iodoclonidin: □ 10⁻⁸ M; ■ 5x10⁻⁸ M; ■ 10⁻⁷ M

Dass bei endogenen Agonisten (z.B. Noradrenalin) dasselbe Bild beobachtet werden kann, ist der Abbildung 6 zu entnehmen.

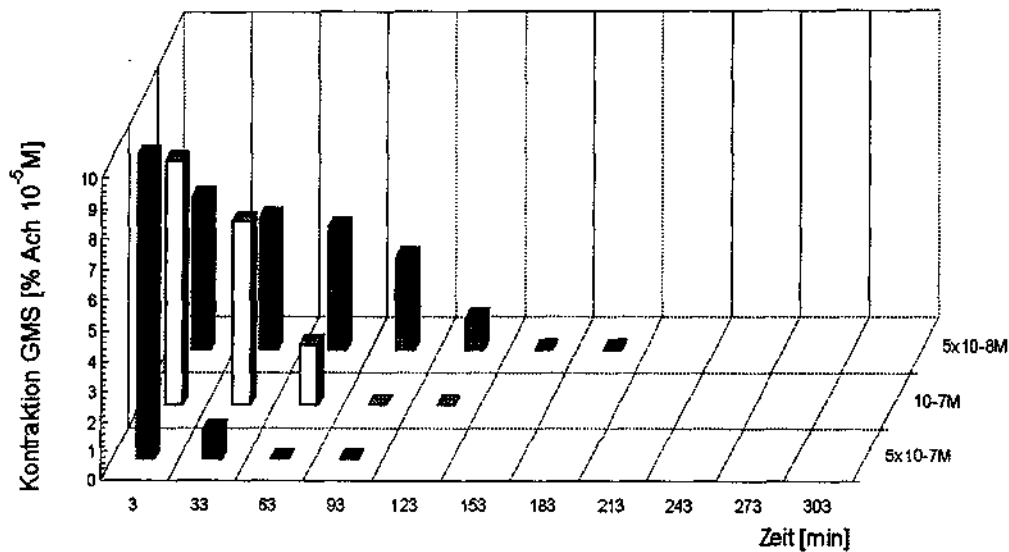


Abb. 6: Langfristige Einwirkung verschiedener Konzentrationen von L-Noradrenalin: ■ 5x10⁻⁸ M; □ 10⁻⁷ M; ■ 5x10⁻⁷ M

Die dargestellten Prozesse erschweren zwar eine genauere Definition der pharmakologischen Eigenschaften einiger BAS, ermöglichen uns aber die nähere Identifizierung der BAS ihrer Wirkungsart nach.

2 Einleitung

Die klinische Anwendung von Torf und Torfprodukten stellt die berechtigte Frage nach dem Vorhandensein von Qualitätskriterien bei der medizinischen Nutzung von Torf. Seine thermische Wirkung gilt als gut untersucht; sie hat und zeigt eindeutige klinische Effekte. Die von ihrer Herkunft und von der chemischen Zusammensetzung unterschiedlichen Torfarten unterscheiden sich jedoch nicht wesentlich in ihren thermischen Wirkungen. Die chemischen Wirkungen hingegen sind bislang nur sehr wenig erforscht. Dazu gehören u.a. die antibakteriellen und antiviralen Wirkungen sowie die anregenden Wirkungen auf die spontane kontraktile Aktivität (SKA) der glatten Muskulatur (gM). Da Torffractionen Multisubstanzgemische mit unterschiedlichen Molekulargewichten und Eigenschaften darstellen, haben wir die Wirkung von wässrigem Torfextrakt auf die spontane kontraktile Aktivität glatter Muskulatur, einen speziellen Wirkungsbereich von Torf, der von thermischen Effekten unabhängig ist, als Modell für unsere Untersuchungen ausgewählt. Wir können daran zeigen, dass vor allem niedermolekulare organische Substanzen (<1000 Dalton) für die Wirkung verantwortlich zu machen sind. Diese aktivieren die α_2 -Adreno- und D₂-Dopaminrezeptoren, wobei diese Wirkung bei verschiedenen Torfarten unterschiedlich ausgeprägt ist.

Von besonderer Bedeutung für die biologische Wirkung von Torf sind die in ihm enthaltenen, in ihrer Zusammensetzung noch nicht ausreichend bekannten organischen Fulvin (FS)-, Ulmin (US)- und Huminsäuren (HS). Ein Teil dieser Säuren ist wasserlöslich. Die genannten Fraktionen zeigen bereits in ng/ml (10^{-8} g) Konzentrationen eine biologische Aktivität auf die SKA der glatten Muskelstreifen (GMS).

An diesem Modell konnten wir auch zeigen, dass Faktoren wie z.B. die Lagerung, die Konsistenz und die technischen Zubereitungsmethoden von Badetorf, die biologische Aktivität des Torfs beeinflussen können. Verschiedene Heilbäder bereiten beispielsweise seit vielen Jahrzehnten Badetorf mit Mineralwasser auf. Bis heute gibt es jedoch noch keine einheitlichen, international anerkannten Kriterien zur Abschätzung der biologischen Aktivität von Torf im Bezug auf seine medizinische Verwendung. Lediglich allgemeine, praxisbezogene Maßstäbe werden zur Grunde gelegt, wie z. B. die Quentinsche Schriftprobe und Peloidanalysen.

In den vorliegenden Untersuchungen werden die biologischen Aktivitäten der wässrigen Torfextrakte, hergestellt aus den Badetorfen der Bäder Bad Kohlgrub und Bad Bayersoien, untersucht.

3 Material und Methodik

Bei den durchgeführten Untersuchungen wurde Torf von dreierlei unterschiedlichen Stichstellen in den Mooren untersucht. Der Torf wurde zum einen mit Wasser von den Quellen I und II und zum anderen mit Wasser von der Quelle III für die Untersuchungen verdünnt. Bei den Moorproben I und II handelt es sich somit um Torfbrei, der sich aus zwei verschiedenen Torfstichen unterschiedlicher Herkunft aus Bad Kohlgrub zusammensetzt, verdünnt mit den Wässern der Quellen I und II. Bei der Moorprobe III handelt es sich um Torfbrei, vorbereitet aus Torf des Stichortes III (Bad Bayersoien), verdünnt mit Wasser von Quelle III.

3.1 Herstellung verschiedener Torffractionen

Aufgrund des hohen Wassergehaltes von über 90% wurden die wässrigen Extrakte aus Torfbrei aller Proben ohne vorherige Verdünnung hergestellt. Nach 24-stündiger Temperierung bei 25° C wurden 20 g Torfbrei über 20 Minuten zentrifugiert (3000 x g, Temperatur 25° C, Laborzentrifuge 400R, Fa. Heraeus Instr., Hanau). So wurden 3 unterschiedliche wässrige Extrakte hergestellt. WEMP I und WEMP II entsprechen den Torfstichen I und II und WEMP III, hergestellt aus dem Torf von Torfstich III verdünnt mit Wasser der Quelle III (Abb. 7).

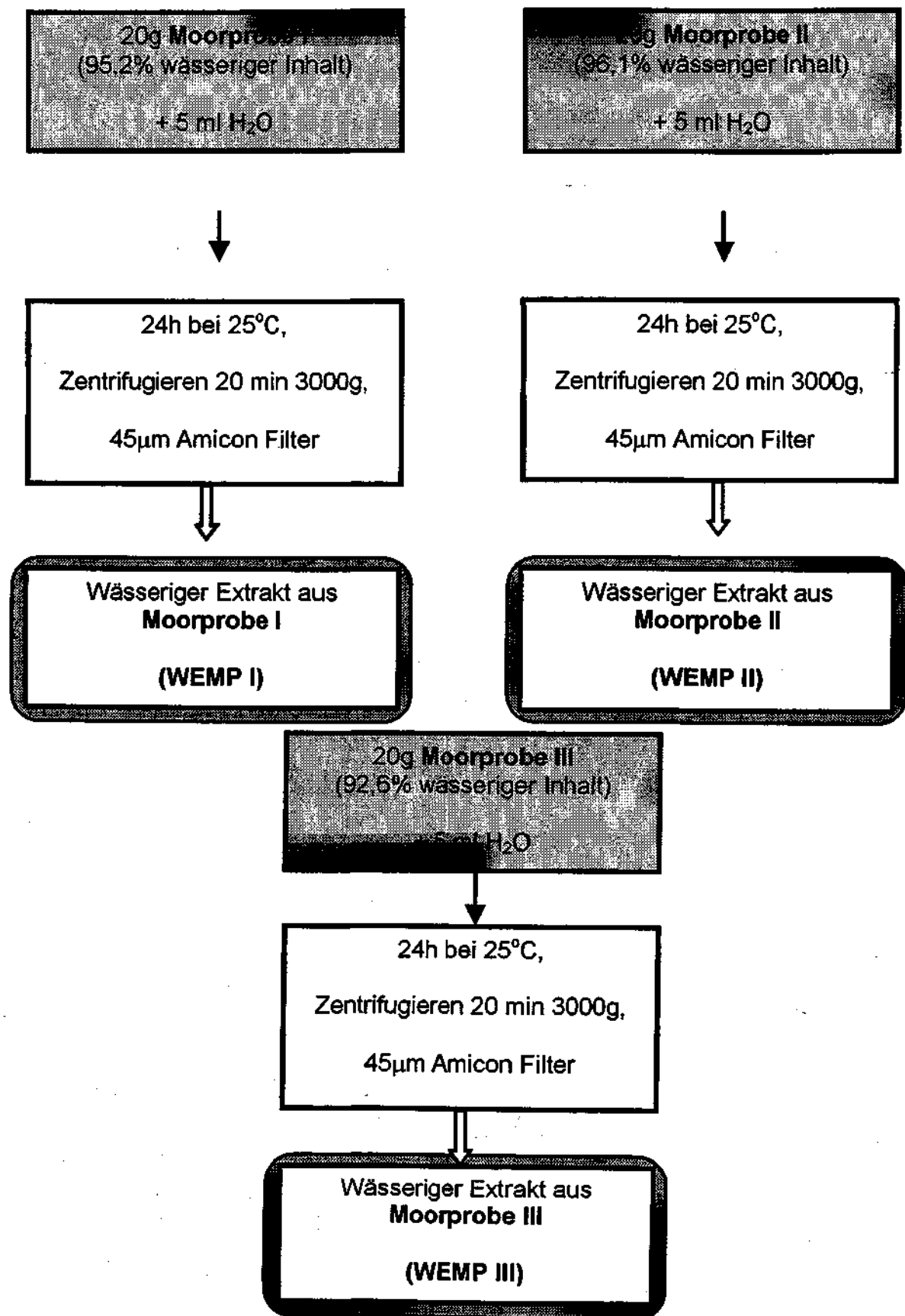


Abb. 7: Herstellung von Extrakten aus Moorprobe I, Moorprobe II und Moorprobe III

Um einen Vergleich bezüglich der biologischen Aktivitäten der untersuchten Proben mit den biologischen Aktivitäten anderer Torfarten zu ermöglichen, wurde der Wassergehalt der Moorproben I, II und III bis zu 85% reduziert. Diese Wasserreduktion erfolgt unter Bestimmung der Inhalte der wasserlöslichen Substanzen in den wässrigen Extrakten mit Hilfe eines Lyophilisators (Freeze dryer Alpha-4; Fa. Christ, Osterode im Harz). Die Verfahren sind in den Abbildungen 8, 15 und 16 dargestellt.

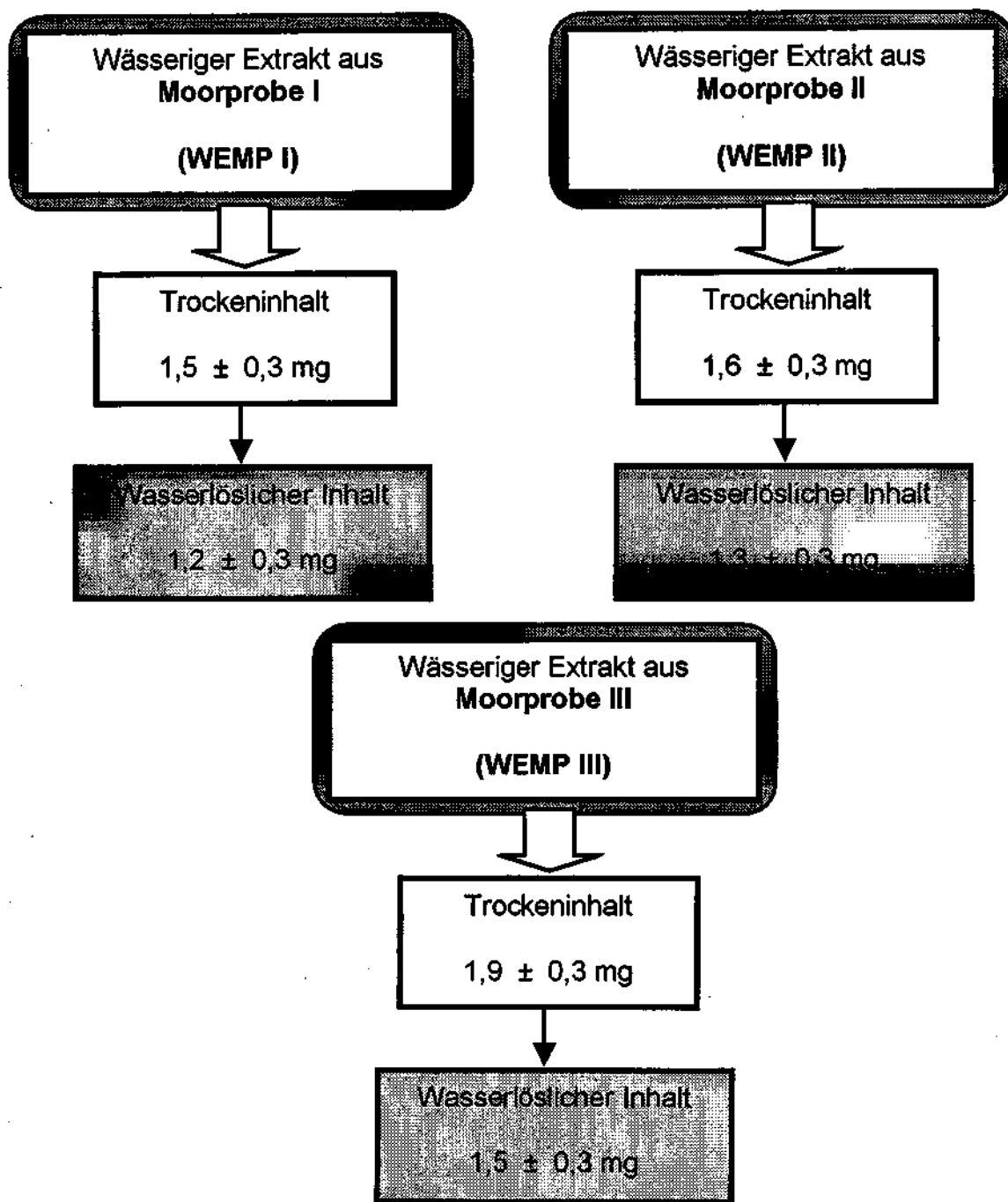


Abb. 8: Bestimmung der Konzentrationen der wasserlösliche Komponenten aus wässrigen Extrakten der Moorproben I, II und III.

3.2 Herstellung der Fraktionen der Fulvin-, Ulmin- und Huminsäuren aus Torf

Man unterscheidet verschiedene Gruppen von Huminsubstanzen nach ihrer Löslichkeit:

- Fulvinsäuren (FS) sind in alkalischen Medien und Säuren löslich.
- Ulminsäuren (US) sind in alkalischen Medien und Ethanol löslich, in saurem Milieu unlöslich.
- Huminsäuren (HS) sind in Wasser schwer löslich, aber im alkalischen Milieu löslich.

Der in Abbildung 8, 15, 16 dargestellte Trennungsvorgang wird im Folgenden beschrieben:

- Schritt 1: Gewinnung von Trockentorf

In die Kammer des Lyophilisators (Freeze dryer Alpha-4; Fa. Christ, Osterode im Harz) wird eine Petrischale mit 50 g dünn ausgestrichenem Torf eingebracht. Nachdem die Probe bis 1° C abgekühlt ist, verdampft das Wasser bei einem Druck von 63 N/m² (0,63 mbar) über einen Zeitraum von 48 Stunden.

Die daraus resultierende, getrocknete, hellbraune, brüchige Torfmasse wird in verschlossenen Reagenzgläsern aufbewahrt (Vacutainer, Fa. B-D, USA).

- Schritt 2: Gewinnung von alkalischem Extrakt aus Trockentorf

100 ml von 2,5x10⁻² M Natriumhydroxyd (NaOH) (pH 12,7) werden mit 1000 mg Trockentorf gemischt. Nach 10-minütigem Rühren ergibt sich eine kolloidale Lösung von dunkelbrauner Farbe, die 15 Minuten zentrifugiert wird (1000 x g; 25° C). Der Überstand enthält den alkalischen Torfextrakt mit Fulvin-, Ulmin- und Huminsäuren).

- Schritt 3: Gewinnung der Huminfraktion aus dem Torf

Der Bodensatz des in Schritt 2 erhaltenen Zentrifugates wird dreimal mit 1000 ml destilliertem Wasser gewaschen und im Anschluss daran 15 Minuten zentrifugiert (1000 x g; 25° C). Der gewonnene braun-schwarze Bodensatz stellt die Fraktion der im Torf enthaltenen Humine dar. Er wird bei einem Druck von 0,63 mbar (63 N/m²) über 24 Stunden bei 1° C lyophilisiert. Nach dem Wiegen (Analysewaage AC211S;

Fa. Sartorius) wird er in verschlossenen Reagenzgläsern aufbewahrt (Vacutainer, Fa. B-D, USA).

- Schritt 4: Gewinnung der Fulvinsäurefraktion aus Torf

Der alkalische Torfextrakt wird mit Salzsäure (HCl) so lange gemischt, bis eine Lösung mit pH 1 entsteht. Nach der Zentrifugation (1000 x g; 25° C) wird der Bodensatz für den nächsten Extraktionsvorgang (Schritt 5) aufbewahrt. Das Filtrat wird bei einem Druck von 0,63 mbar (63 N/m²) über 48 Stunden bei 1° C lyophilisiert. Auf diesem Wege werden aus dem Torf die gelb-braunen Fulvinsäuren gewonnen.

- Schritt 5: Gewinnung der Humin- und Ulminsäurefraktionen aus Torf

Der in Schritt 4 erhaltene Bodensatz wird nach der Zugabe von Salzsäure zum alkalischen Torfextrakt (Lösung mit pH 1) dreimal mit Wasser gewaschen. Nach der Zugabe von Ethanol und 10-minütigem Rühren bei 2000 Umdrehungen (U) pro Minute (Shaker, Fa. Braun) wird 15 Minuten zentrifugiert (1000 x g; 25° C). Der Überstand wird filtriert und über 48 Stunden bei 1° C lyophilisiert (Druck: 63 N/m² (0,63 mbar). Es entstehen die rosa-braunfarbenen Ulminsäuren aus dem Torf. Erfolgt die Lyophilisierung des Bodensatzes unter gleichen Bedingungen, aber über einen Zeitraum von 24 Stunden, so entstehen die braun-schwarzen Huminsäuren.

- Schritt 6:

Zur Durchführung der Untersuchungen an der glatten Muskulatur mit den gewonnenen Fulvin-, Ulmin- und Huminsäuren werden nach dem Abwiegen mittels Analysenwaage wässrige Lösungen mit jeweils 5 ml Wasser vorbereitet. Jede Lösung wird über 15 Minuten zentrifugiert (1000 x g; 25° C). Die im Bodensatz enthaltenen wasserunlöslichen Substanzen werden nach der Lyophilisierung mit der Analysenwaage abgewogen, um eine Aussage über das Verhältnis der wasserlöslichen und wasserunlöslichen Komponenten zu erhalten. Die wässrigen Lösungen werden gefiltert und anschließend bei Zimmertemperatur in verschlossenen Reagenzgläsern (5ml) aufbewahrt (Vacutainer, Fa. B-D, USA).

- Schritt 7:

Nach der Lyophilisierung und dem Abwiegen werden aus ca. 50 % der erhaltenen Lösungen die Mengen der wasserlöslichen Komponenten für die Fulvin-, Ulmin- und Huminsäuren bestimmt.

3.3 Verwendete Substanzen

In den in-vitro-Untersuchungen werden folgende Agonisten und Antagonisten (Fa. Sigma, St. Louis, MO, USA) benutzt:

Selektiver Antagonist von D₂ Dopaminrezeptoren: Raclopride (S(-) Raclopride L-tartrate)

D₁/D₂ Antagonist: Thiothixene hydrochloride (N,N-Dimethyl-9-(3-[4-methyl-1-piperazinyl]-propylidene) thioxanthene-2-sulfonamide)

α_2 -Antagonist: Benextramine tetrahydrochloride (Dithiobis(N-[N-(2-methoxybenzyl)-6-aminoethyl]-2-aminoethane);N,N'-bis(6-[o-Methoxybenzylamino]hexyl) cystamine)

α_2 -Agonist: p-Iodoclonidine hydrochloride (2-[(2,6-Dichloro-4-iodophenyl)imino]imidazoline hydrochloride)

Dopamin₂ Agonist: Quinpirol-dihydrochlorid (LY-141,865; trans-(±)-4, 4a, 5, 6, 7, 8, 8a, 9-Octahydro-5-propyl-1H-pyrazolo(3,4-g) quinoline)

Acetylcholinchloride (Ach) (Acetylcholinum ophtalmicum dispersa^R, Fa. Dispersa, Germering)

3.4 Messung der spontanen kontraktiven Aktivität der glatten Muskulatur

Die Messungen erfolgten nach standardisierter Methode (GOLENHOFEN 1976; GOLENHOFEN 1976; GOLENHOFEN 1978; GOLENHOFEN 1983).

- Präparation

Die in den Versuchen verwendeten Präparate glatter Muskulatur werden dem Magen, Uterus und der Vena portae des Meerschweinchens entnommen. Die Muskelstreifen vom Magen haben eine Länge von 12-14 mm und eine Breite von 1-2 mm und entstammen dem Corpus- und Antrumbereich des Magens. Nach der Laparotomie wird der Magen in eine mit Präparierlösung gefüllte Schale gelegt und zunächst unter Spülen mit der Präparierlösung grob von Fett- Bindegewebsresten und Koageln gereinigt. Dann erfolgt die Präparation der muskulären Streifen mittels Lupenbrille, Pinzetten und Iridektomieschere in zirkulärer Richtung, ausgehend von der Serosa entlang der großen Krümmung, möglichst in Verlaufsrichtung der Fasern. Dabei werden sämtliche Arbeitsschritte unter kontinuierlicher Spülung mit der Präparierlösung durchgeführt, um eine mögliche Austrocknung des Organs zu verhindern.

Die auf diese Weise erhaltenen Muskelstreifen werden an beiden Enden mit einem Faden angeschlungen.

Bis zum Versuchsbeginn werden die so gefertigten muskulären Streifenpräparate in auf 4° bis 6° C gekühlter Präparierlösung aufbewahrt.

- Versuchslösungen

Um die Muskelpräparate vor Austrocknung zu schützen und ihre Funktionalität während der langen Versuchszeiten aufrecht zu erhalten, werden Präparier- bzw. Krebslösungen verwendet.

Die Präparierlösung dient dem Transport des Versuchsmaterials, der Reinigung und der Präparation. Die Präparierlösung setzt sich folgendermaßen zusammen (mmol/l): Na⁺ 143; K⁺ 5,8; Ca²⁺ 3,7; Cl⁻ 156,2.

Die Organbäder enthalten die Krebslösung mit folgender Zusammensetzung (mmol/l): Na⁺ 143; K⁺ 5,94; Mg²⁺ 1,19; Ca²⁺ 2,5; Cl⁻ 133; HCO⁻ 16,7; PO₄²⁻ 11,9 und Glukose 11,5.

Die Bestandteile der Krebslösung werden zu Beginn jeder Versuchsreihe neu gemischt. Die Glukoselösung wird für jeden Versuchstag frisch angesetzt, um einen möglichen Bakterienbefall auszuschließen.

Während der gesamten Versuchsreihe wird die Krebslösung mit Carbogengas durchperlt, wobei sich ein pH-Wert in physiologischen Grenzen zwischen 7,2 und 7,4 ($7,2 \pm 0,8$) einstellt.

Die Krebslösung in den Organbädern wird auf 35°C ($\pm 0,2^{\circ}\text{C}$) temperiert.

Zur Aufrechterhaltung der Funktionalität der Präparate werden die Versuche im Organbad des Messgefäßes durchgeführt. Das Messgefäß kann jederzeit geleert und mit Krebslösung aus dem Vorratsgefäß gespült werden.

Ein Abflusstutzen am Boden des Versuchsgefäßes erlaubt das Auswechseln der Lösung. Es sind dort Anschlüsse für die Begasung mit einem Gemisch aus 95 % O_2 und 5 % CO_2 , Zu- und Ablauf vorhanden. Mit Hilfe eines Thermostats wird die Wandlung der Gefäße auf einer Temperatur von ca. 35°C gehalten.

Zur Fixierung des Muskels und zur Aufnahme seiner Längen- bzw. Kraftänderungen und Umwandlung der mechanischen Messwerte in elektrische Spannungen dient der Transducer (Fa. Karl Tesar, Karben), der von einer Trägerfrequenzbrücke betrieben wird. Die Messbrücken werden so justiert, dass der Transducer bei einer Belastung der elastischen Elemente auf dem Schreiber Auslenkungen von je 1 mN zeigt. In das Messgefäß wird jeweils einer der beiden Muskel gehängt. Die Flüssigkeit des Messgefäßes und des Vorratsgefäßes entspricht der physiologischen Extrazellulär-Flüssigkeit (Krebslösung).

Zur Berechnung der Wirkstoffkonzentration ist das Gefäß immer mit einer definierten Flüssigkeitsmenge (15 ml) gefüllt.

Es wird bei isometrischen Bedingungen (mN) gemessen. Diese Spannung wird mit Hilfe eines Papier-Schreibers Drei-Kanal-Direktschreiber (LS52-4, Fa. Linseis, Göttingen) aufgezeichnet. Auf diese Weise kann der Verlauf der Kontraktion über einen langen Zeitraum kontinuierlich aufgezeichnet werden.

Versuchsablauf

Die Versuchsanordnung wird mit Krebslösung beschickt, Thermostat und Begasung werden eingeschaltet. In einem weiteren Arbeitsschritt werden die Muskelpräparate an beiden Enden mit Bindfäden umschlungen und an einem Ende mittels Faden an einem Glashalter befestigt und so am Boden des Organbades fixiert. Über den

Fäden des anderen Endes werden die Streifen mit einem mechano-elektrischen Transducer verbunden. Im Anschluss daran wird die Nulllinie für die jeweiligen Präparate ermittelt. Dabei ist das Präparat im Zustand voller Entspannung, ohne jegliche Dehnung.

Im weiteren Verlauf der Versuchsvorbereitungen werden die Muskelstreifen auf in-situ-Länge ausgedehnt, anschließend wird ihnen eine Anpassungsphase von etwa einer Stunde bis zur Applikation der ersten Testsubstanz gegeben.

Zur Untersuchung der Wirkung von wässrigem Torfextrakt auf die glatten Muskeln werden daraufhin verschiedene Substanzen in das Organbad pipettiert.

Nach jedem Versuch wird die Krebslösung im Organbad gewechselt, was im folgendem als „Waschen“ (Spülen des Messgefäßes) bezeichnet wird. Das untere Ventil wird geöffnet und lässt die Flüssigkeit aus dem Gefäß fließen. Ist dieses vollständig geleert, wird es geschlossen. Darauf öffnet man das obere Ventil, so dass das Messgefäß wieder gefüllt wird. Ist die Flüssigkeitsmenge von 15 ml erreicht, schließt man das obere Ventil wieder.

Zu Beginn der Versuchsreihe wird Acetylcholin (10^{-5} M) appliziert. Am Ende eines Versuchstages erfolgt eine zweite Gabe von Acetylcholin (10^{-5} M) sowie die Feststellung der Nulllinie.

Im Hinblick auf die Untersuchung zu langfristigen Wirkungen verschiedener Torffractionen und Agonisten der α_2 Adreno- und D_2 Dopaminrezeptoren wird folgendermaßen vorgegangen: Am Anfang des Versuches wird für 5 Minuten die Wirkung von Acetylcholin, der Torffractionen und Agonisten als kurzfristige Wirkung einmalig untersucht. Auf diese Weise wird die Reaktivität der glatten Muskelstreifen gegenüber den entsprechenden Substanzen getestet.

Nach dem Lösungswechsel (Waschen) wird die Versuchsfraction oder der Agonist appliziert. Nach entsprechender Einwirkdauer (u.a. 30, 60, 180 Minuten) wird die Krebslösung im Organbad erneut ausgetauscht.

Nach weiteren 15-20 Minuten wird unter normalen Anfangsbedingungen (Norm) des Versuches die untersuchte Torffraction oder der jeweilige Agonist erneut über einen Zeitraum von drei bis fünf Minuten dem Organbad hinzugegeben. Dieses Vorgehen ermöglicht die Erfassung von Reaktivitätsänderungen der glatten Muskelstreifen gegenüber der jeweiligen Substanz.

Statistik

Um die präparatespezifischen Streuungen der Messwerte der SKA und deren Änderungen zu berücksichtigen, wird bei der Darstellung der Dosis-Wirkungskurven die in jeweils N=10 Einzelversuchen gemessene Anregung stets in % der maximalen kontraktiven Aktivität der glatten Muskelstreifen unter Wirkung von 10^{-5} M Acetylcholin (ACh) angegeben.

Zu den Wirkungen auf die glatte Muskulatur wurden jeweils N=5 Untersuchungen durchgeführt.

Das dem Ergebnisteil zugrunde liegende statistische Verfahren besteht in der Berechnung von Mittelwerten und Standardfehlern.

Die Mittelwerte werden nach den üblichen Standardformeln unter Einbeziehung der Einzelwerte der durchgeführten Untersuchungen berechnet. Als Maß für die Streuung wird jeweils die Standardabweichung berechnet.

Die Bearbeitung der Versuchsdaten erfolgt mit Hilfe des Programms Statistica 4.5 (StatSoft, Inc. Microsoft, USA). Die relative Standardabweichung des oben genannten Analyseverfahrens liegt in der Regel bei unter 5 %. Ausreißer werden mit Hilfe explorativer statistischer Verfahren (Student-t-Tests) ausgesondert. Pro Versuch werden jeweils N=3 Messungen durchgeführt.

4 Versuchsergebnisse

Die Ergebnisse sind in folgender Reihenfolge dargestellt:

Zunächst werden die Ergebnisse zu den anregenden Wirkungen wässriger Extrakte (WEMP I, WEMP II und WEMP III), gewonnen aus den 3 Moorproben, auf die SKA der GMS dargestellt.

Nachfolgend werden die Ergebnisse dargestellt, die nachweisen, dass die anregenden Wirkungen auf die SKA der GMS aller WEMP's auf die in ihnen enthaltenen Substanzen mit agonistischer Wirkung auf α_2 -Adreno und D₂-Dopaminrezeptoren zurück zu führen sind.

In unseren bisherigen Untersuchungen mit anderen Torfarten hat sich gezeigt, dass die biologisch aktiven Substanzen, die in allen wässrigen Torfextrakten enthalten sind -und somit in allen Torfarten- auf die wasserlöslichen Komponenten der Fulvin- und Ulminsäuren zurück zu führen sind.

Es werden als weitere Ergebnisse quantitative und pharmakologische Analysen der drei Torfstichproben zu den Fulvin- und Ulminsäuren dargestellt.

4.1 Wirkungen der wässrigen Torfextrakte WEMP I, II und III auf die spontane kontraktile Aktivität glatter Muskelstreifen

Abb. 9 zeigt die Ergebnisse zu den Wirkungen der wässrigen Torfextrakte aus den Moorproben I, II und III. Schon 150 μ l dieser wässrigen Extrakte zeigen eine anregende Wirkung auf die SKA der GMS.

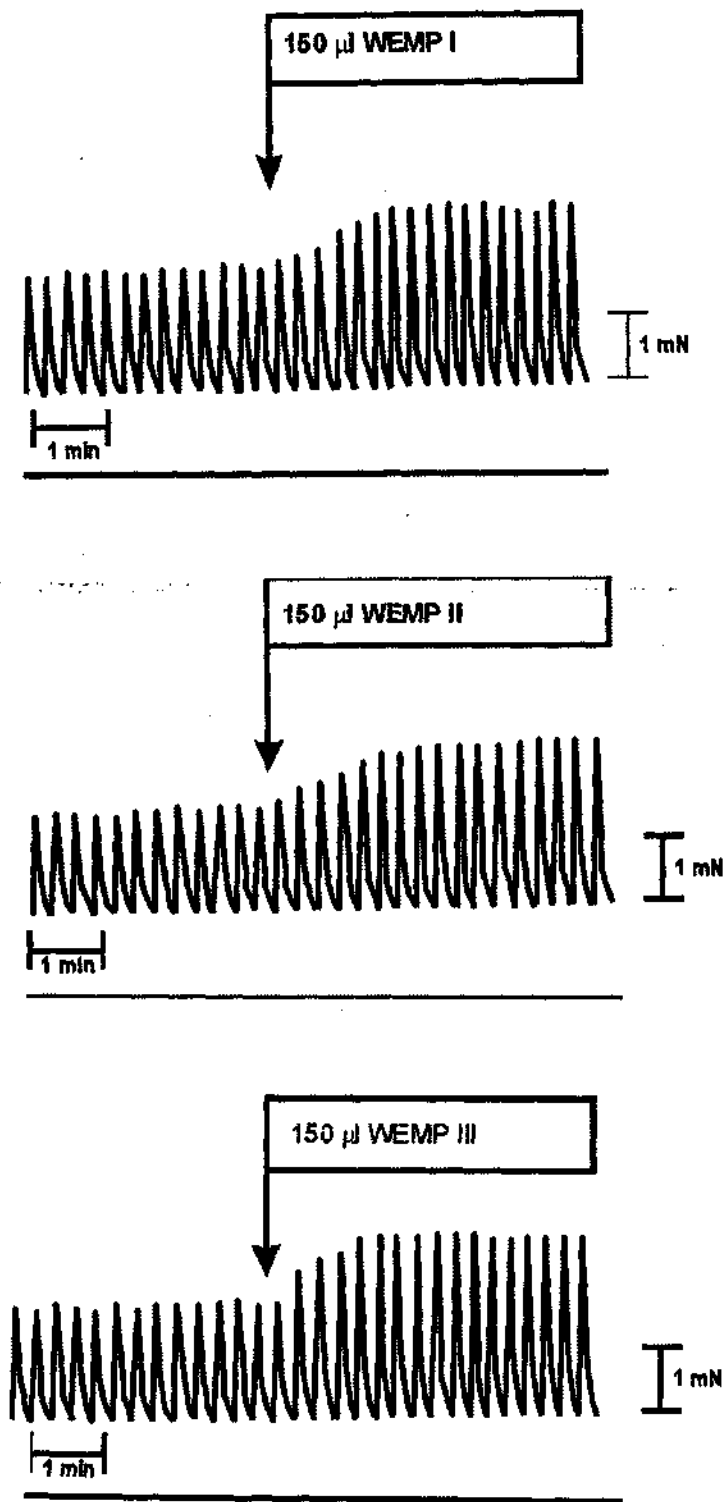


Abb. 9: Wirkungen von 150 µl WEMP I, 150 µl WEMP II und 150 µl WEMP III auf die SKA der GMS des Meerschweinchenmagens

Dass die Verdünnungsmittel (Wasser der Quellen I, II und III) keine messbaren Wirkungsänderungen auf die SKA der GMS besitzen, zeigt Abb. 10.

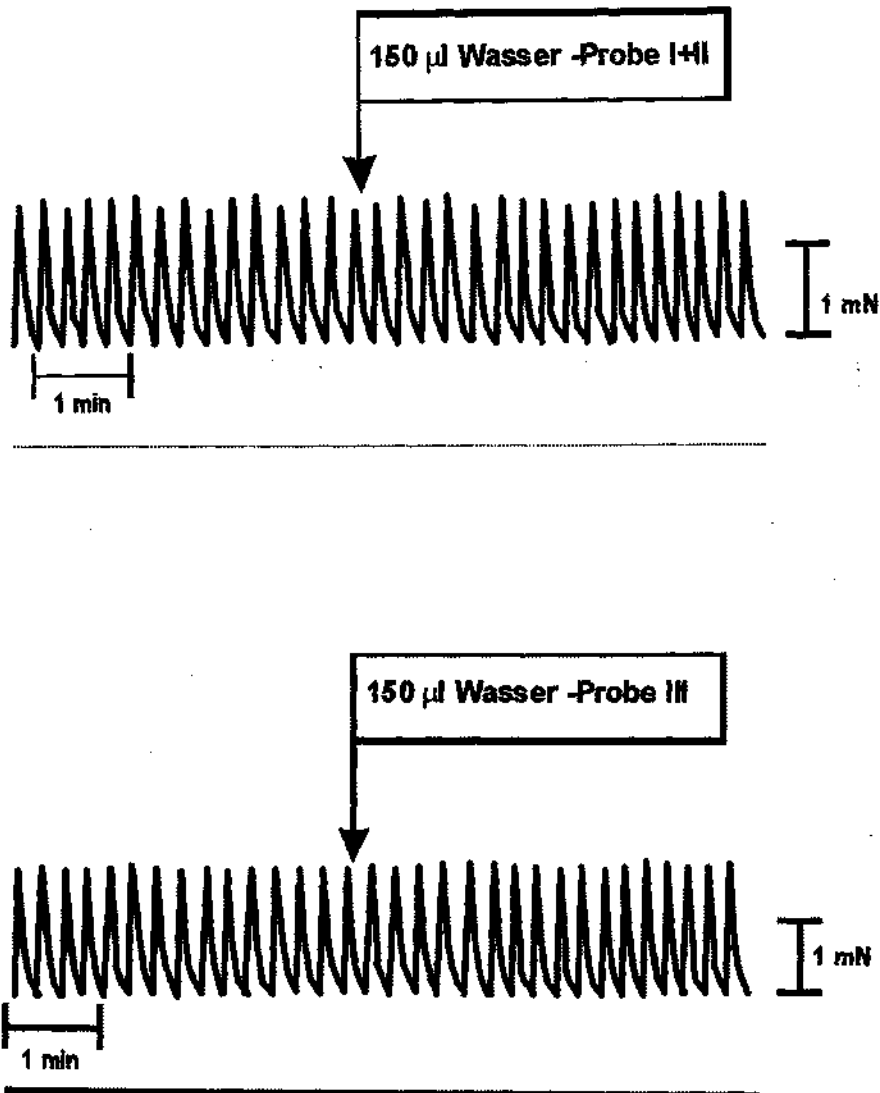


Abb. 10: Wirkung von 150 µl Wasser–Probe I+II und 150 µl Wasser–Probe III auf die SKA der GMS des Meerschweinchenmagens

In Abb. 11 sind die Ergebnisse dargestellt, die die einzelnen Wirkungen von WEMP I und der Lösungsmittel (oben) sowie die Dosis-Wirkungskurven (unten) auf die SKA der GMS zeigen. Die Abbildungen lassen erkennen, dass selbst höhere Dosen von Lösungsmitteln (bis zu 1 ml in 20 ml Organbad) keine Wirkungen auf die SKA der GMS zeigen. Es ist daher davon auszugehen, dass die anregenden Wirkungen als Folge der wasserlöslichen Substanzen, die im Torfbrei selbst enthalten sind, anzusehen ist. Der typische Verlauf der Dosis-Wirkungskurve zeigt, dass es sich um eine spezifische Wirkung handelt (Abb. 11 unten).

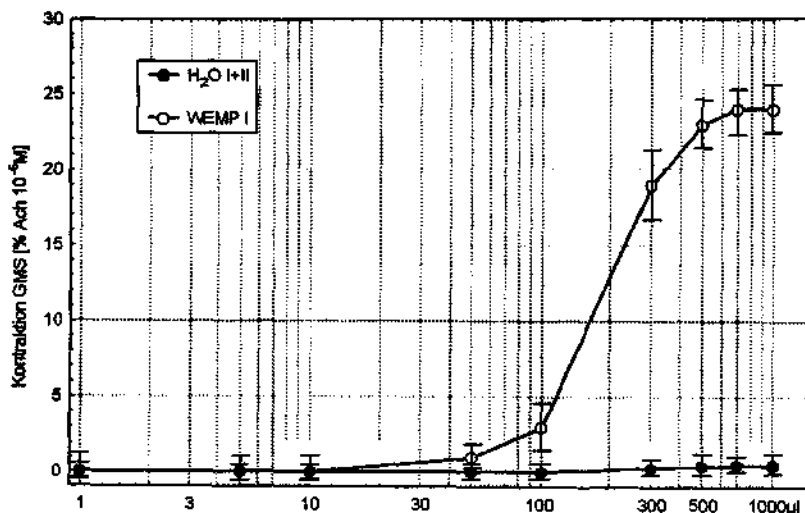
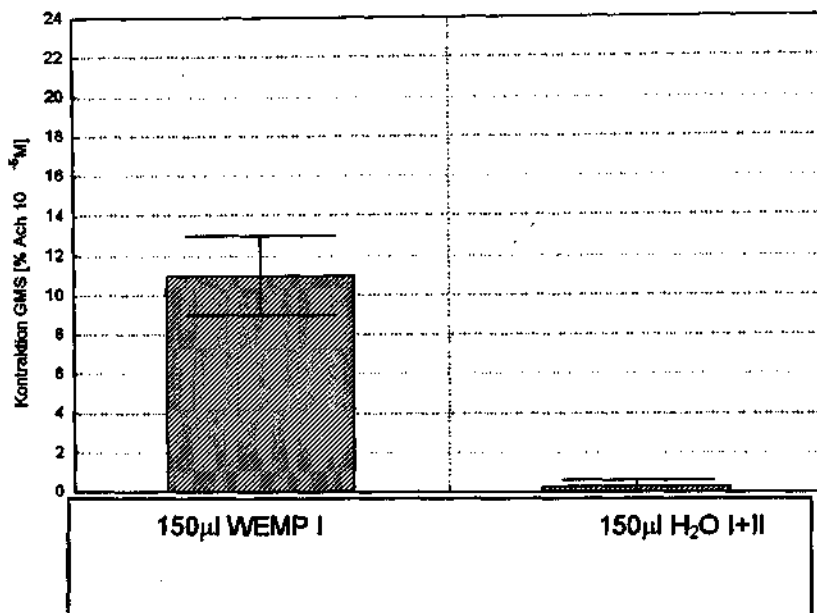


Abb. 11: Wirkungen von 150 µl WEMP I, 150 µl Wasser-Probe I+II (oben) und Dosis-Wirkungskurven von wässrigem Torfextrakt von Moorprobe I (WEMP I) und Wasser-Probe I+II (H₂O I+II) (unten) auf die spontane kontraktile Aktivität der glatten Muskelstreifen des Meerschweinchenmagens

Die Abb. 12 und 13 zeigen vergleichbare Ergebnisse im Hinblick auf die Torfextrakte WEMP II und III. Auch diese Abbildungen lassen erkennen, dass selbst höhere Dosen der Lösungsmittel von WEMP II und III (bis zu 1 ml in 20 ml Organbad) keine Wirkungen auf die SKA der GMS zeigen.

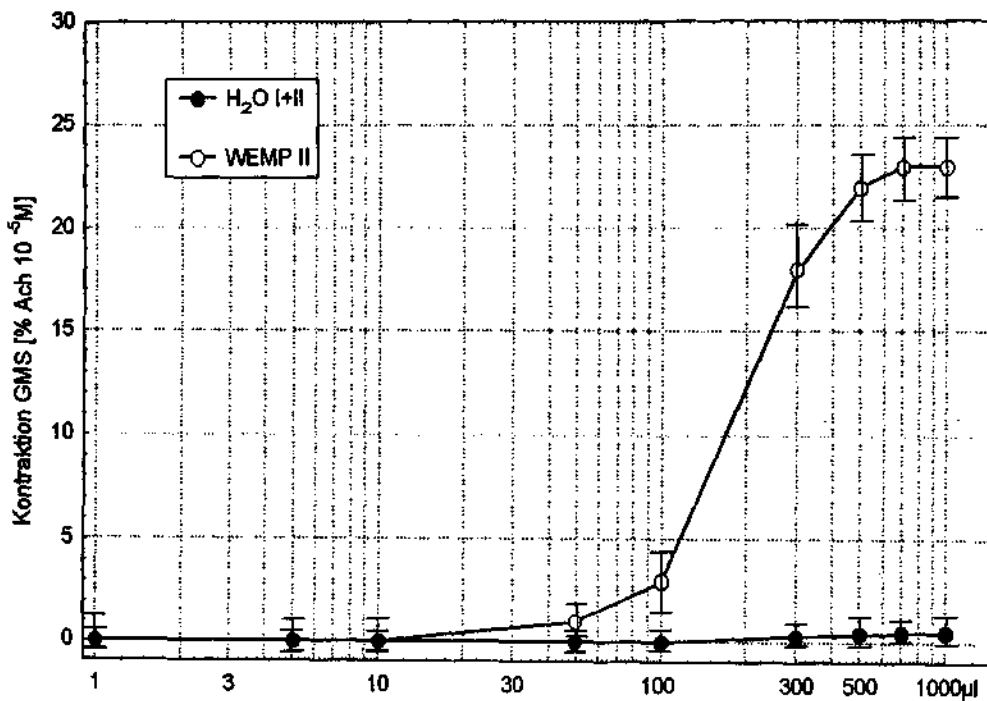
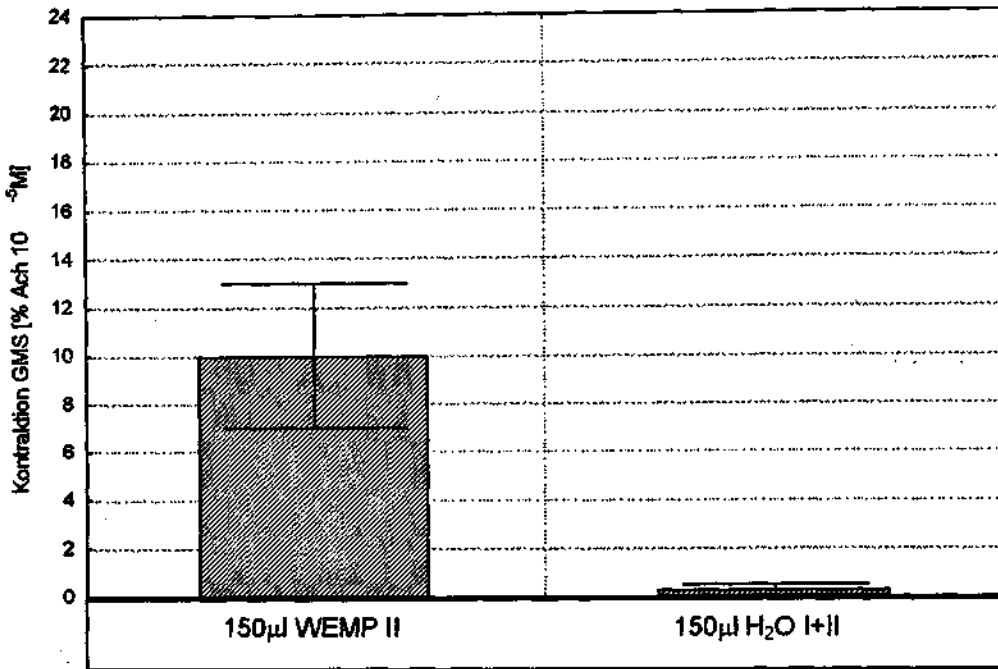


Abb. 12: Wirkungen von 150 µl WEMP II und 150 µl Wasser-Probe I+II (oben) und Dosis-Wirkungskurven von wässrigem Torfextrakt von Moorprobe II (WEMP II) und Wasser-Probe I+II (H₂O I+II) (unten) auf die spontane kontraktile Aktivität der glatten Muskelstreifen des Meerschweinchenmagens

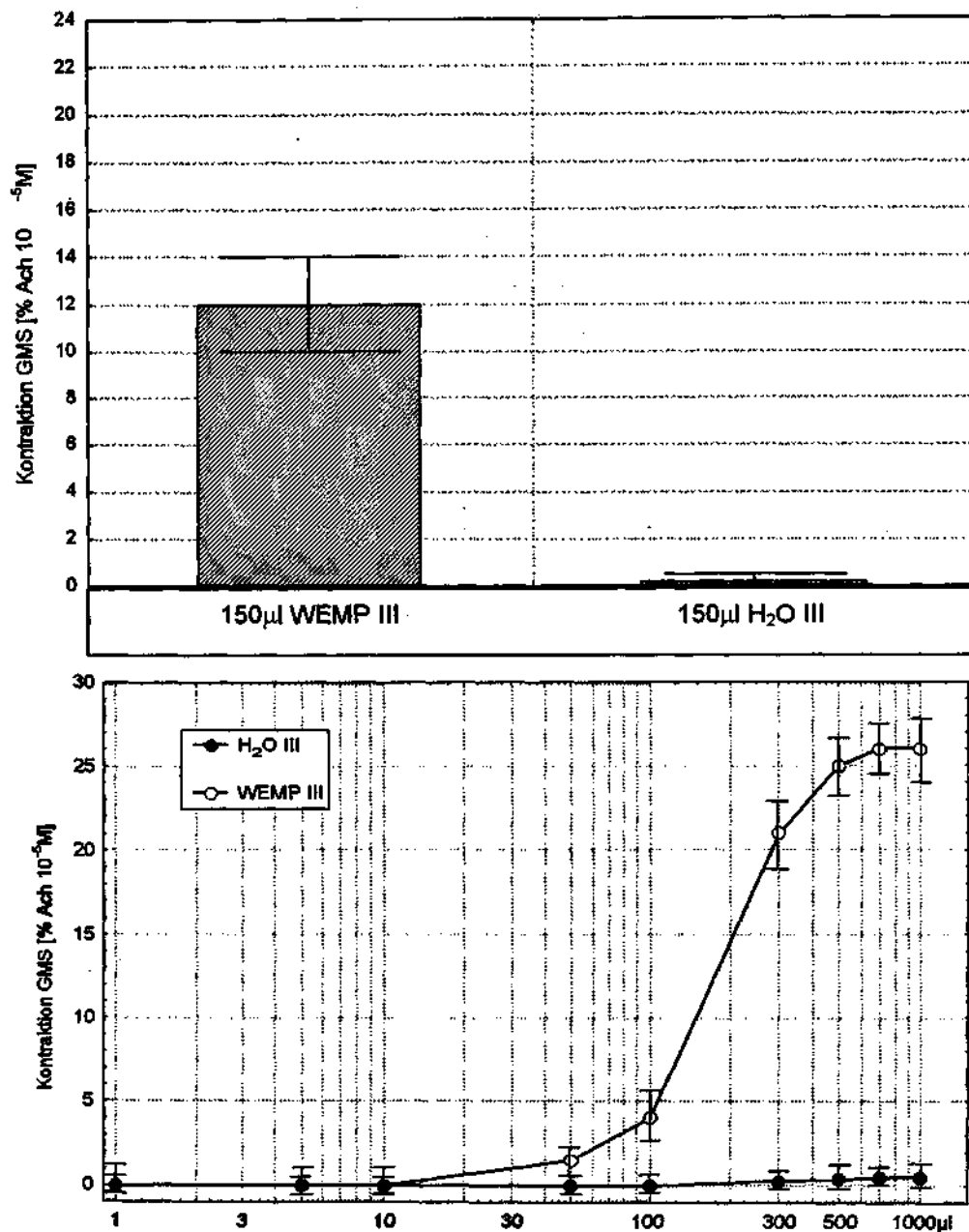


Abb. 13: Wirkungen von 150 µl WEMP III und 150 µl Wasser-Probe III (oben) und Dosis-Wirkungskurven von wässrigem Torfextrakt von Moorprobe III (WEMP III) und Wasser-Probe III (H₂O III) (unten) auf die spontane kontraktile Aktivität der glatten Muskelstreifen des Meerschweinchenmagens

Abb. 14 (unten) zeigt, dass die 3 Dosis-Wirkungskurven der WEMP I-III parallel verlaufen und keine signifikanten Unterschiede im Verlauf zeigen. Die anregenden Wirkungen dieser wässrigen Extrakte auf die SKA der GMS erreichen eine bis zu 25%ige Anregung der maximalen kontraktiven Aktivität der glatten Muskelfasern. Dies spricht für eine sehr hohe biologische Aktivität der hier untersuchten Torfextrakte.

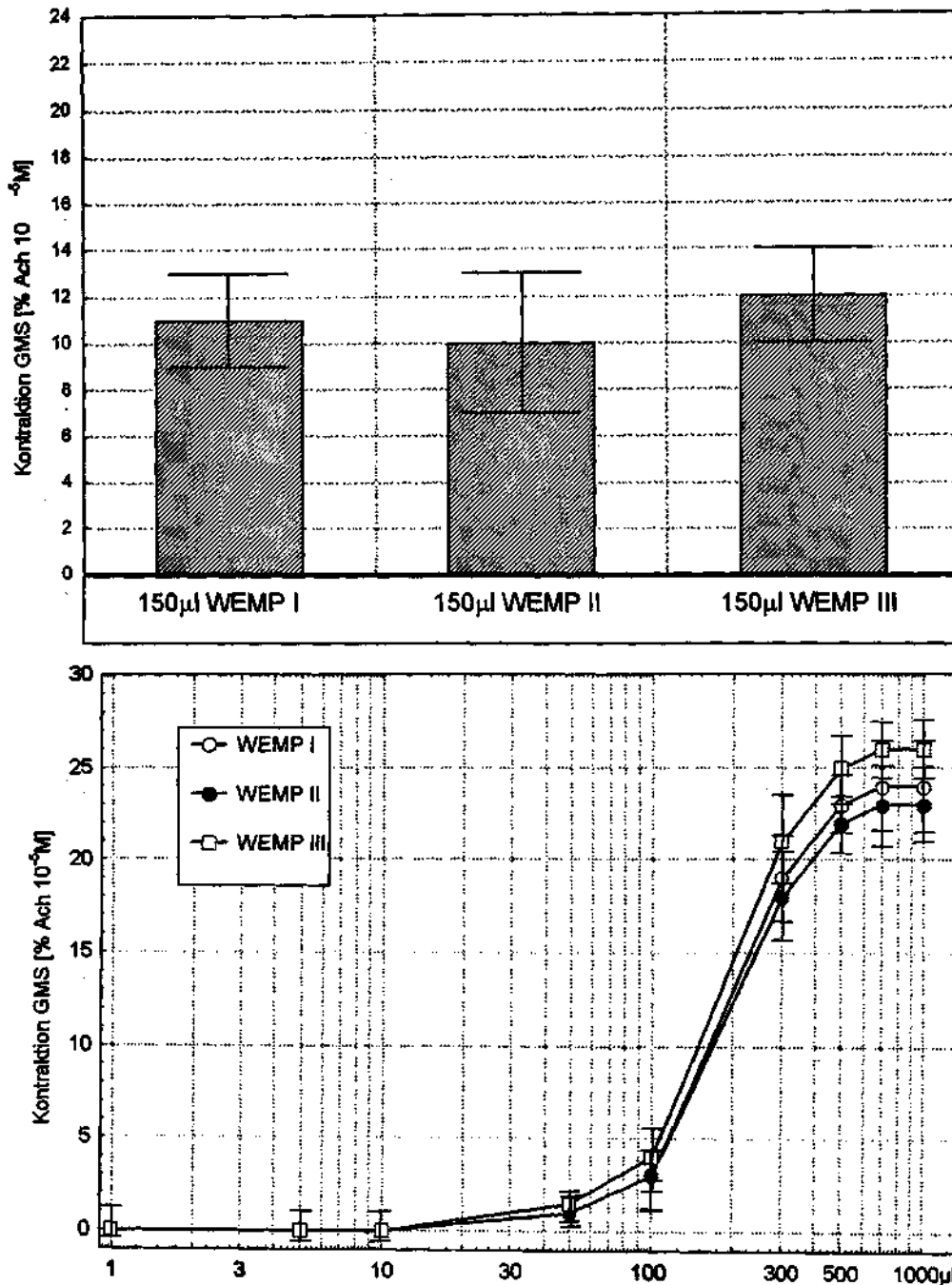


Abb. 14: Wirkungen von 150 µl WEMP I, 150 µl WEMP II und 150 µl WEMP III (oben) und Dosis-Wirkungskurven der gleichen Torfextrakte auf die spontane kontraktile Aktivität der glatten Muskelstreifen des Meerschweinchenmagens (unten)

Die von uns untersuchten Moorproben zeigen eine Feuchtigkeit von 96% wobei andere Torfprodukte die wir bislang untersucht haben immer eine Feuchtigkeit von etwa 86% aufwiesen. Um einen Vergleich mit anderen Torfprodukten zu ermöglichen haben wir den Wassergehalt in den Moorproben I, II und III auf 85% reduziert. Daraus resultieren weitere neue WEMP I, II und III mit der Bezeichnung „85“ (Abb. 15, 16).

Auf Abb. 15 ist das Verfahren dargestellt.

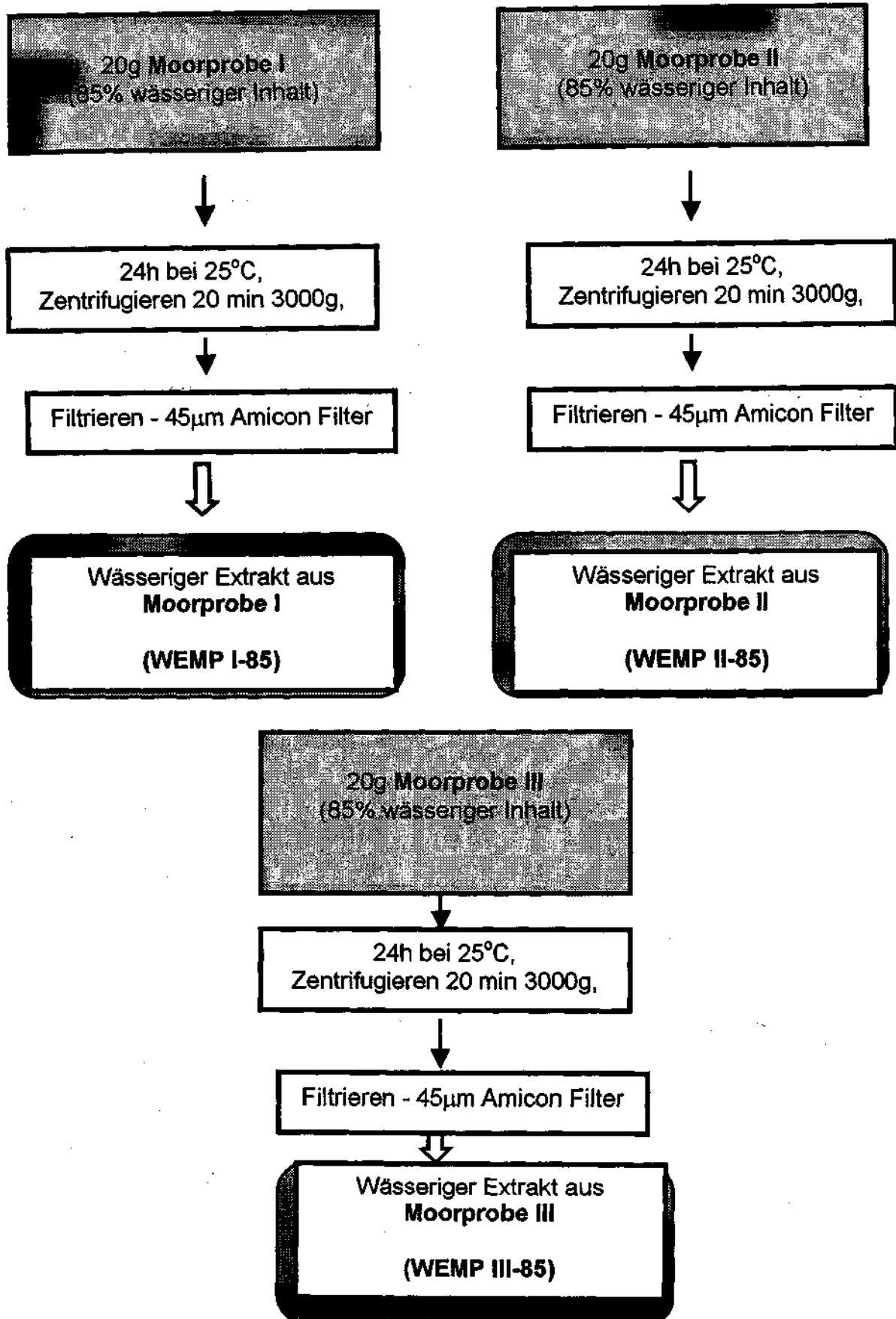


Abb. 15: Herstellung von Extrakten aus Moorprobe I- 85% wässriger Inhalt, Moorprobe II- 85% wässriger Inhalt und Moorprobe III - 85% wässriger Inhalt

Abb. 16 zeigt die Ergebnisse im Hinblick auf WEMP 85. Es ist zu erkennen, dass trotz Erhöhung der mittleren Werte der gelösten Substanzen (vgl. Abb. 8) die Unterschiede statistisch nicht signifikant sind.

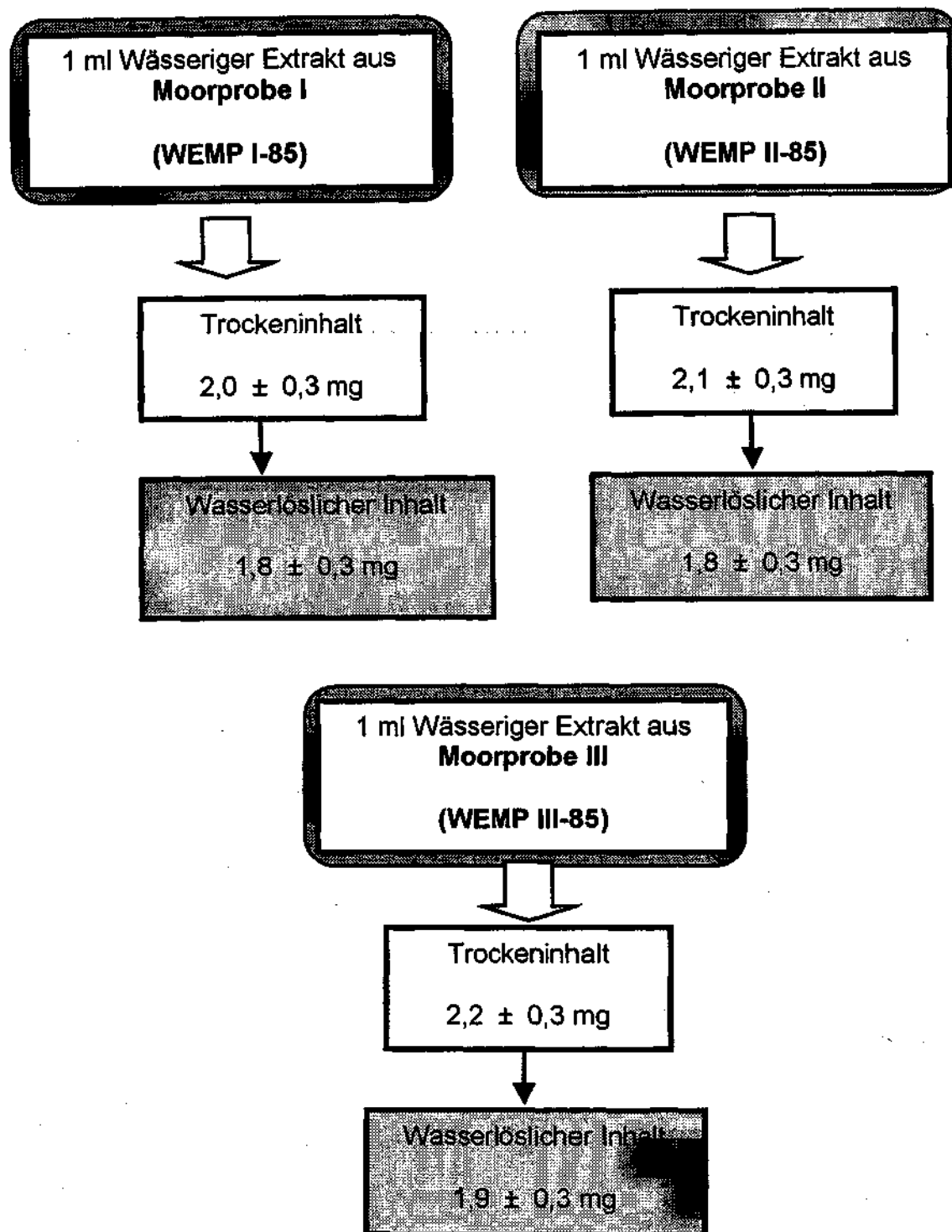


Abb.16: Bestimmung von Konzentrationen der wasserlöslichen Komponenten wässriger Extrakte aus Moorprobe I, Moorprobe II und Moorprobe III - 85% wässriger Inhalt

Die Abb. 17, 18 und 19 zeigen, dass sich die anregenden Wirkungen der WEMP I-III und WEMP-85 I-III auf die SKA nicht signifikant voneinander unterscheiden (Abb. 17, 18 und 19 oben). Auch die Dosis – Wirkungskurven verlaufen parallel und sind deckungsgleich (Abb. 17, 18 und 19 unten).

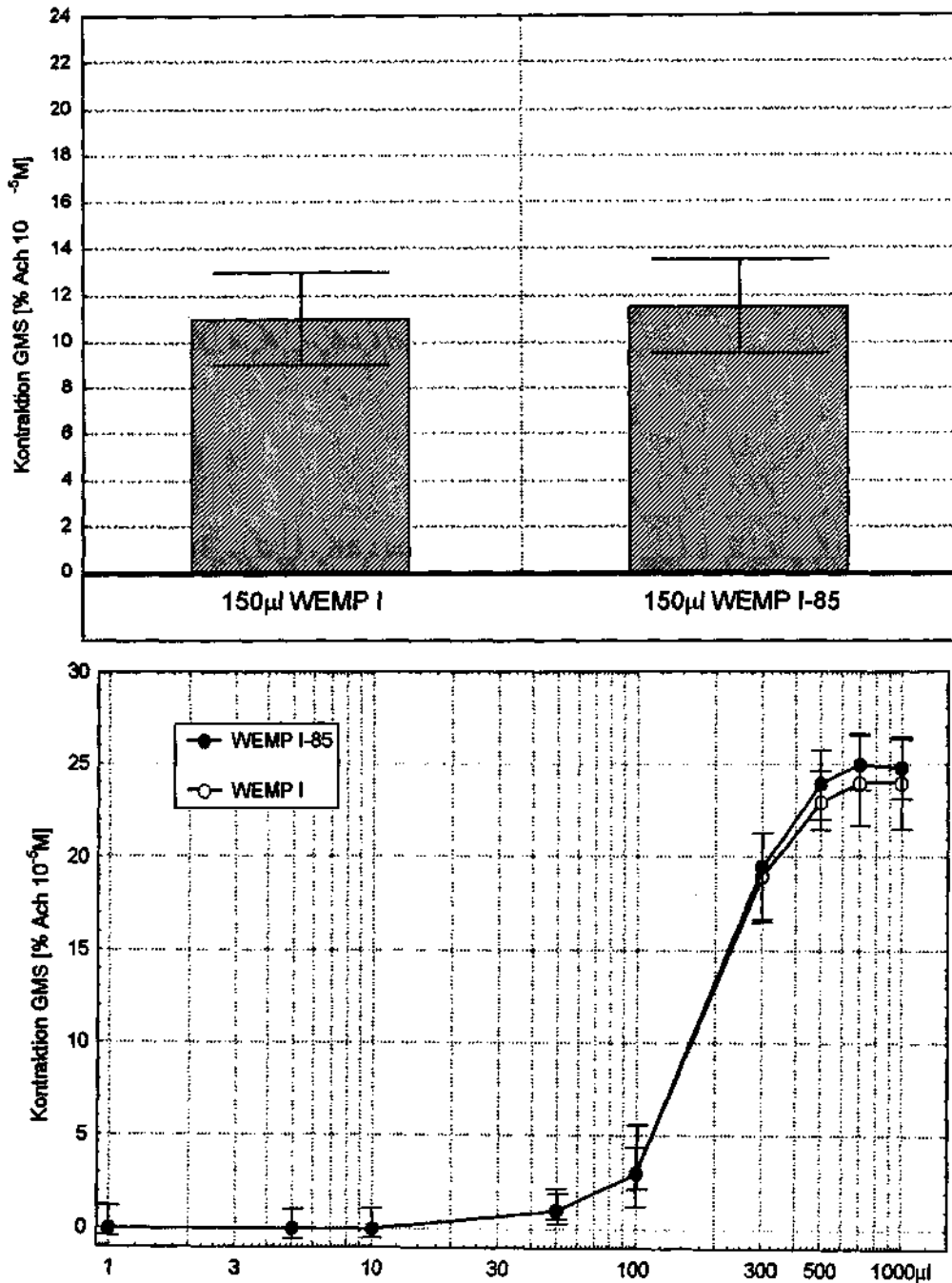


Abb.17: Wirkungen von 150 µl WEMP I-85% und 150 µl WEMP I auf die SKA der glatten Muskelstreifen des Meerschweinchenmagens (oben) und Dosis-Wirkungskurven der gleichen wässrigen Torfextrakte (unten)

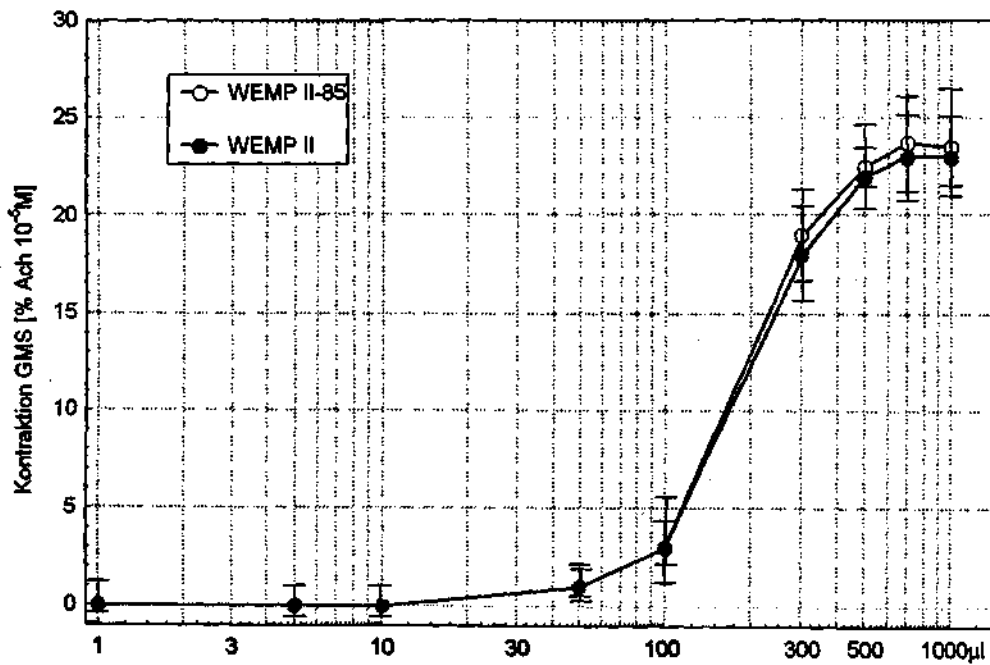
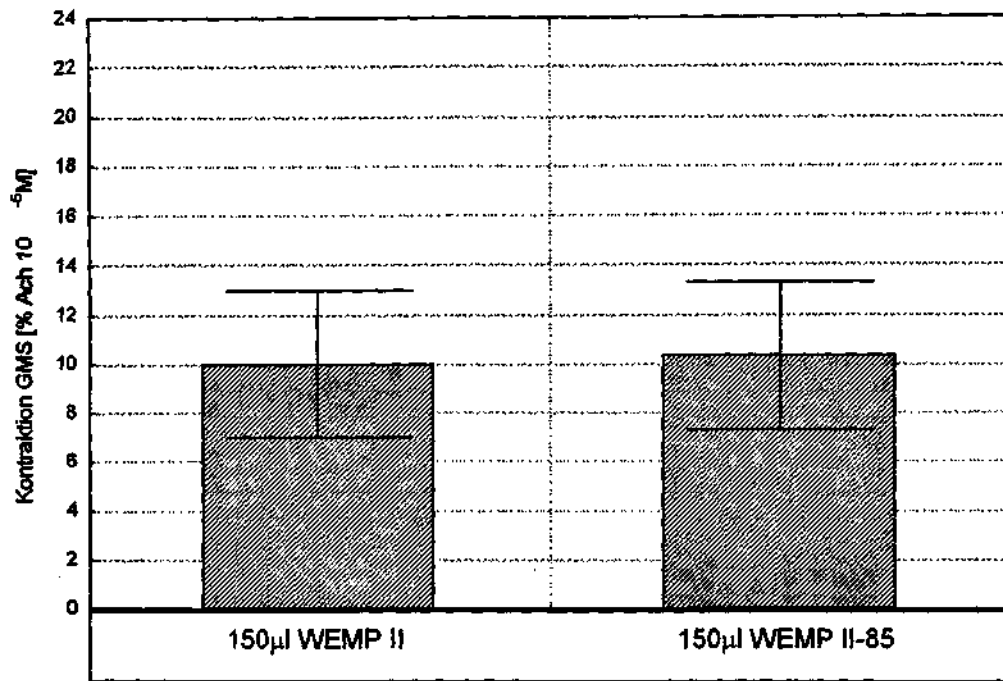


Abb. 18: Wirkungen von 150 µl WEMP II-85% und 150 µl WEMP II auf die SKA der glatten Muskelstreifen des Meerschweinchenmagens (oben) und Dosis-Wirkungskurven der gleichen wässrigen Torfextrakte (unten)

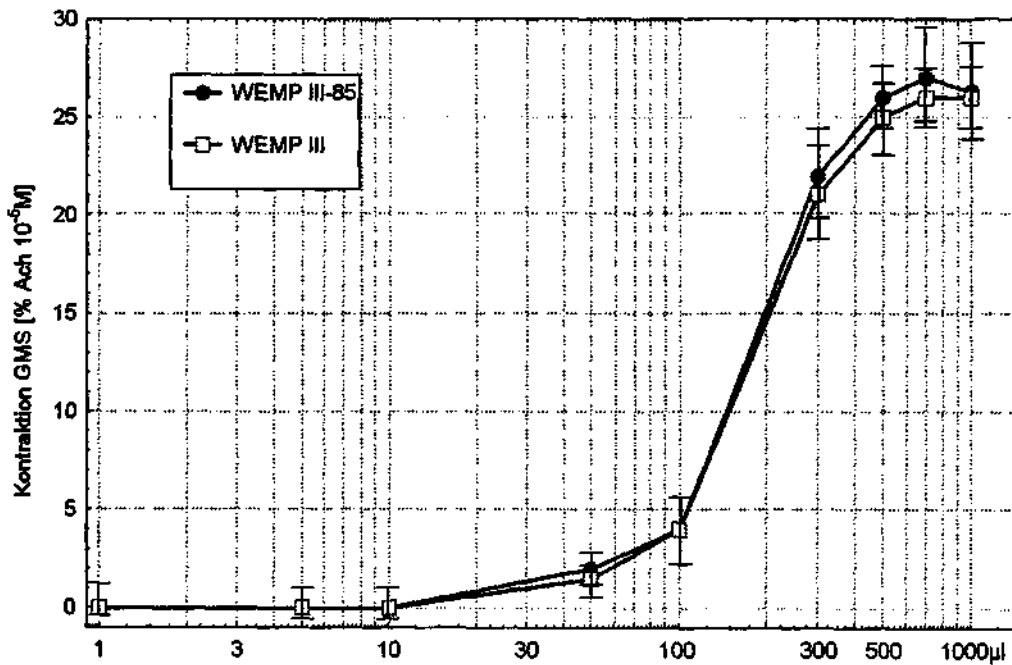
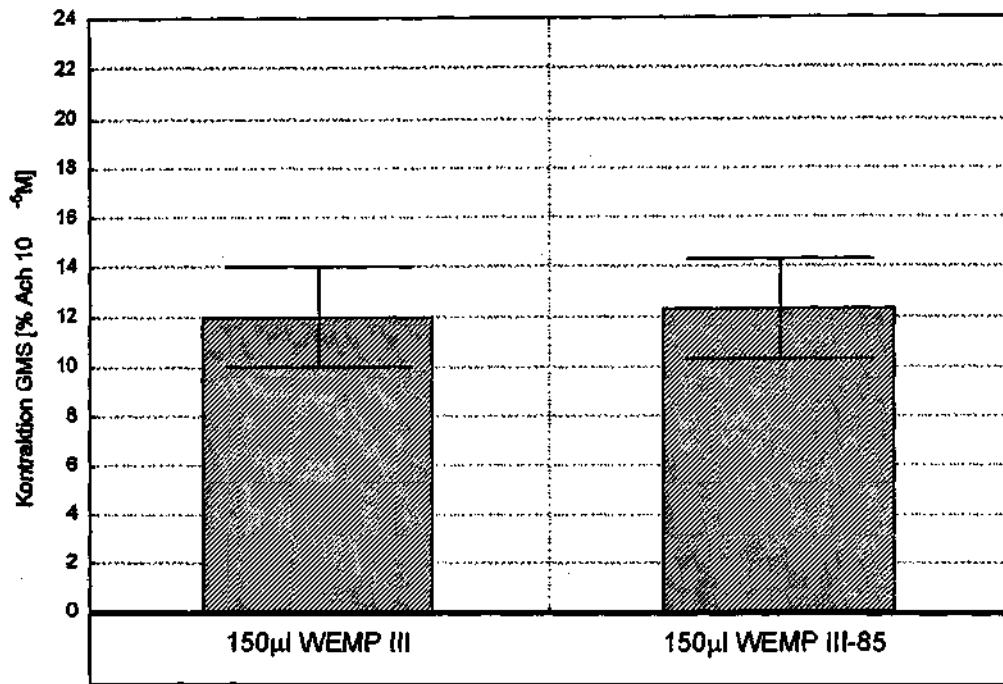


Abb. 19: Wirkungen von 150 µl WEMP III-85% und 150 µl WEMP III auf die SKA der glatten Muskelstreifen des Meerschweinchenmagens (oben) und Dosis-Wirkungskurven der gleichen wässrigen Torfextrakte (unten)

4.2 Wirkungsmechanismus der anregenden Wirkungen der WEMP's von Bad Kohlgrub und Bad Bayerstein auf die spontane Kontraktilität glatter Muskelstreifen

Die Ergebnisse, wie sie in Kap. 4.1 aufgeführt sind, zeigen, dass alle drei WEMP I – III eine sehr gute ausgeprägte anregende Wirkung auf die SKA der GMS verursachen. Unsere früheren Arbeiten konnten zeigen, dass viele der Torfarten biologisch aktive Substanzen beinhalten, agonistisch auf α_2 -Adreno- und D_2 -Dopaminrezeptoren wirken und eine Potenzierung der SKA der GMS hervorrufen.

Abb. 20 (oben) zeigt die anregende Wirkung von 150 μ l (in 20 ml Organbad) WEMP I auf die SKA der GMS. Blockiert man vorab die Rezeptoren mit 10^{-5} M Raclopride die D_2 -Dopaminrezeptoren so ist die Anregung deutlich geringer (Abb. 20, unten).

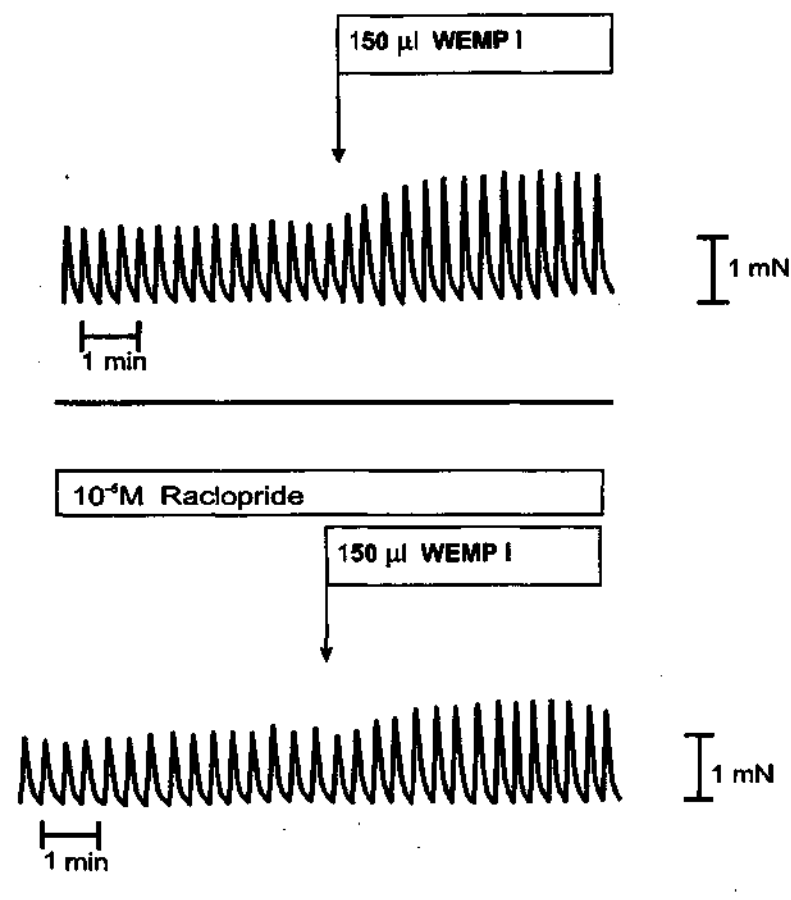


Abb. 20: Wirkung von 150 μ l WEMP I unter normalen Bedingungen (oben) und bei vorheriger Blockierung von D_2 -Dopaminrezeptoren mit 10^{-5} M Raclopride (unten)

Derselbe Effekt erfolgt durch die Blockierung von α_2 -Adrenorezeptoren mit 5×10^{-6} M p-iodoclonidine (Abb. 21).

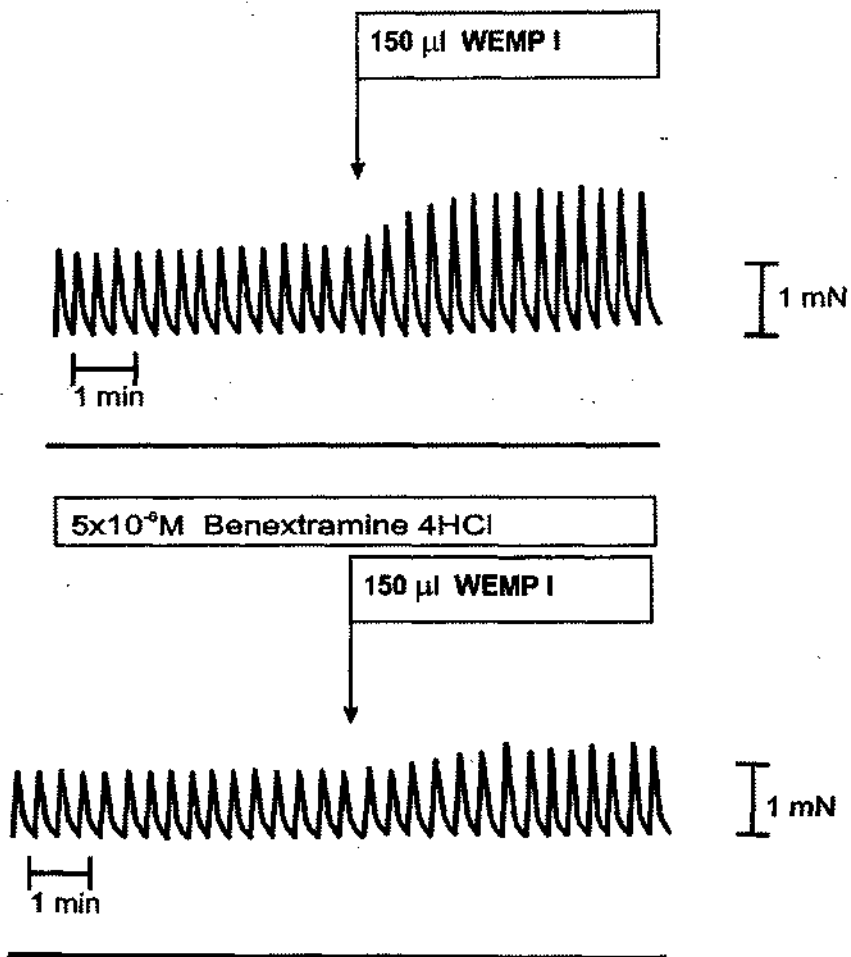


Abb. 21: Wirkung von 150 µl WEMP I unter normalen Bedingungen (oben) und bei vorheriger Zugabe von 5×10^{-5} M Benextramine (α_2 -Adrenorezeptorenblocker) (unten)

Werden beide Rezeptorentypen gleichzeitig blockiert, ist die Wirkung von WEMP I vollständig kupiert (Abb. 22).

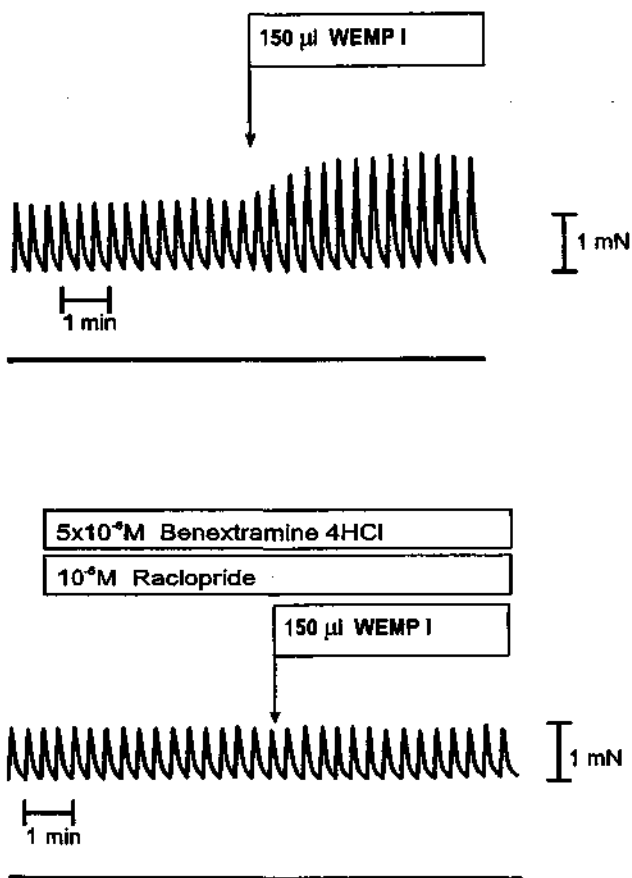


Abb. 22: Wirkung von 150 µl WEMP I unter normalen Bedingungen (oben) und bei gleichzeitiger Blockierung von α_2 -Adreno- und D_2 -Dopaminrezeptoren (5×10^{-6} M Benextramine und 10^{-6} M Raclopride) (unten)

Ähnliche Effekte erhält man (Abb. 23 und 24), wenn man diese Rezeptorentypen im Vorfeld der Zugabe von 150 μ l WEMP II (Abb. 23) und WEMP III (Abb. 24), blockiert.

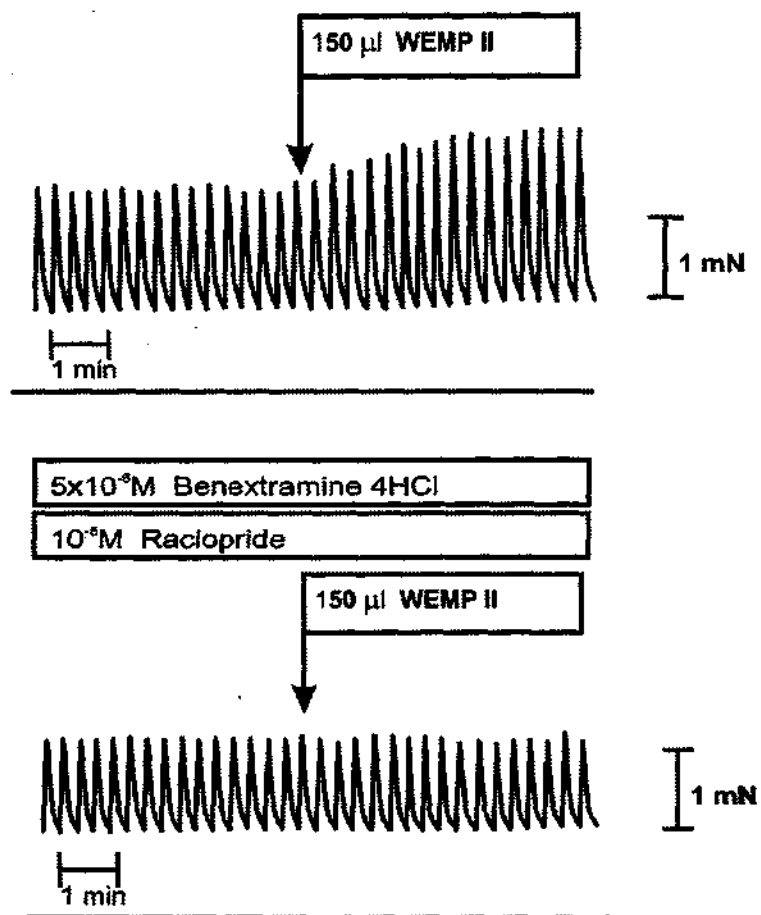


Abb. 23: Wirkung von 150 μ l WEMP II unter normalen Bedingungen (oben) und bei gleichzeitiger Blockierung von α_2 -Adreno- und D₂-Dopaminrezeptoren (5x10⁻⁶ M Benextramine und 10⁻⁵ M Raclopride) (unten)

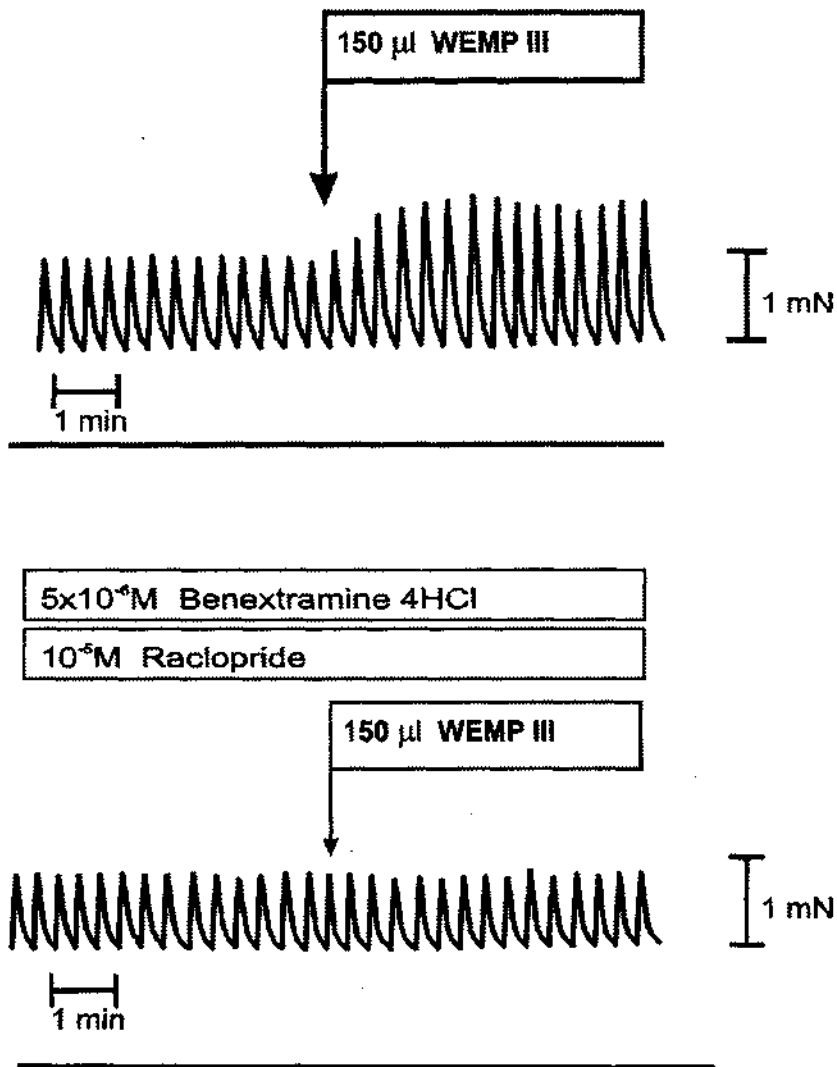


Abb. 24: Wirkung von 150 µl WEMP III unter normalen Bedingungen (oben) und bei gleichzeitiger Blockierung von α_2 -Adreno- und D_2 -Dopaminrezeptoren (5×10^{-6} M Benextramine und 10^{-5} M Raclopride) (unten)

Somit lässt sich zusammenfassend festhalten, dass alle drei WEMP I–III anregende Wirkungen auf die SKA der GMS zeitigen. Diese anregenden Wirkungen können auf die in den WEMP's enthaltenen Substanzen, die α_2 -Adreno- und D_2 -Dopaminrezeptoren agonistisch beeinflussen, zurück zu führen sein.

4.3 Isolierung von Fulvin- und Ulminsäuren aus dem Torf, der in Bad Kohlgrub und Bad Bayerstein für medizinische Ziele eingesetzt wird

Aus unseren Vorarbeiten mit anderen Torfarten ist bekannt, dass ein Großteil ihrer pharmakologischen Eigenschaften, in unserem Fall der wässrigen Extrakte, qualitativ und quantitativ mit den wasserlöslichen Komponenten der Fulvin- und Ulminsäuren in Verbindung stehen.

Es wurden daher im Rahmen der vorliegenden Untersuchungen die wasserlöslichen Komponenten der Fulvin- und Ulminsäuren aus den Moorproben I-III isoliert.

Die Abbildungen 25, 26 und 27 stellen das Trennungsverfahren der Fulvin- und Ulminsäuren dar (vgl. Kap. 3.2).

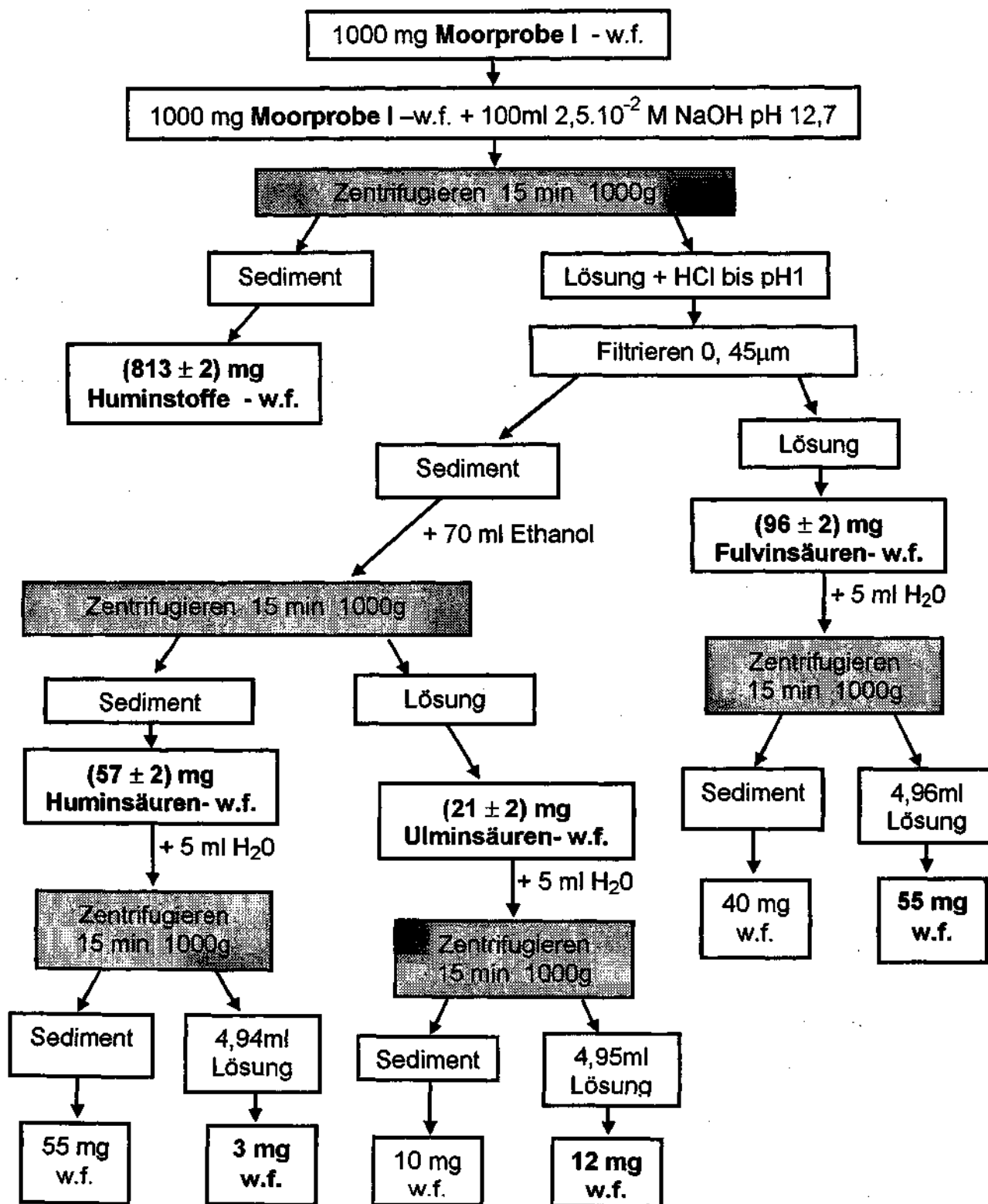


Abb. 25: Schema zur Trennung der wasserlöslichen Komponenten der Fulvin-, Ulmin- und Huminsäuren von Moorprobe I (w.f.- wasserfrei)

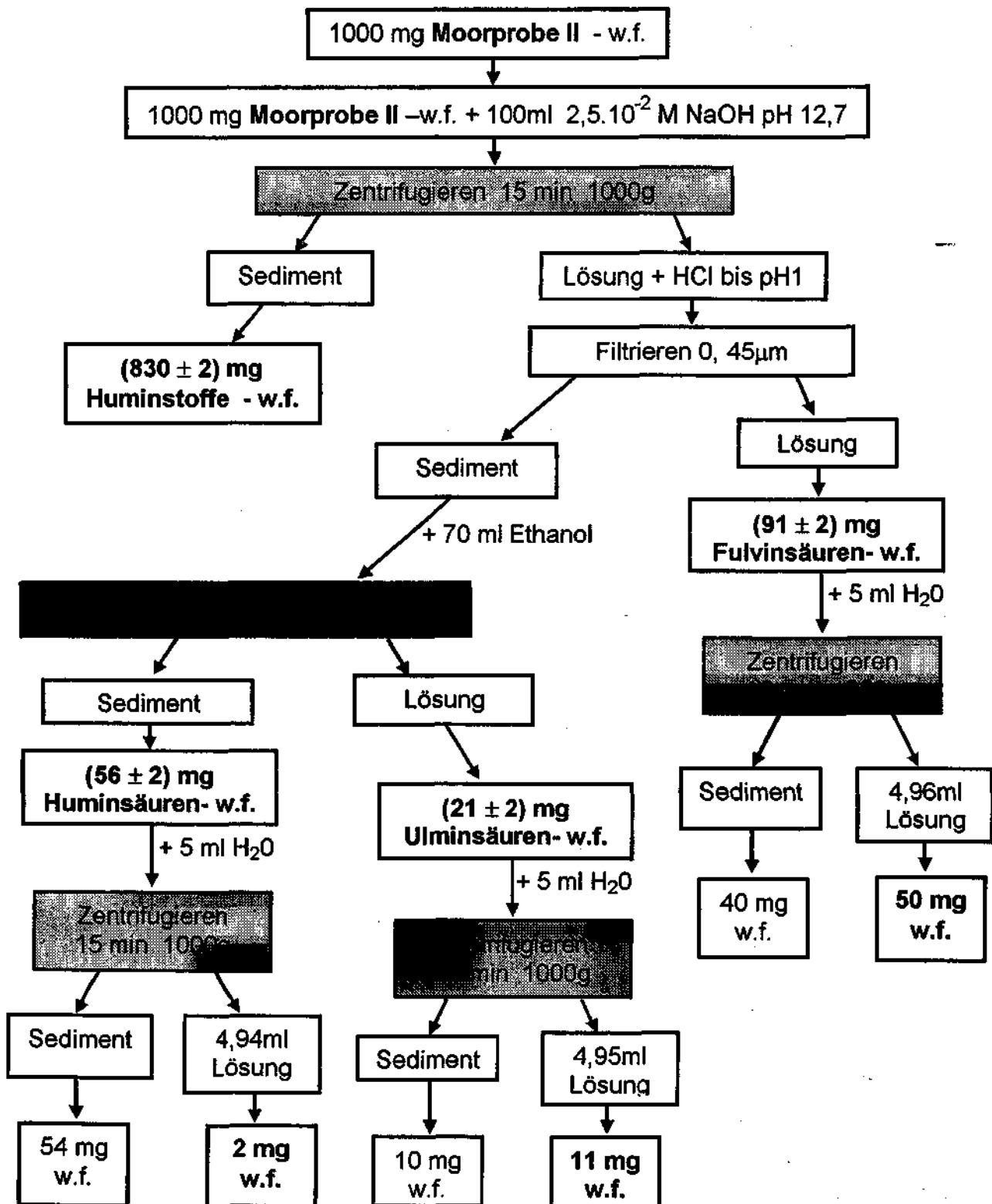


Abb. 26: Schema zur Trennung der wasserlöslichen Komponenten der Fulvin-, Ulmin- und Huminsäuren von Moorprobe II (w.f.- wasserfrei)

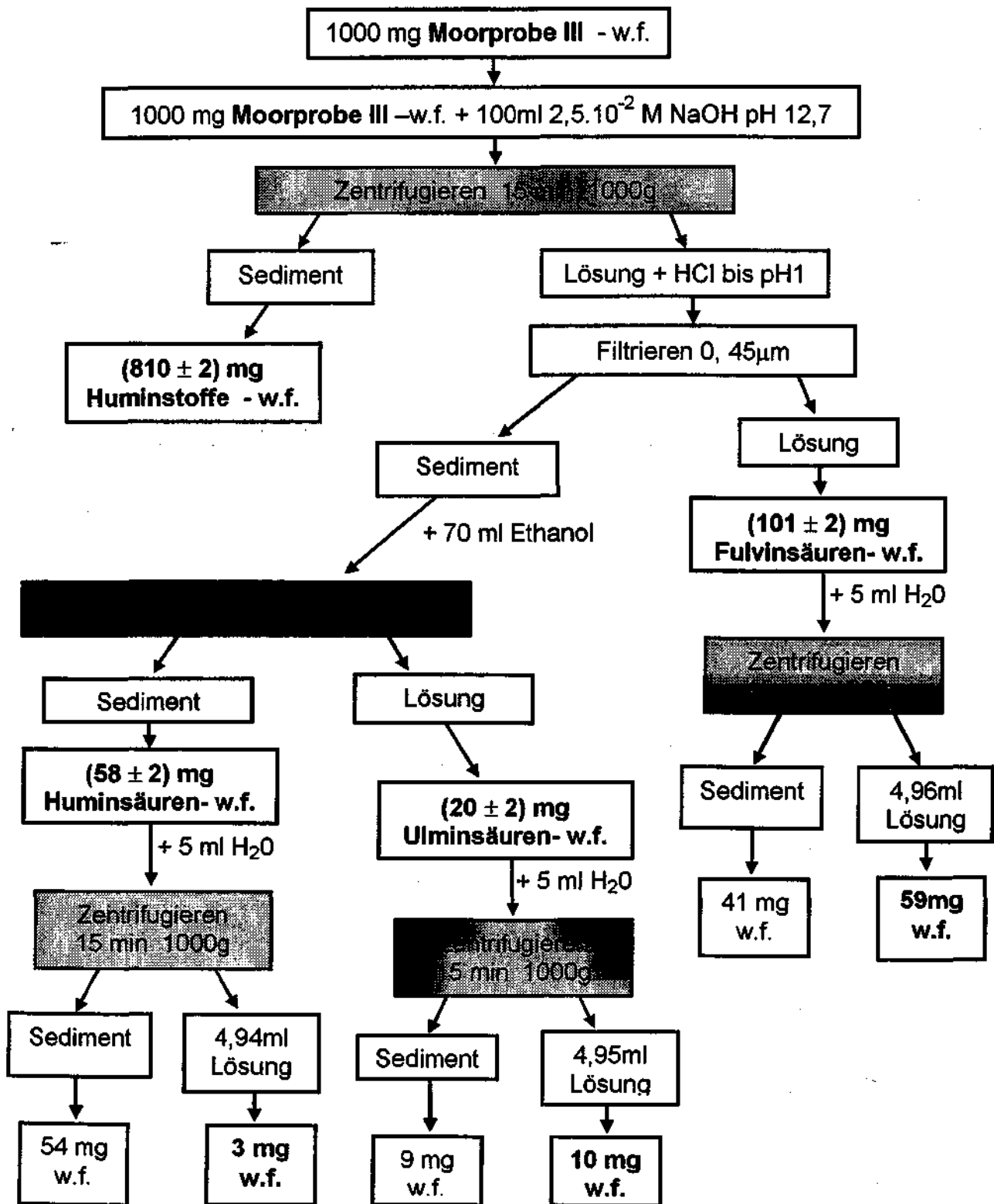


Abb. 27: Schema zur Trennung der wasserlöslichen Komponenten der Fulvin-, Ulmin- und Huminsäuren von Moorprobe III (w.f.- wasserfrei)

Analysiert man die gewonnenen Ergebnisse der 3 Moorproben (Abb. 28) lässt sich eine hohe Konzentration an wasserlöslichen Komponenten der Fulvin- und Ulminsäuren aufzeigen. Die Werte der Fulvinsäuren liegen zwischen 50 und 60 mg/l

g und die für Ulminsäuren zwischen 10 – 12 mg/1 g wasserfreiem Torf. Damit sind die Werte ca. 2-3-mal höher als in anderen von uns untersuchten Torfarten. Die Unterschiede, die sich zwischen den einzelnen hier untersuchten Moorproben zeigen, liegen bei 10 – 20%, führen aber nicht wie bereits oben verdeutlicht zu signifikanten Unterschieden bei den Wirkungen der WEMP's auf die SKA der GMS.

Torfart	In Wasser gelöste Substanzen aus 1g w.f. Torf, pH 12,7	Sediment von 1g w.f. Torf, pH 12,7
Moorprobe I	174 ± 2 mg	813 ± 2 mg
Moorprobe II	168 ± 2 mg	830 ± 2 mg
Moorprobe III	179 ± 2 mg	810 ± 2 mg

Torfart	In Wasser gelöste Substanzen aus 1g w.f. Torf		
	Fulvinsäuren	Ulminsäuren	Huminsäuren
Moorprobe I	55 ± 1 mg	12 ± 1 mg	3 ± 1 mg
Moorprobe II	50 ± 1 mg	11 ± 1 mg	2 ± 1 mg
Moorprobe III	59 ± 1 mg	10 ± 1 mg	3 ± 1 mg

Abb. 28 (oben): Analysen der Moorproben I, II und III. Unten: Trennung der WLK von Fulvin-, Ulmin- und Huminsäuren aus den Moorproben I, II und III

Auf Abb. 29 (oben) ist die Wirkung von 50 µl Fulvinsäure, isoliert aus der Moorprobe I, auf die SKA der GMS dargestellt, auf Abb. 29 (unten) bei vorheriger Blockierung der D₂-Dopaminrezeptoren mit 10⁻⁵ M Raclopiride. Die anregende Wirkung von 50 µl Fulvinsäure auf die SKA der glatten Muskelstreifen ist bei vorheriger Blockierung von D₂-Dopaminrezeptoren deutlich vermindert (Abb. 29 unten).

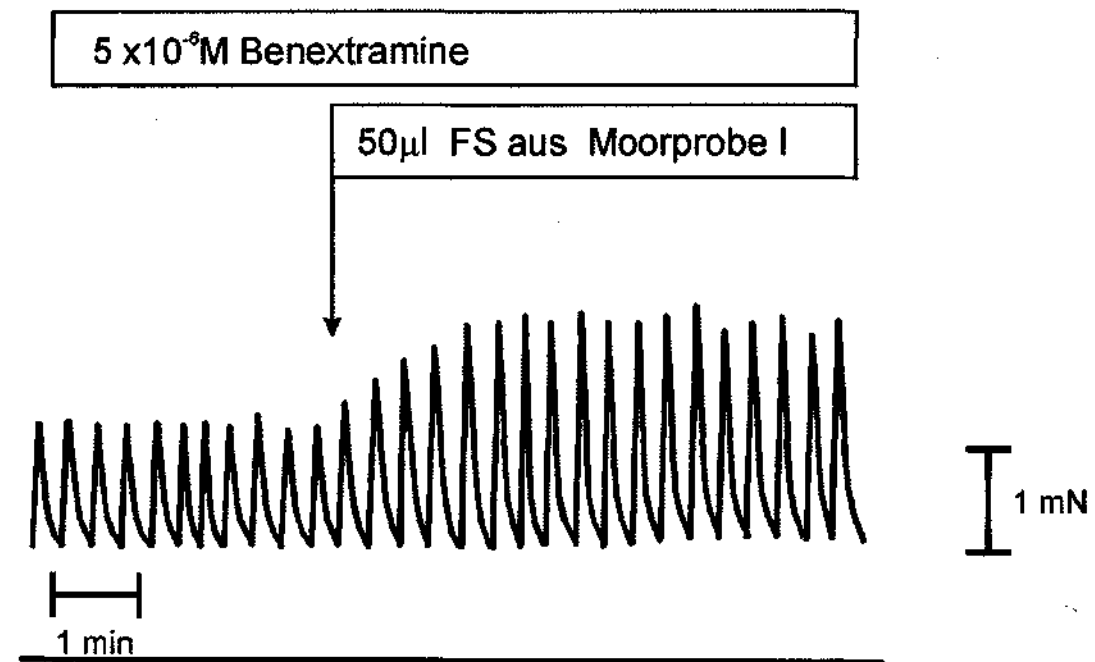
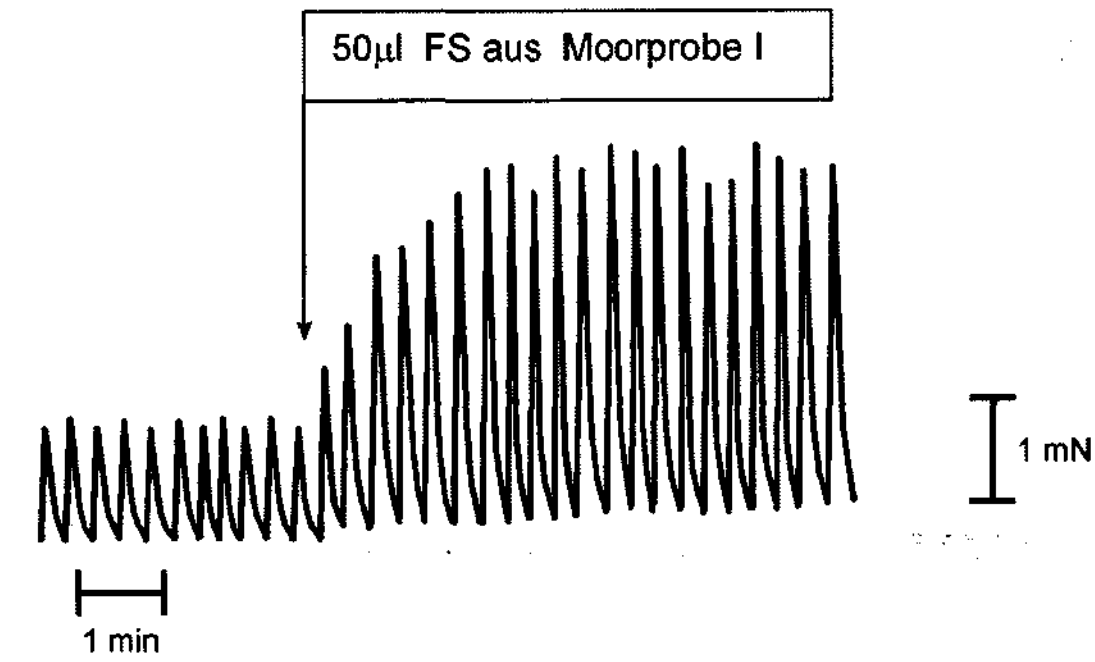


Abb. 29: Wirkung von 50 µl Fulvinsäuren aus Moorprobe I (FS aus Moorprobe I) auf die SKA der GMS unter normalen Bedingungen (oben) und bei Blockade der α_2 Adrenorezeptoren (5×10^{-6} M Benextramine) (unten)

Abb. 30 zeigt vergleichbar zu Abb. 29, dass eine anregende Wirkung auf die SKA der GMS bei Blockierung von α_2 -Adrenorezeptoren mit 5×10^{-6} M Benextramine stattfindet. Bei gleichzeitiger Blockierung der α_2 -Adreno- und D_2 -Dopaminrezeptoren werden die anregenden Wirkungen vollständig kupiert (Abb. 31).

Daraus kann gefolgert werden, dass die anregenden Wirkungen der Fulvinsäuren auf die SKA der glatten Muskelstreifen demselben Wirkungsmechanismus unterliegen wie WEMP I.

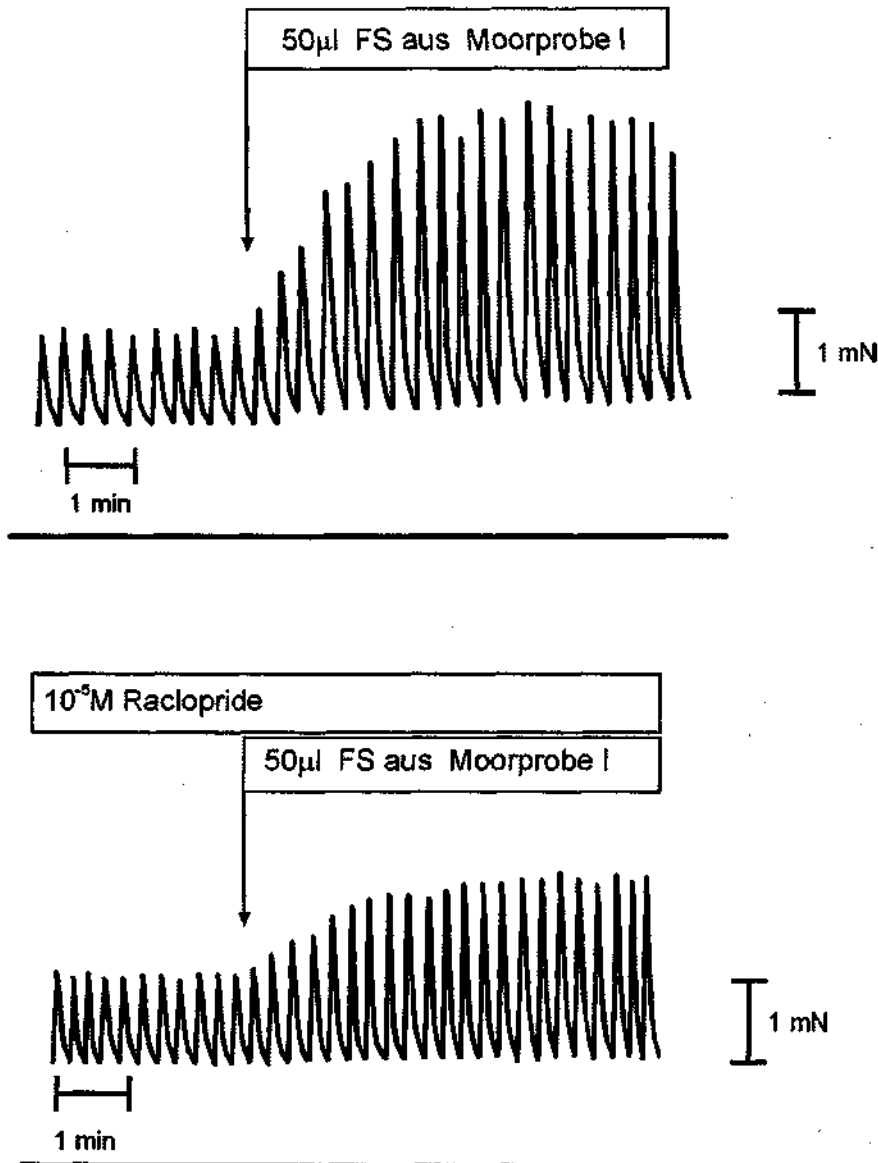


Abb. 30: Wirkung von 50 µl Fulvinsäuren aus Moorprobe I (FS aus Moorprobe I) auf die SKA der GMS unter normalen Bedingungen (oben) und bei Blockade der D_2 Dopaminrezeptoren (10^{-5} M Raclopride) (unten)

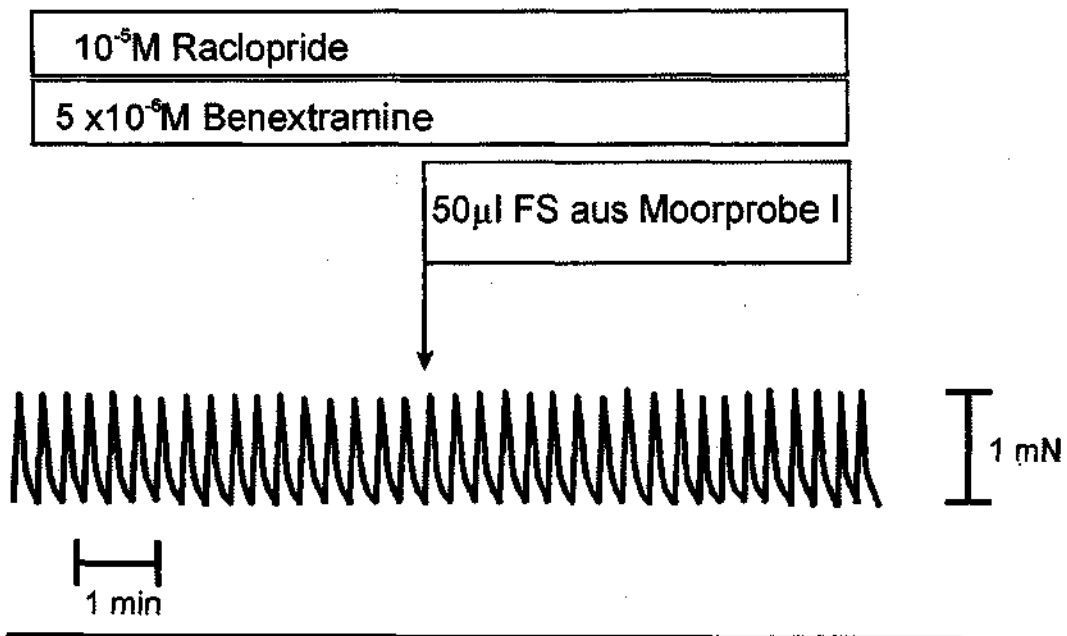
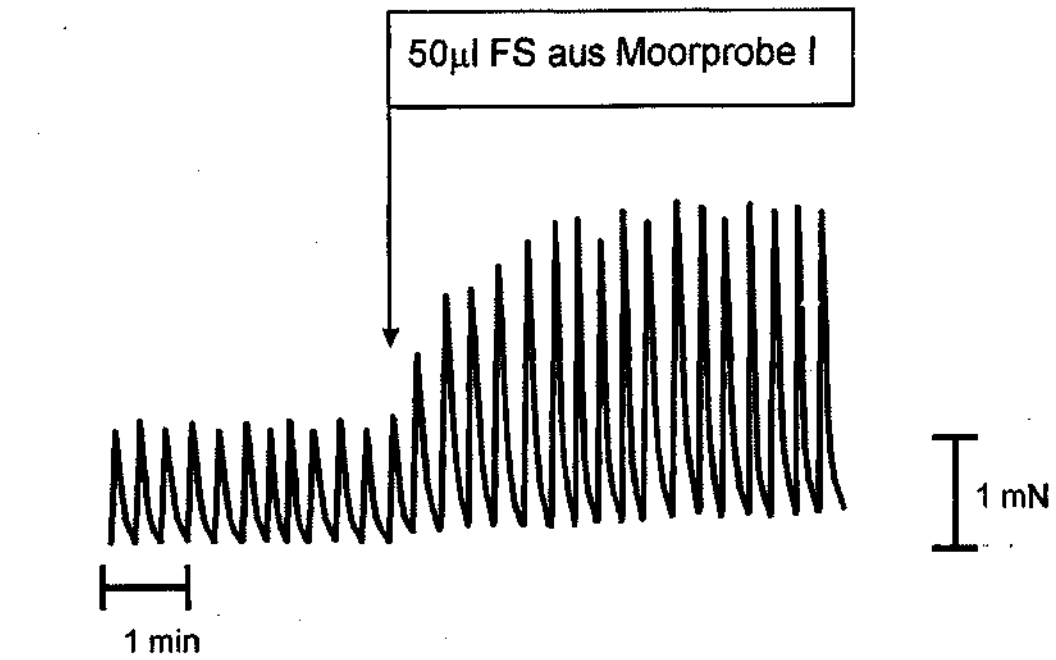


Abb. 31: Wirkung von 50 µl Fulvinsäuren aus Moorprobe I (FS aus Moorprobe I) auf die SKA der GMS unter normalen Bedingungen und bei gleichzeitiger Blockade der D₂-Dopaminrezeptoren (10⁻⁵ M Raclopride) und α₂-Adrenorezeptoren (5x10⁻⁶ M Benextramine)

Abb. 32 bestätigt diese Ergebnisse auch beim Einsatz höherer Dosen an Fulvinsäuren.

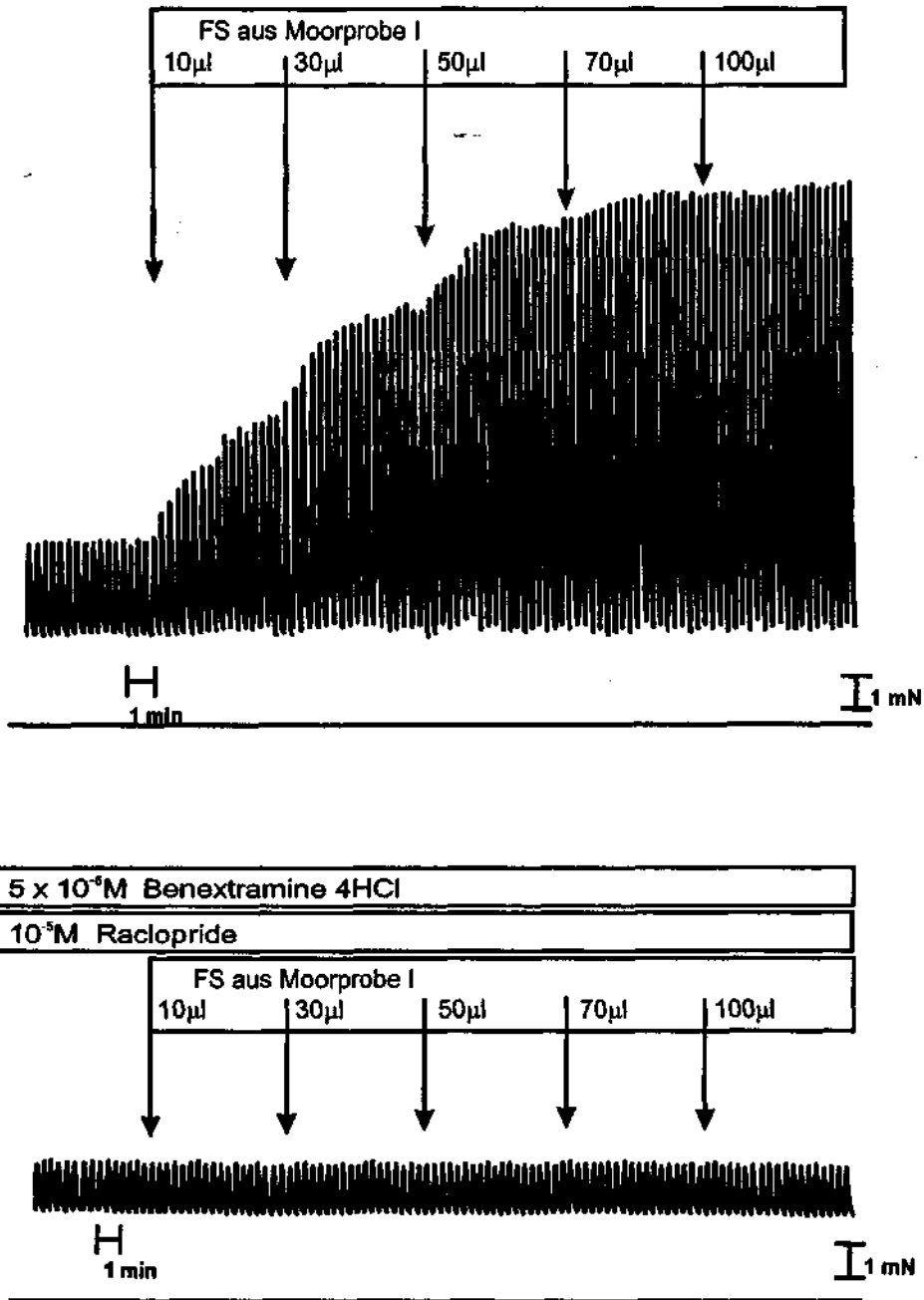


Abb. 32: Wirkungen von Fulvinsäure aus Moorprobe I (10 µl, 30 µl, 50 µl, 70 µl, 100 µl) auf die SKA der GMS unter normalen Bedingungen (oben) und bei gleichzeitiger Blockade von D₂-Dopaminrezeptoren (10⁻⁵ M Raclopride) und α₂-Adrenorezeptoren (5x10⁻⁶ M Benextramine) (unten)

Abb. 33 zeigt die Dosis-Wirkungskurven mit Fulvinsäuren. Die anregende Wirkung der SKA der GMS erreicht über 70% der maximalen kontraktile Aktivität der glatten Muskelstreifen.

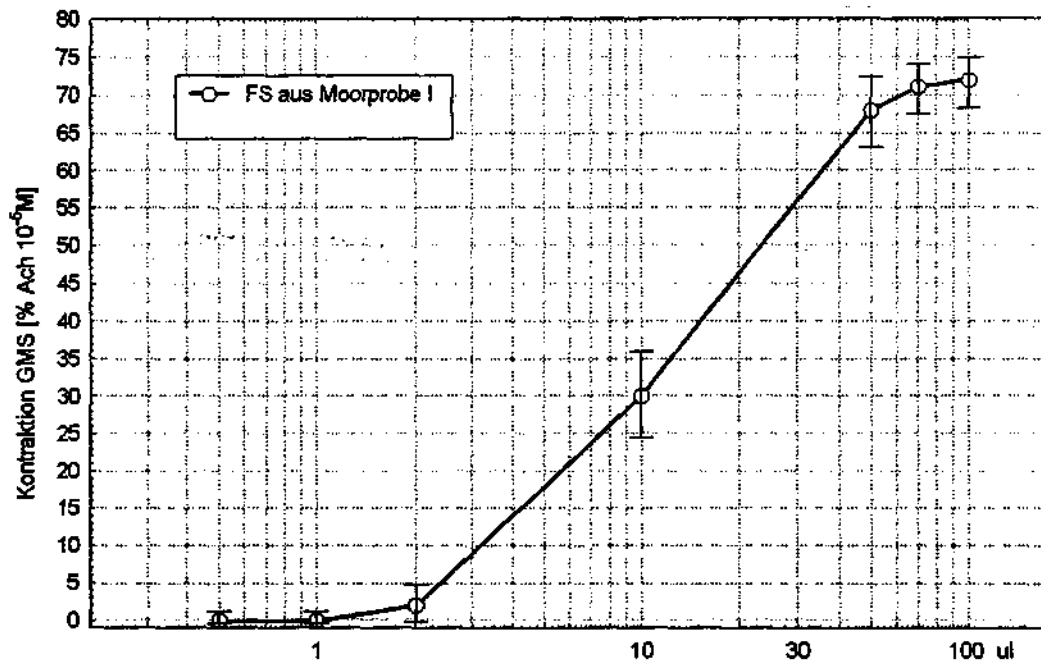


Abb. 33: Dosis-Wirkungskurven von Fulvinsäuren aus Moorprobe I (0,5 µl, 1 µl, 2 µl, 10 µl, 50 µl, 70 µl und 100 µl) auf die spontane kontraktile Aktivität der glatten Muskelstreifen des Meerschweinchenmagens

Die Ergebnisse zu den Untersuchungen mit Fulvinsäuren, die aus der Moorprobe II isoliert werden konnten, sind auf den Abbildungen 34, 35 und 36 dargestellt. Die Ergebnisse zeigen einen vergleichbaren Wirkungsmechanismus mit dem der Fulvinsäuren, die aus Moorprobe I isoliert wurden.

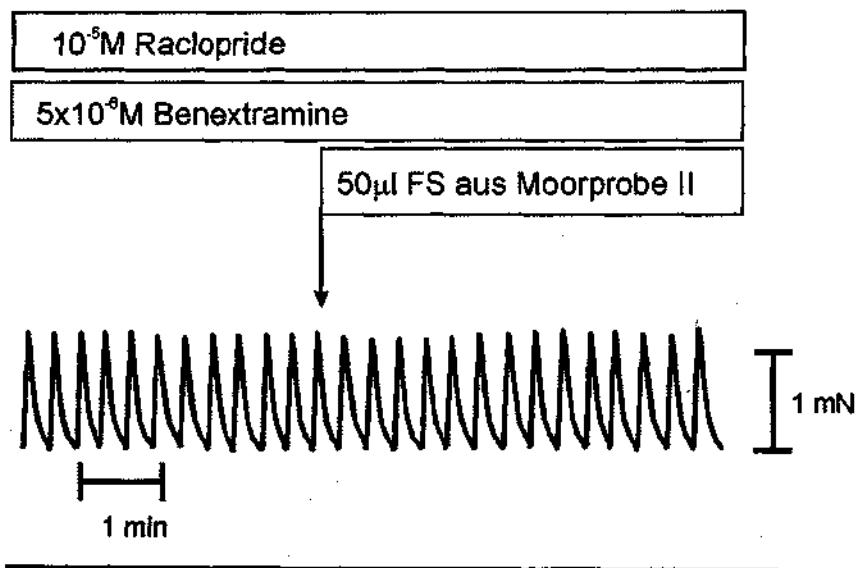
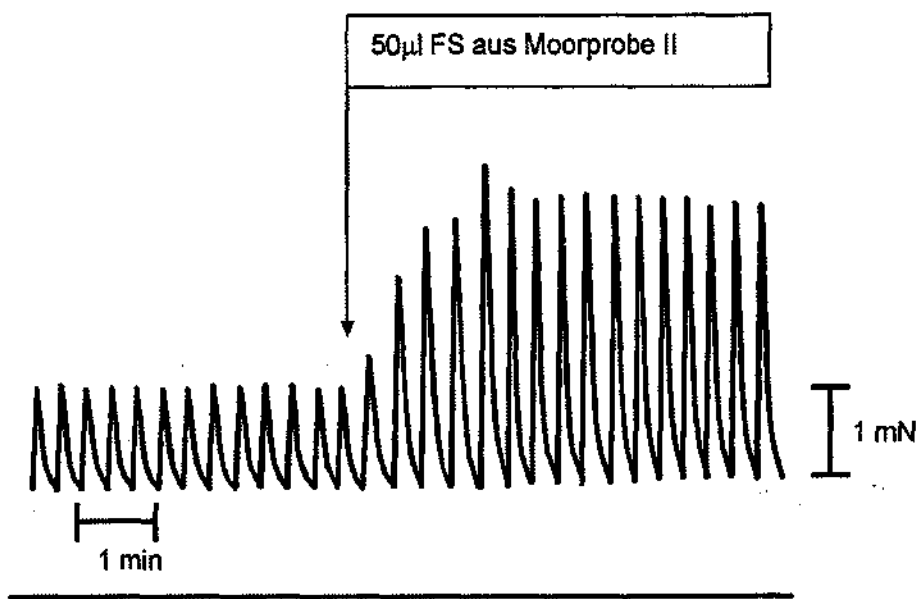


Abb. 34: Wirkung von Fulvinsäure aus 50 µl Moorprobe II auf die SKA der GMS unter normalen Bedingungen (oben) und bei gleichzeitiger Blockade von D₂-Dopaminrezeptoren (10⁻⁵ M Raclopride) und α₂-Adrenorezeptoren (5x10⁻⁶ M Benextramine) (unten)

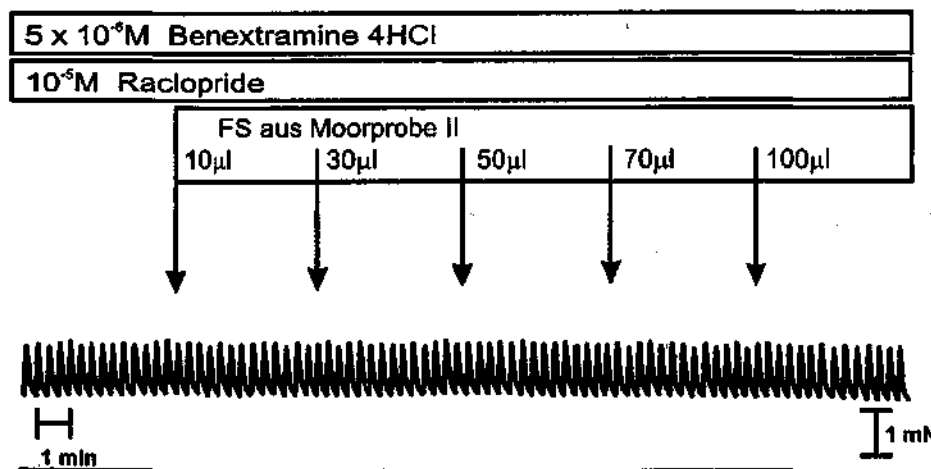
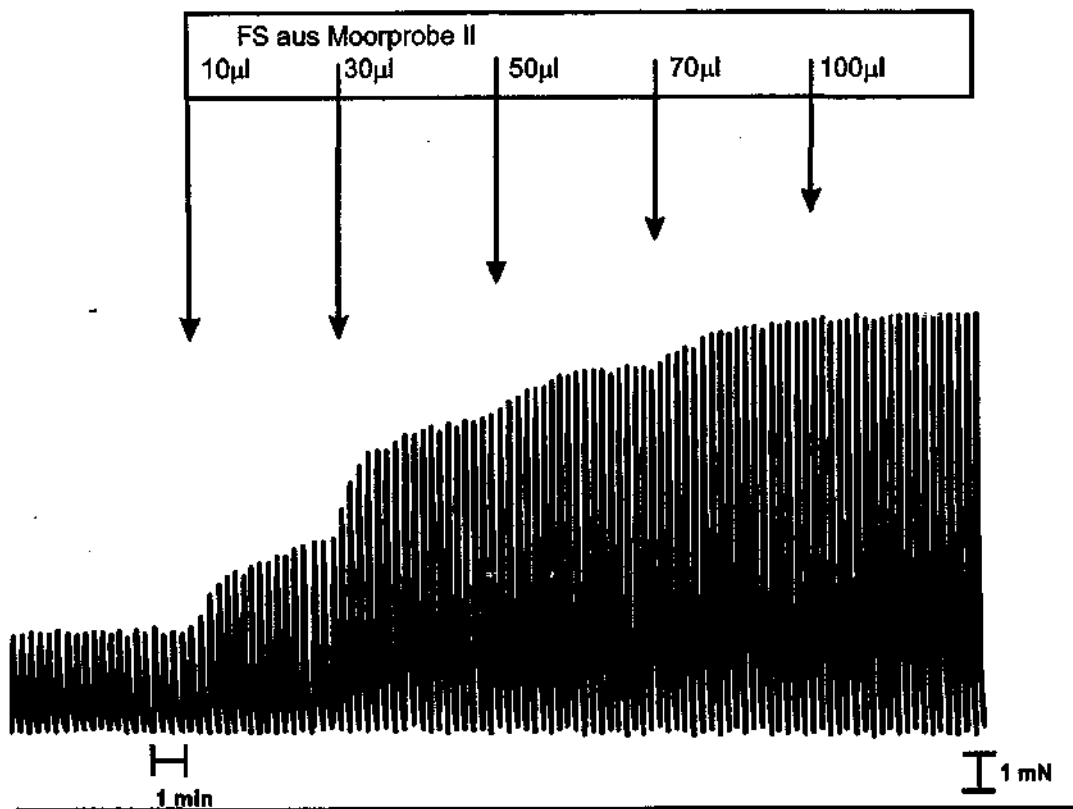


Abb. 35: Wirkungen von Fulvinsäure aus Moorprobe II (10 µl, 30 µl, 50 µl, 70 µl, 100 µl) auf die SKA der GMS unter normalen Bedingungen (oben) und bei gleichzeitiger Blockade der D₂-Dopaminrezeptoren (10⁻⁵ M Raclopride) und α₂-Adrenorezeptoren (5x10⁻⁶ M Benextramine) (unten)

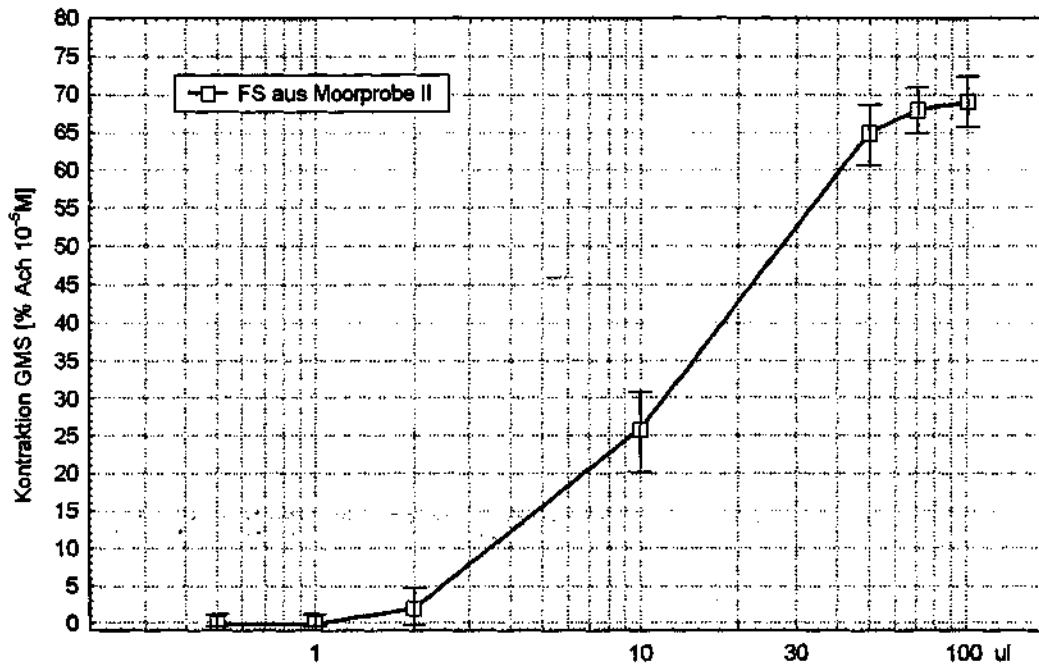


Abb. 36: Dosis-Wirkungskurven von Fulvinsäure aus Moorprobe II (0,5 µl, 1 µl, 2 µl, 10 µl, 50 µl, 70 µl und 100 µl) auf die spontane kontraktile Aktivität der glatten Muskelstreifen des Meerschweinchenmagens

Alle Fulvinsäurefraktionen zeigen vergleichbare Wirkungen. Dies lassen die Ergebnisse von Moorprobe III, wie sie in den Abb. 37, 38 und 39 dargestellt sind, erkennen.

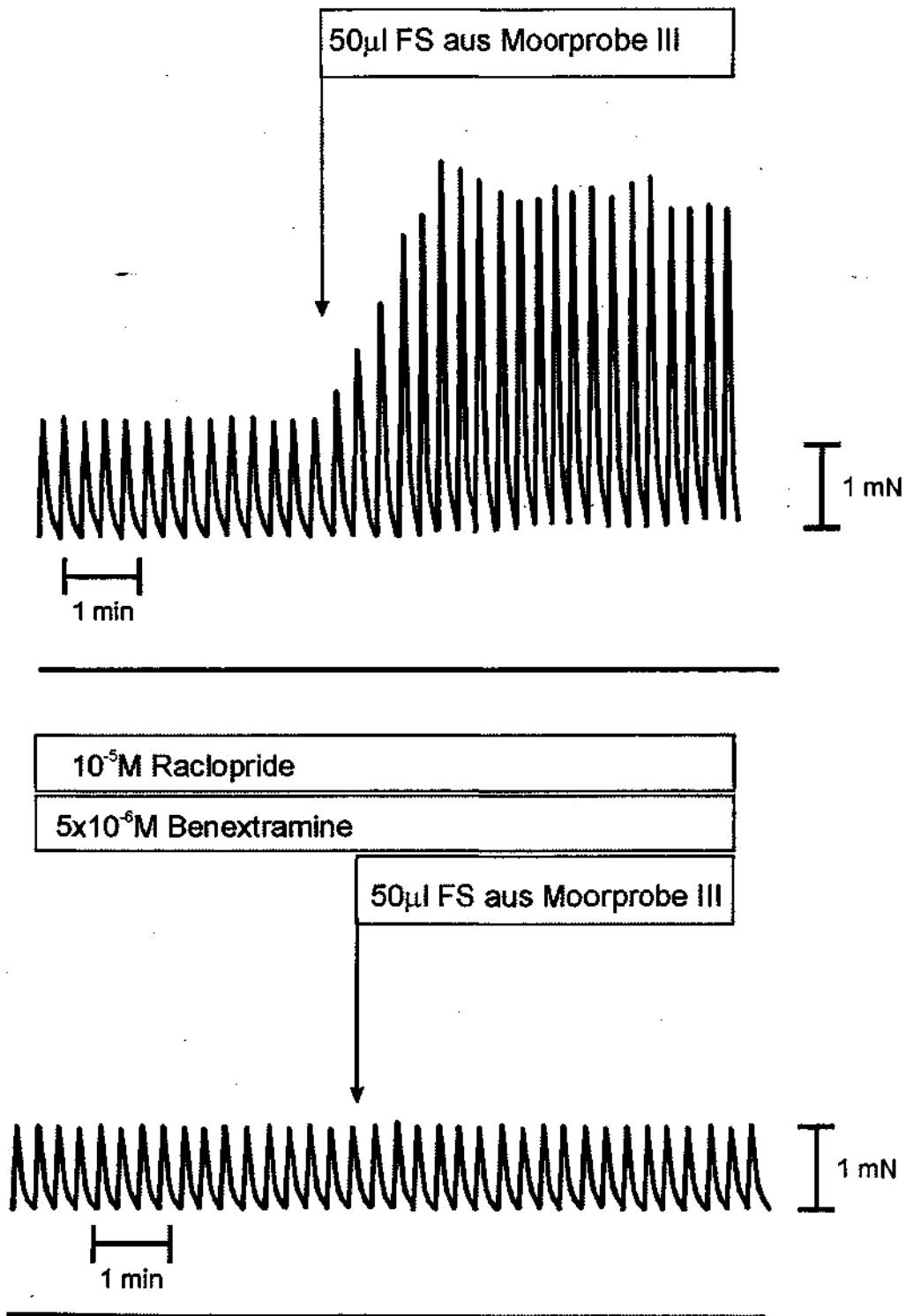


Abb. 37: Wirkung von Fulvinsäure aus 50 µl Moorprobe III auf die SKA der GMS unter normalen Bedingungen (oben) und bei gleichzeitiger Blockade der D₂-Dopaminrezeptoren (10⁻⁵ M Raclopride) und α₂-Adrenorezeptoren (5x10⁻⁶ M Benextramine) (unten)

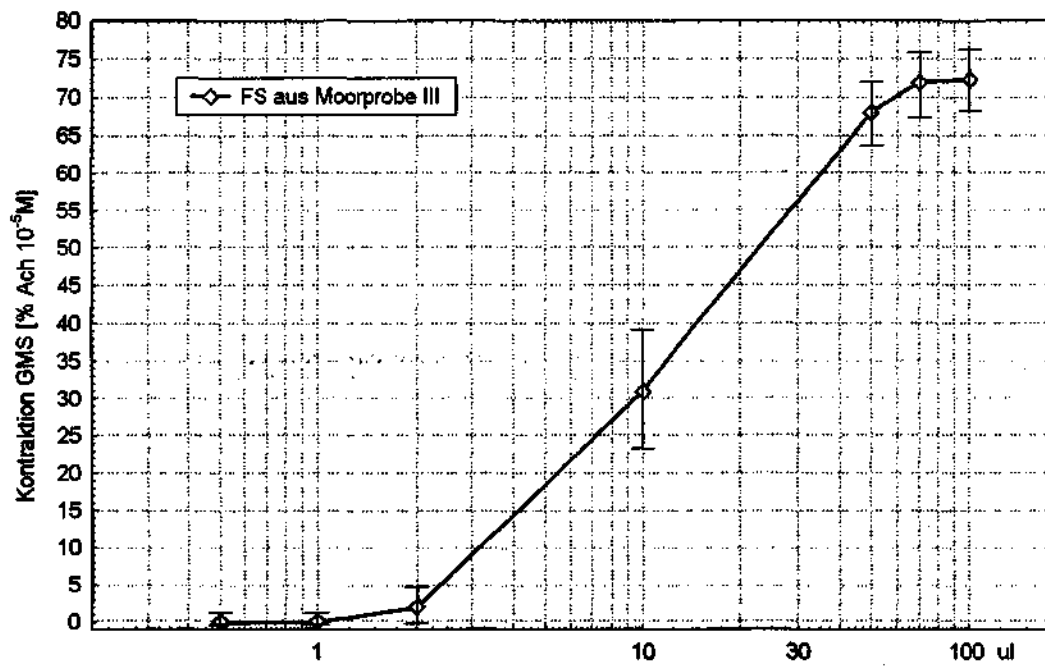


Abb. 38: Wirkungen von Fulvinsäure aus Moorprobe III (10 µl, 30 µl, 50 µl, 70 µl, 100 µl) auf die SKA der GMS unter normalen Bedingungen und bei gleichzeitiger Blockade der D₂-Dopaminrezeptoren (10⁻⁵ M Raclopiride) und α₂-Adrenorezeptoren (5x10⁻⁶ M Benextramine)

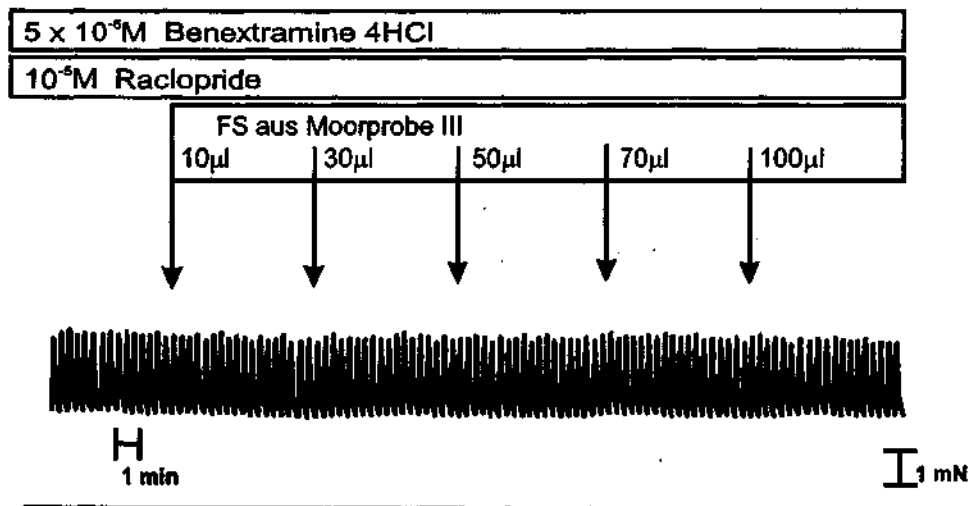
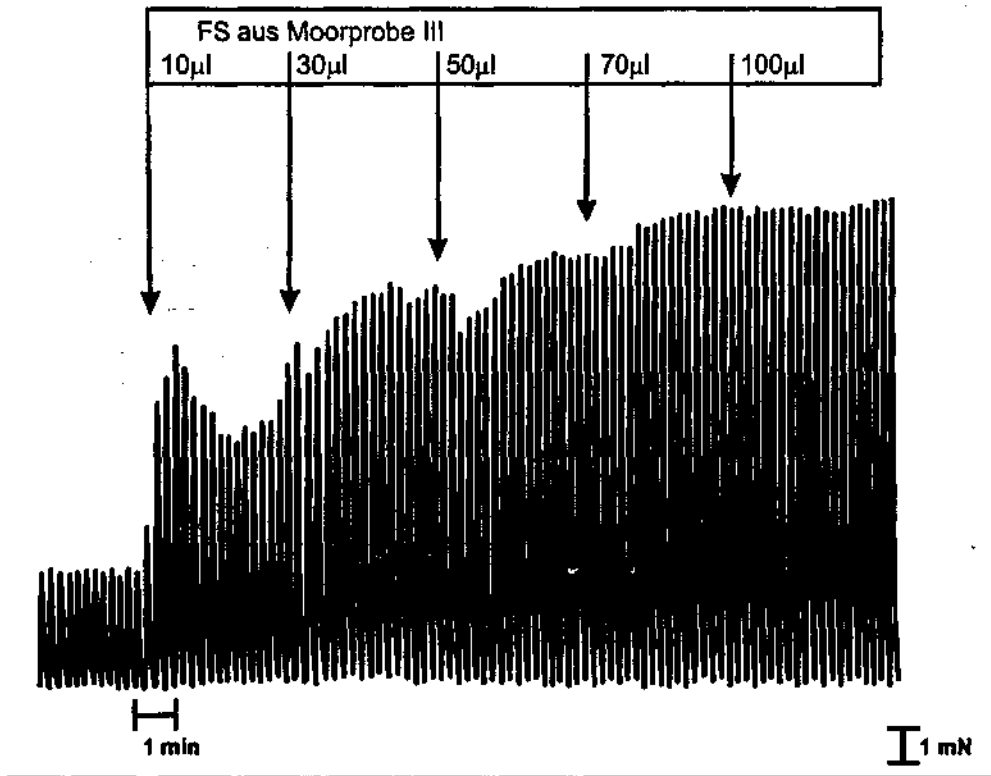


Abb. 39: Dosis-Wirkungskurven von Fulvinsäure aus Moorprobe III (0,5 µl, 1 µl, 2 µl, 10 µl, 50 µl, 70 µl und 100 µl) auf die spontane kontraktile Aktivität der glatten Muskelstreifen des Meerschweinchenmagens

In Abb. 40 sind die Dosis-Wirkungskurven aller drei Fulvinsäurefraktionen aus den Moorproben I-III abgebildet. Im Kurvenverlauf ist zu keinem Zeitpunkt ein statistisch signifikanter Unterschied feststellbar.

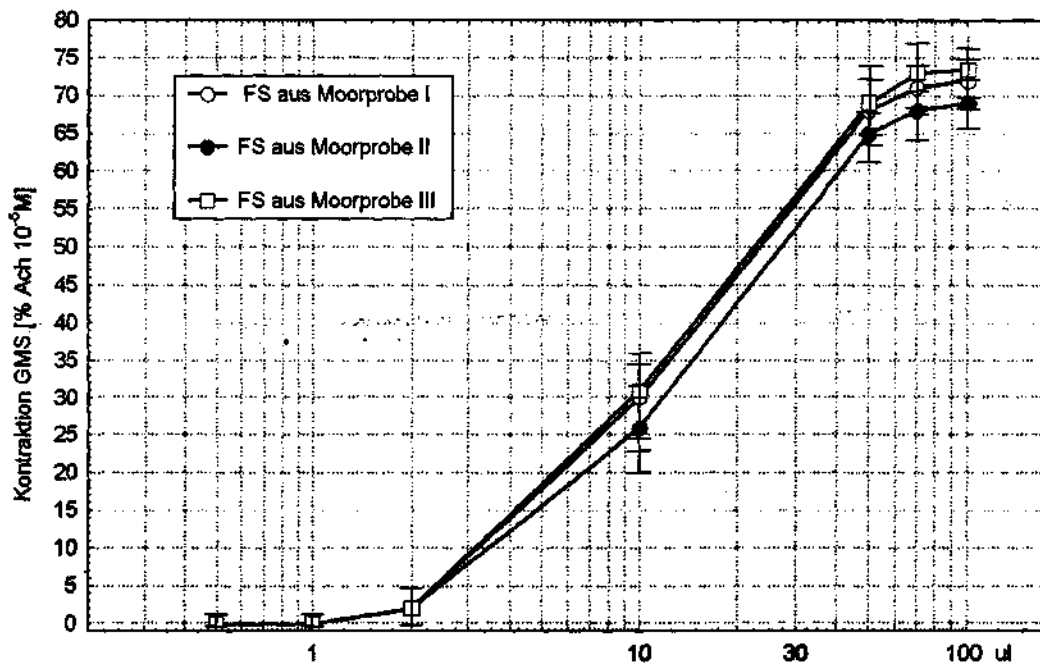


Abb. 40: Dosis-Wirkungskurven von Fulvinsäuren aus den Moorproben I, II und III (0,5 μ l, 1 μ l, 2 μ l, 10 μ l, 50 μ l, 70 μ l und 100 μ l) auf die spontane kontraktile Aktivität der glatten Muskelstreifen des Meerschweinchenmagens

Dass auch die anregenden Wirkungen der Ulminsäuren aller drei Moorproben auf die SKA der GMS demselben Wirkmechanismus wie bei den Fulvinsäuren dargestellt unterliegen, lassen die Abbildungen 41, 42 und 43 erkennen.

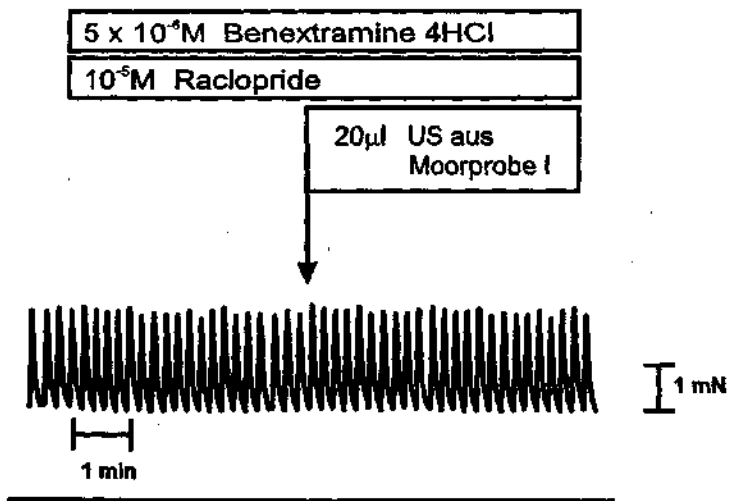
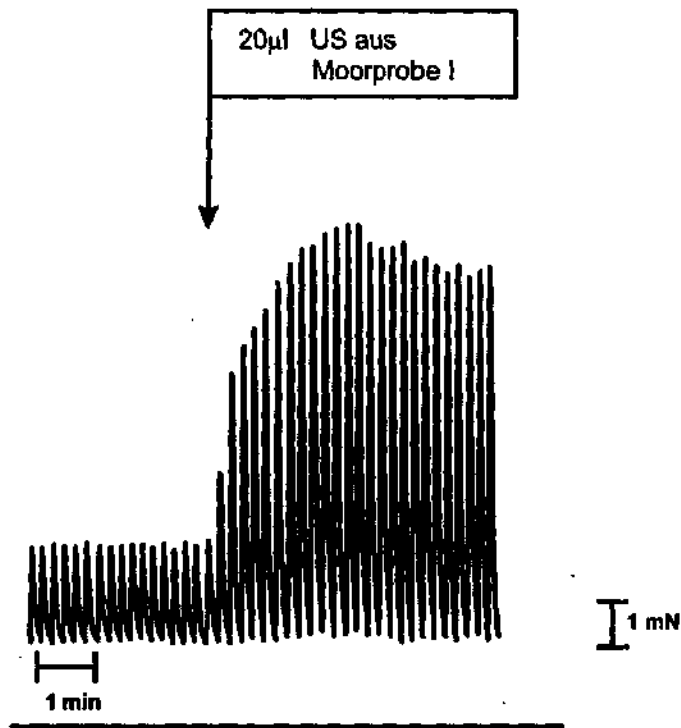


Abb. 41: Wirkung von 20 µl Ulminsäure aus Moorprobe I auf die SKA der GMS unter normalen Bedingungen (oben) und bei gleichzeitiger Blockade der D₂-Dopaminrezeptoren (10⁻⁵ M Raclopride) und α₂-Adrenorezeptoren (5x10⁻⁶ M Benextramine) (unten)

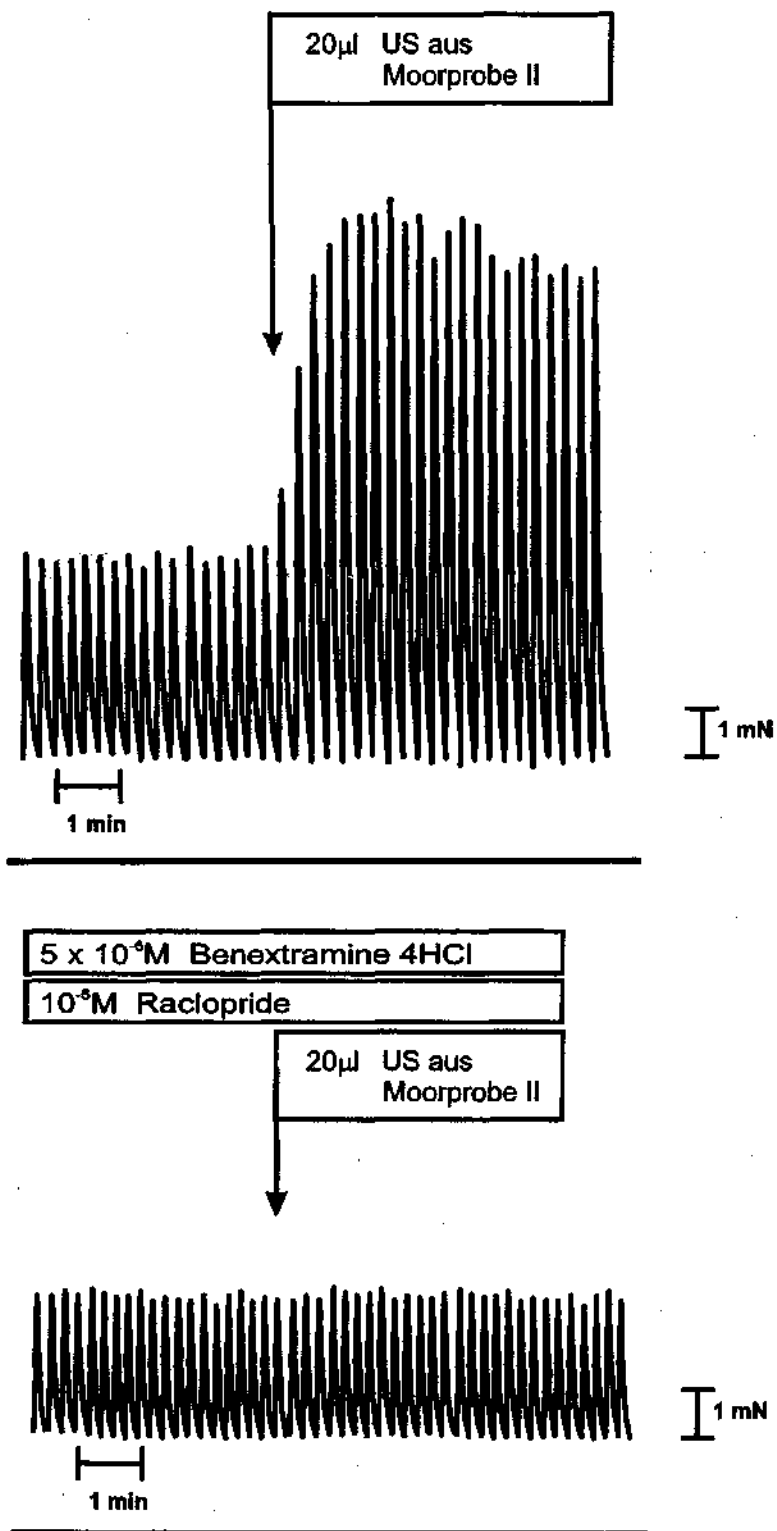


Abb. 42: Wirkung von 20 µl Ulminsäure aus Moorprobe II auf die SKA der GMS bei normalen Bedingungen (oben) und bei gleichzeitiger Blockade der D₂-Dopaminrezeptoren (10⁻⁵ M Raclopride) und α₂-Adrenorezeptoren (5x10⁻⁶ M Benextramine) (unten)

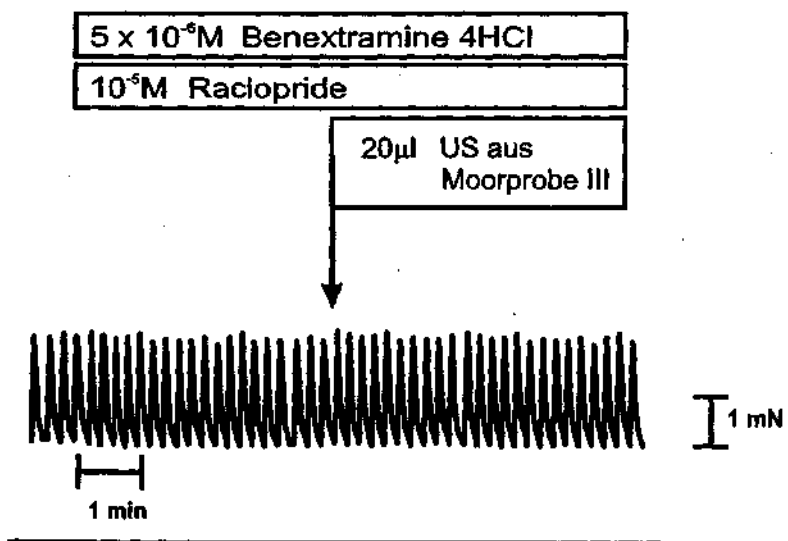
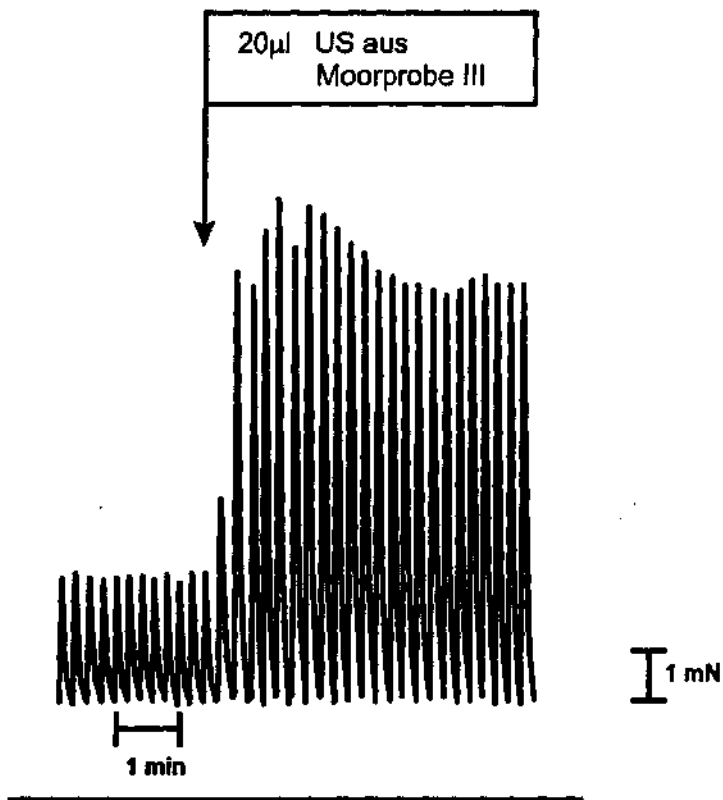


Abb. 43: Wirkung von 20 µl Ulminsäure aus Moorprobe III auf die SKA der GMS bei normalen Bedingungen (oben) und bei gleichzeitiger Blockade der D₂-Dopaminrezeptoren (10⁻⁵ M Raclopride) und α₂-Adrenorezeptoren (5x10⁻⁶ M Benextramine) (unten)

Die Dosis-Wirkungskurven bezüglich der Ulminsäuren, isoliert aus den Moorproben I-III, zeigen ebenfalls (vgl. Abb. 40) keine signifikanten Unterschiede im Kurvenverlauf (Abb. 44).

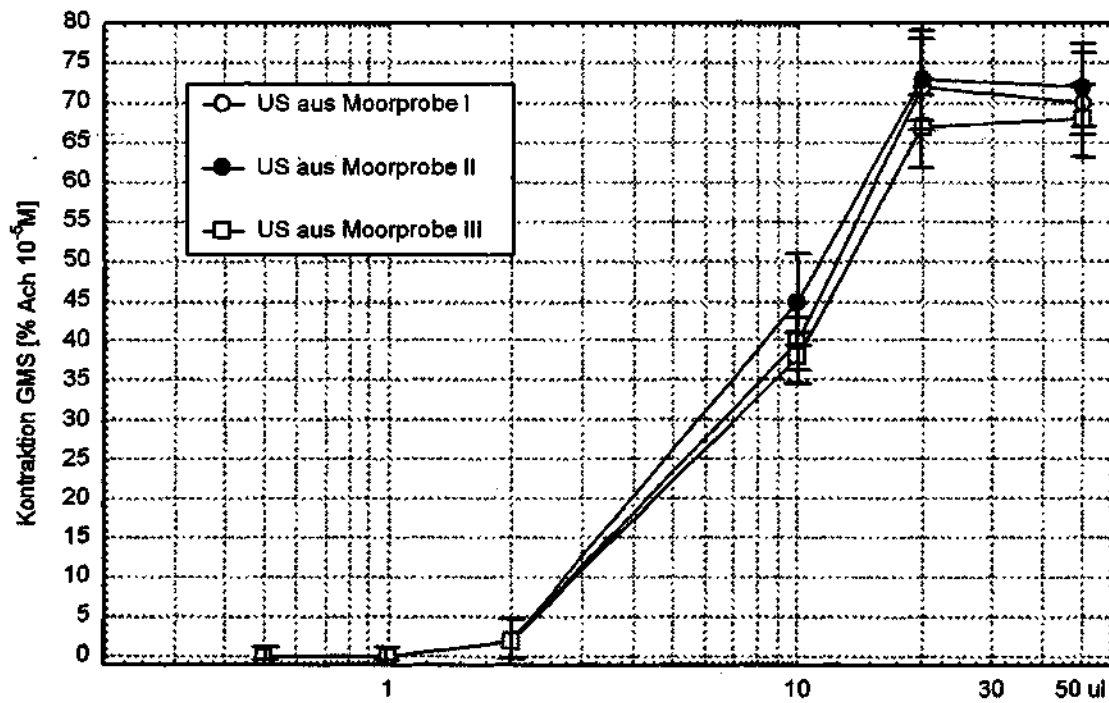


Abb. 44: Dosis-Wirkungskurven von Ulminsäuren aus den Moorproben I, II und III (0,5 μ l, 1 μ l, 2 μ l, 10 μ l, 20 μ l und 50 μ l) auf die spontane kontraktile Aktivität der glatten Muskelstreifen des Meerschweinchenmagens

4.4 Untersuchungen mit längerfristige Einwirkzeiten wässriger Extrakte der Moorproben I, II und III und der aus ihnen isolierten Fulvin- und Ulminsäuren

Im Rahmen der Analytik der pharmakologischen Eigenschaften von Torfextrakten kommt längerfristigen Einwirkzeiten auf GMS eine besondere Bedeutung zu. Dies liegt an den Besonderheiten der Adreno- und Dopaminrezeptoren. Wie in der Einführung (vgl. Kap. 2) bereits dargestellt, wird bei längerfristigen Einwirkzeiten von α_2 -Adrenoagonisten wie z.B. p-iodoclonidine eine Inaktivierung der α_2 -Rezeptoren registriert. Dies ist auch bei längerfristigen Einwirkzeiten von endogenen α_2 -Agonisten wie z.B. Noradrenalin zu beobachten (Abb. 5 und 6). Möchte man daher eine Substanz bezüglich ihrer agonistischen oder partialagonistischen Wirkungen einschätzen, ist es unumgänglich die längerfristigen Wirkungen dieser Substanz an der glatten Muskulatur zu analysieren.

Abb. 45 zeigt die Ergebnisse nach längerfristigen Einwirkzeiten von WEMP I, Fulvin- und Ulminsäuren der Moorprobe I. Es zeigt sich, dass die anregenden Wirkungen der Fulvinsäuren erst nach einer 273-minütigen Einwirkzeit abklingen, während die Wirkungen der Ulminsäure im wesentlichen schon nach 63 Minuten abnehmen. Die Unterschiede lassen deutlich erkennen, dass Fulvinsäuren eine rein agonistische Wirkung haben, während die Ulminsäuren eine deutlich ausgeprägte partialagonistische Wirkung zeigen. Bei WEMP I nimmt die anregende Wirkung nach 183 Minuten ab, also ca. 120 Minuten später als bei den Ulminsäuren. Die Erklärung für dieses Phänomen ergibt sich daraus, dass WEMP I eine Mischung wasserlöslicher Komponenten von Fulvin- und Ulminsäuren enthält. Da die Fulvinsäuren in 5-6-mal höheren Konzentrationen enthalten sind, sind sie in ihrer Wirkung dominierend.

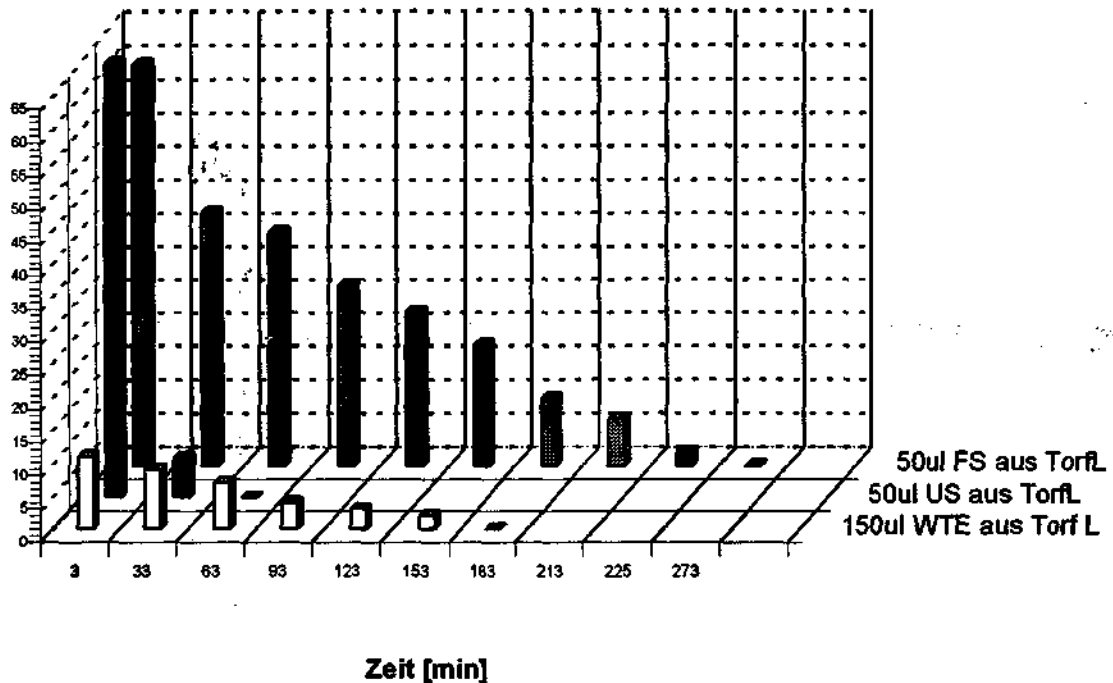


Abb. 45: Längerfristige Einwirkzeiten von WEMP I (150 μ l) \square , 20 μ l Ulminsäure aus Moorprobe I \blacksquare und 50 μ l Fulvinsäure aus Moorprobe I \blacksquare auf die SKA der GMS

Im Gegensatz hierzu zeigen die Ergebnisse der längerfristigen Wirkungen von Moorprobe II (Abb. 46) einen wesentlich stärkeren Einfluss der Ulminsäuren. Bei diesen Untersuchungen mit Fulvinsäure der Moorprobe II und WEMP II tritt der selbsthemmende Effekt zeitlich früher ein, nämlich nach 225- und 123- minütiger Einwirkzeit.

Die Ergebnisse bezüglich der Untersuchung von längerfristigen Einwirkzeiten von WEMP III, Fulvinsäuren III und Ulminsäure III zeigen ein deckungsgleiches Bild mit Moorprobe I, Fulvinsäure I und Ulminsäure I (Abb. 47).

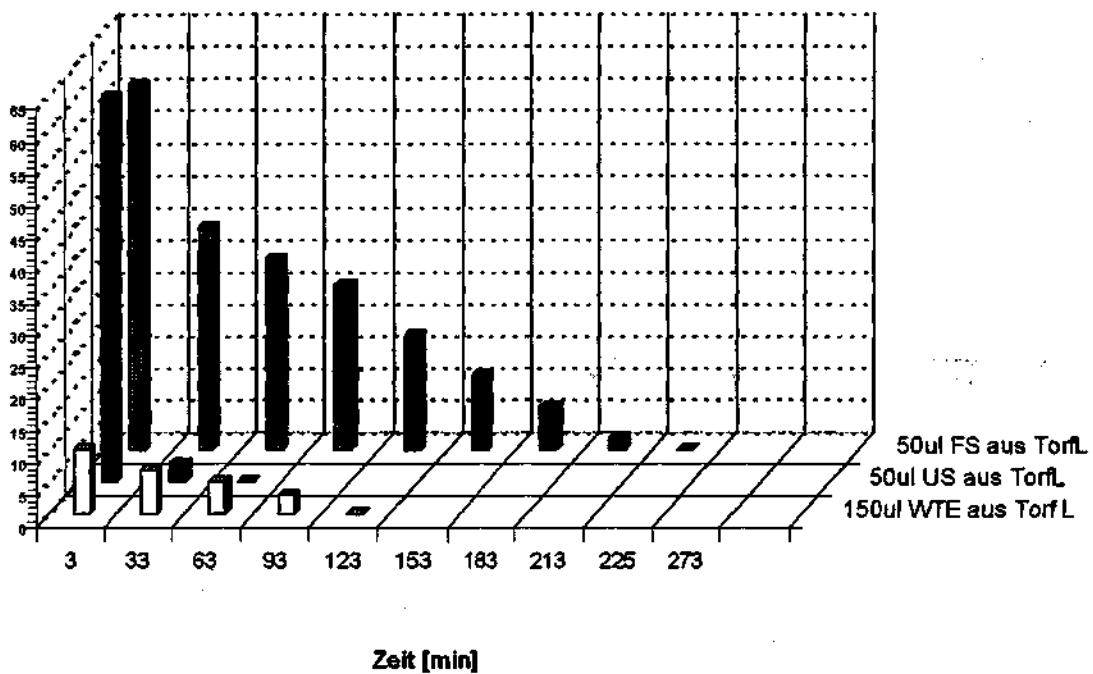


Abb. 46: Längerfristige Einwirkzeiten von WEMP II (150 μ l) \square , 20 μ l Ulminsäure aus Moorprobe II \blacksquare und 50 μ l Fulvinsäure aus Moorprobe II \blacksquare auf die SKA der GMS

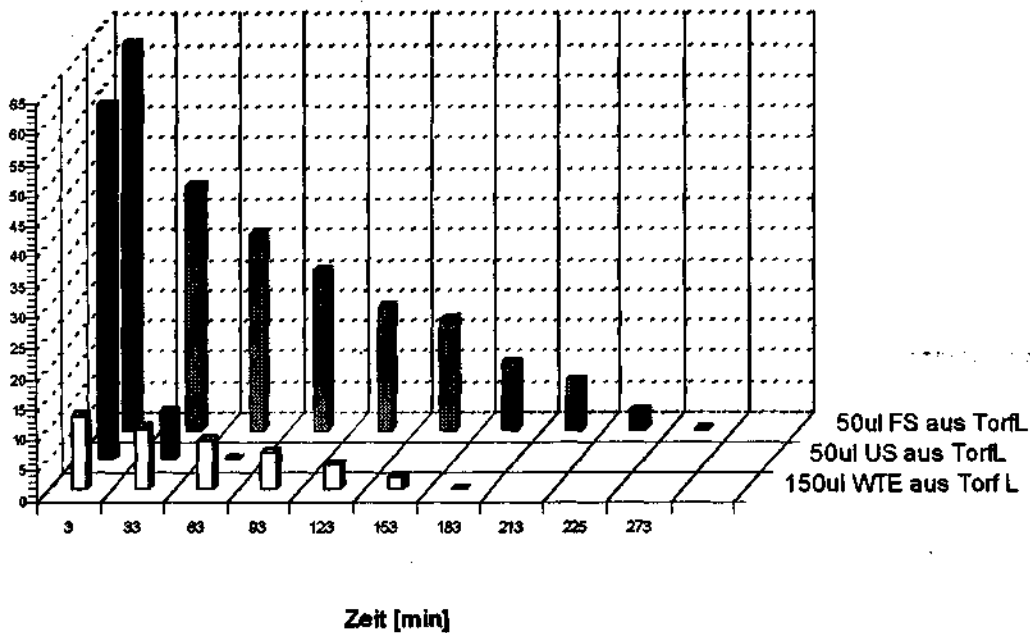


Abb. 47: Längerfristige Einwirkzeiten von WEMP III (150 µl) , 20 µl Ulminsäure aus Moorprobe III und 50 µl Fulvinsäure aus Moorprobe III auf die SKA der GMS.

Die Ergebnisse zeigen, dass die Moorproben I und III sich entsprechend ihrer pharmakologischen Eigenschaften nahezu identisch verhalten, da ihre selbsthemmenden Effekte im Vergleich zu WEMP II und Fulvinsäuren II in Bezug auf WEMP I, Fulvinsäure I, WEMP III und Fulvinsäure III erst später eintreten. Somit zeigen diese Fraktionen eine sehr gut ausgeprägte agonistische Wirkung auf die α_2 -Adrenorezeptoren. Bei einer längerfristigen Einwirkzeit von WEMP II und Fulvinsäure II zeigen sich die Wirkungen der Ulminsäure II stärker ausgeprägt. Dies erklärt warum die selbsthemmenden Effekte früher registriert werden können.

5 Schlussfolgerungen

1. Der Torfbrei, den man in den Bädern Bad Kohlgrub und Bad Bayersoien medizinisch anwendet, ist ein wertvolles Naturprodukt mit sehr hoher biologischer Aktivität. Alle drei Moorproben enthalten wasserlösliche Substanzen, die agonistische Wirkungen auf die α_2 -Adreno- und D₂-Dopaminrezeptoren zeigen .
2. Der erhöhte Gehalt in den untersuchten Moorproben an wasserlöslichen Fulvin- und Ulminsäuren der mehrere Male höher ist als in bisher untersuchten Moorarten, ist eine wesentliche Voraussetzung für die Beschleunigung der Hautpermeation, die dementsprechend zu einem höheren therapeutischen Effekt führen kann.
3. Der erhöhte Gehalt an Fulvin- und Ulminsäuren in den Moorproben (durchschnittlich über 170 mg/g wasserfreier Torf) zeigt, dass diese eine geeignete Ausgangssubstanz für Torfprodukte sind, die in der kosmetischen Industrie zum Einsatz kommen.
4. Alle drei Torfstichproben zeigen eine hohe biologische Aktivität und sind für die medizinische Nutzung geeignet.
5. Die jeweils eingesetzten Wasserquellen zur Torfbreivorbereitung zeigen keinen Einfluss auf die spontane kontraktile Aktivität der glatten Muskulatur und ändern nicht die pharmakologischen Eigenschaften der untersuchten Moorproben.
6. Die guten Erfahrungen, die in Bad Kohlgrub mit der Behandlung von Kinderwunschpatientinnen vorliegen, können durch die Untersuchungsergebnisse bestätigt werden.
7. Die Ergebnisse bieten eine gute Grundlage für künftige gezielte klinische Studien.

6 Anhang

6.1 Der Einfluss der Temperatur bei der Zubereitungstechnologie von Badetorf

Es ist bekannt, dass, je höher die Temperatur von Torfbrei bei der klinischen Anwendung, desto stärker seine thermische Wirkung ist.

Neben den thermischen Effekten verstärken sich aber auch die chemischen Wirkungen von Moor.

Aus unseren Vorarbeiten ist bekannt, dass eine Voraberwärmung von Torfbrei vor der klinischen Anwendung dessen biologische Aktivität steigert. Zum einen beschleunigt die erhöhte Temperatur die Diffusionsprozesse, zum anderen kommt es durch die Aktivierung der Schweißdrüsen zur Beschleunigung der Hautpermeation und erfahrungsgemäß zu einer ausgeprägteren klinischen Wirksamkeit.

Eine zusätzliche Wirkung stellt in diesem Kontext die Löslichkeit von Fulvin- und Ulminsäuren dar. Beide Säuren sind schwer löslich, wobei deren Löslichkeit durch eine Temperaturerhöhung zunimmt. Sind die Substanzen einmal gelöst, verbleiben diese Substanzen in gelöstem Zustand, wenn auch der Torfbrei niedrigere Temperaturen annimmt.

Dies beeinflusst aber nicht die biologische Aktivität des Torfbreies.

Auf Abb. 48 ist das Verfahren der Voraberwärmung von Torfbrei dargestellt. Man erkennt eine Erhöhung der mittleren Werte der wasserlöslichen Substanzen von 1,2 auf 1,7.

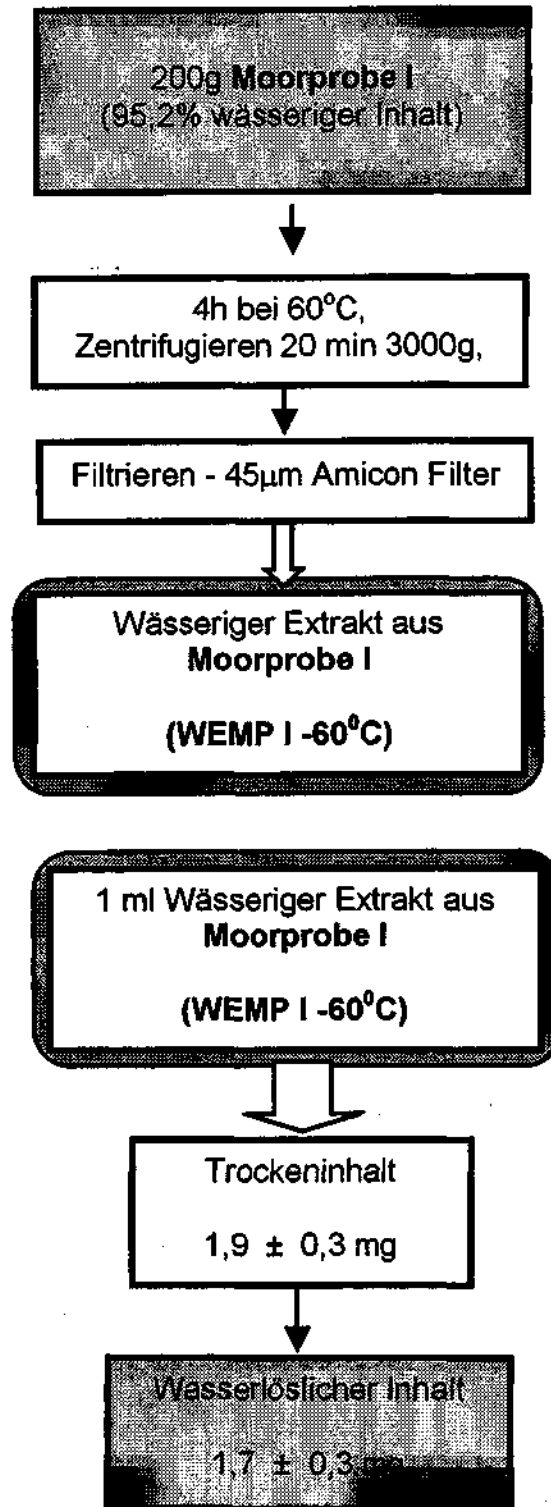
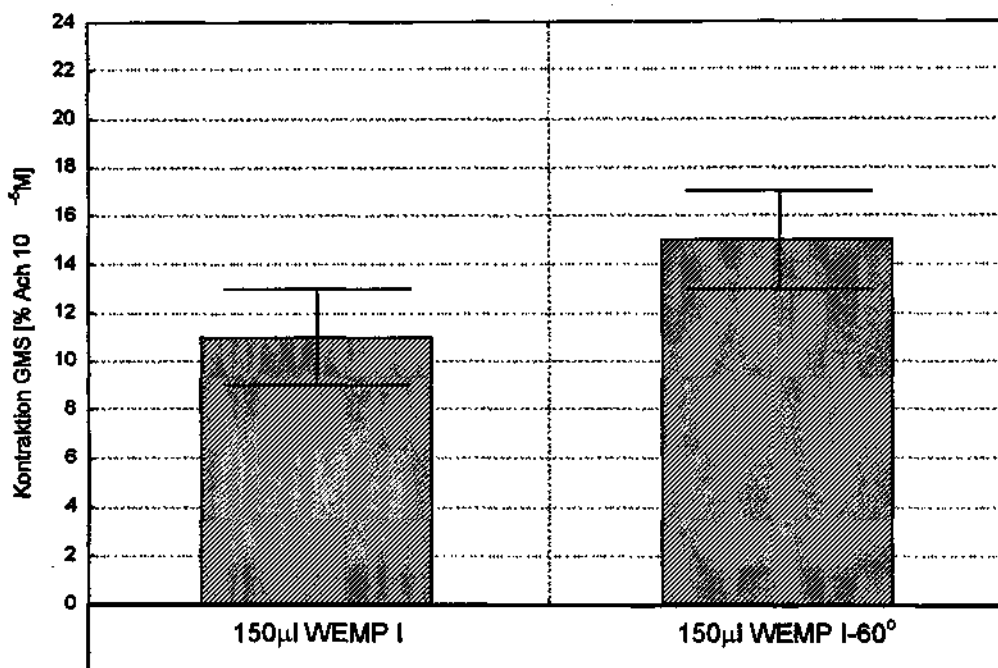


Abb. 48: Herstellung von wässrigem Extrakt bei 60°C aus Moorprobe I (oben), Bestimmung von Konzentrationen der wasserlöslichen Komponenten von WEMP I-60°C I (unten)

Noch deutlicher sind die Unterschiede auf Abb. 49 zu erkennen. Die Dosis-Wirkungskurven beider wässrigen Extrakte verlaufen parallel und erreichen Maximaleffekte, die sich aber statistisch nicht signifikant unterscheiden. Bei niedrigen Konzentrationen hingegen sind die Unterschiede statistisch signifikant. So ist beispielsweise die anregende Wirkung von 100 µl WEMP I bei 26° C auf die SKA der GMS etwa fünfmal geringer als die Wirkung von 100 µl WEMP I bei 60° C. Da bei höheren Konzentrationen Sättigungseffekte erreicht werden, unterscheiden sich die Ergebnisse nicht mehr statistisch signifikant. Die erhöhte biologische Aktivität des Torfbreies bleibt auch noch nach mehreren Stunden (bis 24 Stunden sicher nachweisbar) bei Zimmertemperatur erhalten. Die Ergebnisse zeigen demnach, dass eine Voraberwärmung des Torfbreies zu empfehlen ist. Dies führt zu einer deutlichen Steigerung der biologischen Aktivität des Torfbreies und verbessert mit an Sicherheit grenzender Wahrscheinlichkeit die klinische Wirksamkeit.



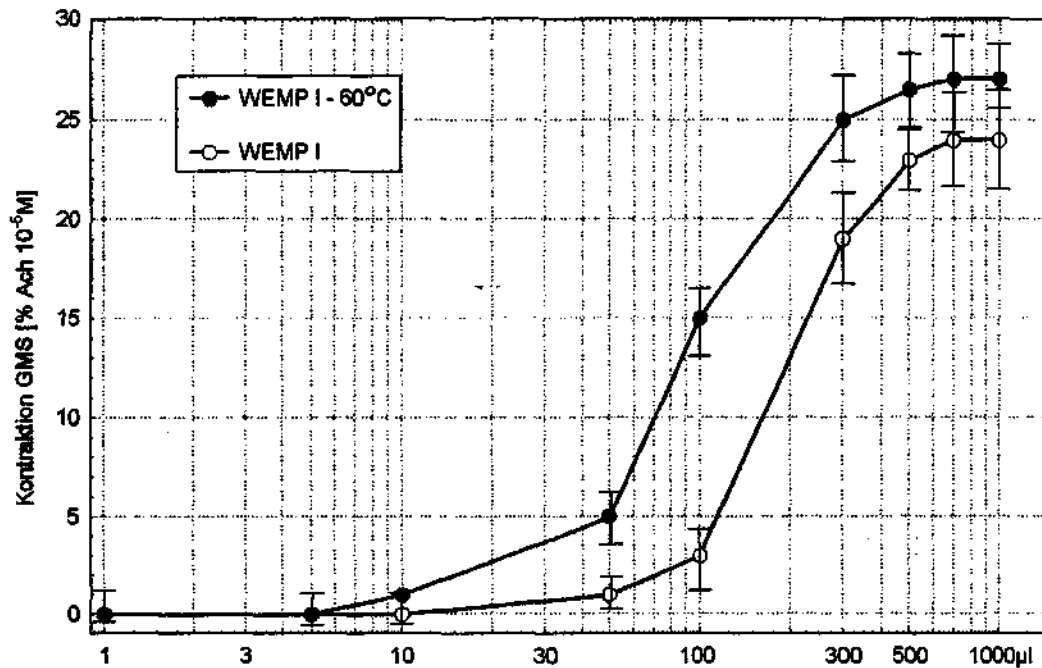


Abb. 49: Wirkungen von 150 µl WEMP I und 150 µl WEMP I 60° C (oben), Dosis-Wirkungskurven von wässrigem Torfextrakt von Moorprobe I, WEMP I und WEMP I 60° C auf die spontane kontraktile Aktivität der glatten Muskelstreifen des Meerschweinchenmagens (unten)

6.2 Der Einfluss des Verdünnungsmediums bei der Zubereitung von Badetorf: Vergleich zweier Moorproben

Die Eigenschaften des Verdünnungsmediums, hier Wasser, sind für die pharmakologischen Eigenschaften von Torfbrei entscheidend. In den vorliegenden Untersuchungen konnten wir zeigen, dass die Wasserquellen, die in den Bädern Bad Kohlgrub und Bad Bayerstein zur Aufbereitung des Badetorfes genutzt werden, die pharmakologischen Eigenschaften des Torfbreies nicht beeinflussen.

Abb. 50 zeigt das Verfahren zur Herstellung von Torfbrei mit destilliertem Wasser.

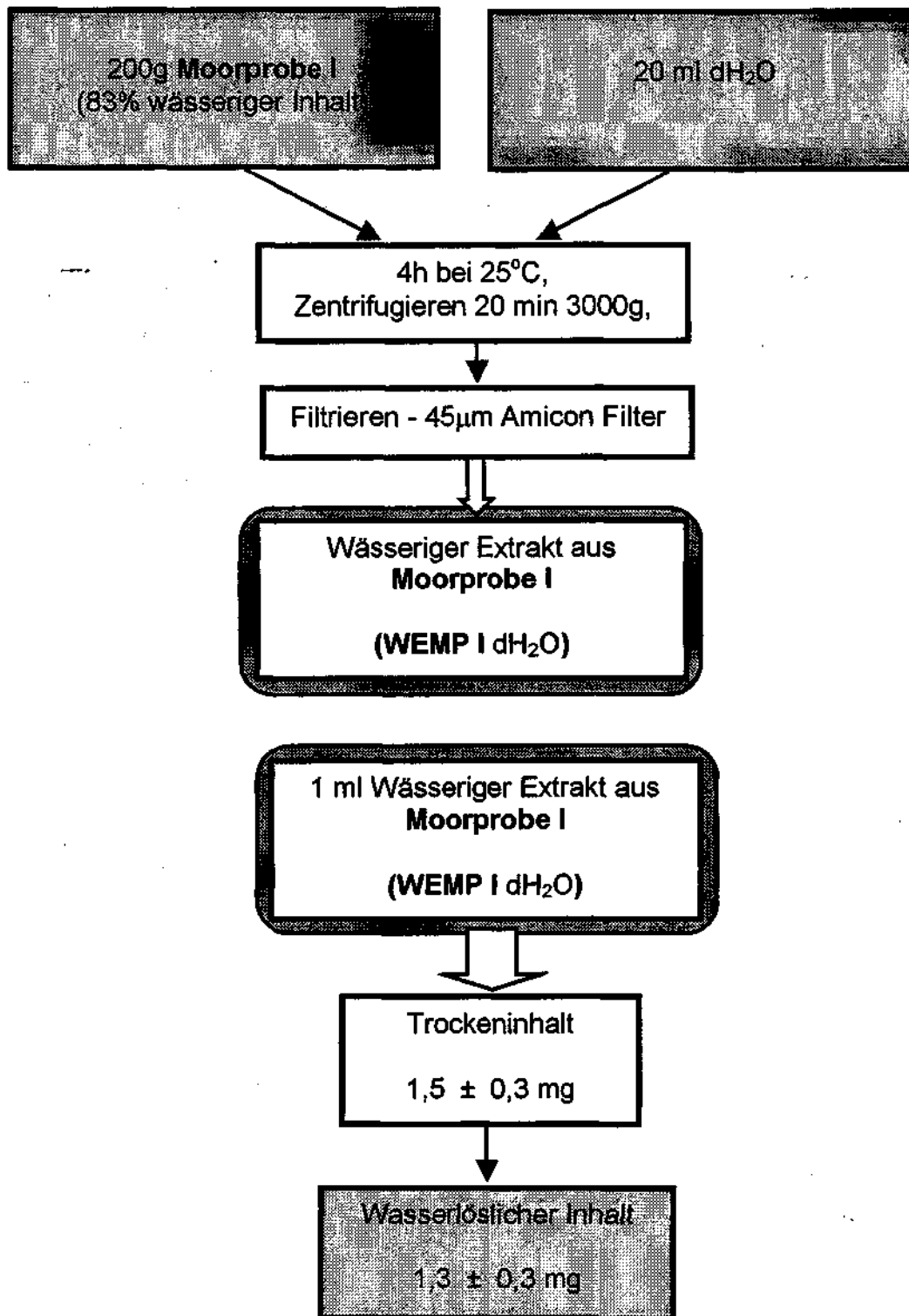


Abb. 50: Herstellung von wässrigem Extrakt aus Moorprobe I vorbereitet mit destilliertem Wasser (H₂O) (oben), Bestimmung der Konzentrationen der wasserlöslichen Komponenten von WEMP I (H₂O) (unten)

Die Dosis-Wirkungskurven beider wässriger Extrakte sind auf Abb. 51 dargestellt. Beide Kurvenverläufe sind deckungsgleich. Dies ist der Nachweis dafür, dass die pharmakologischen Eigenschaften des Torfbreies, vorbereitet mit Wasser der Quellen I-III, nicht verändert sind.

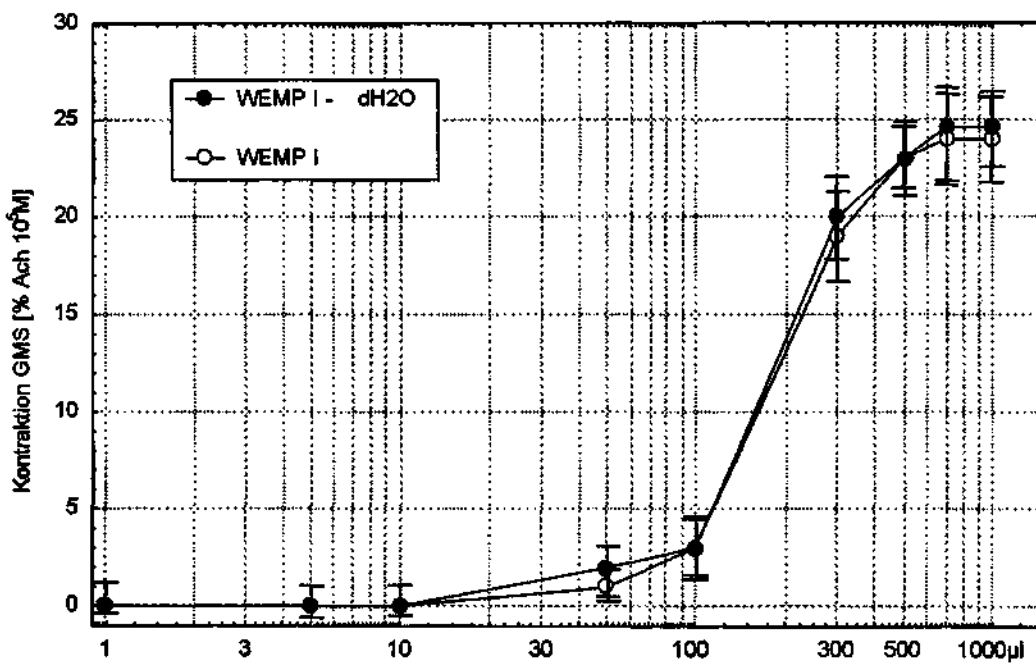
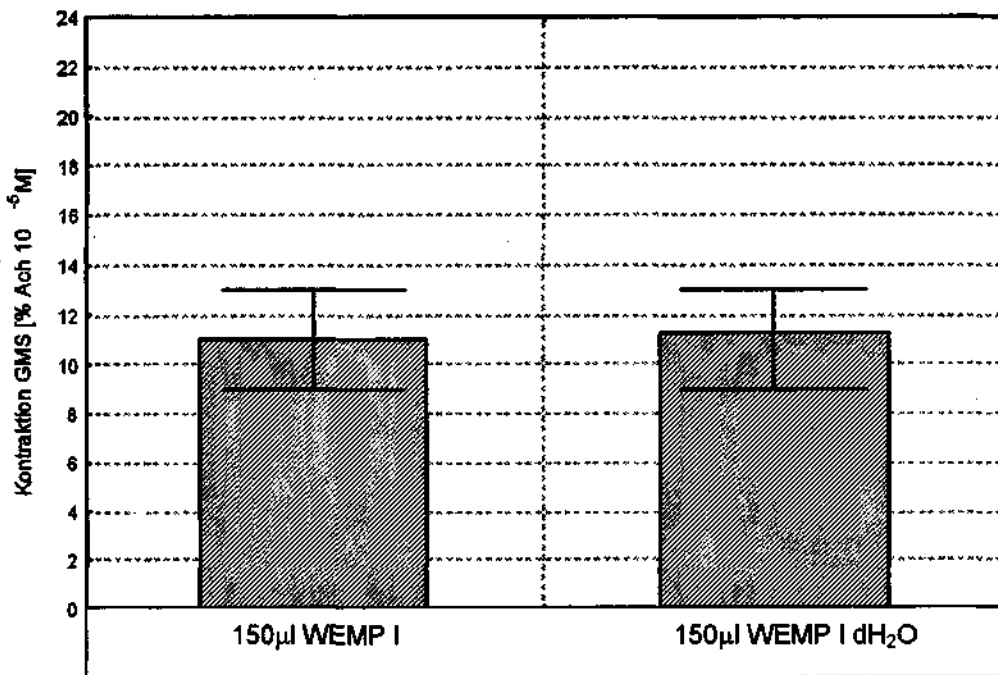


Abb. 51: Wirkungen von 150 µl WEMP I und 150 µl WEMP I (H₂O) (oben), Dosis-Wirkungskurven von wässrigem Moorextrakt von Moorprobe I, WEMP I und WEMP I (H₂O) auf die spontane kontraktile Aktivität der glatten Muskelstreifen des Meerschweinchenmagens (unten)

Die Untersuchungen wurden gemeinsam von

-Priv. Doz. Dr. med. André-Michael Beer* (Hattingen),

-Prof. Dr. med. habil Julian Lukanov** (Med. Hochschule, Plovdiv, Bulgarien) und

-Dr. Plamen Sagortchev** (Plovdiv, Bulgarien)

durchgeführt.

*Modellabteilung für Naturheilkunde
der Klinik Blankenstein
und Balneologisches Institut Bad Kissingen
Im Vogelsang 5-11
45527 Hattingen

**Department of Biophysics, Med. University, 4000 Plovdiv, v. Aprilov Str. Nr. 15 A,
Bulgaria