

**Das Kommunikationsnetzwerk säuresensibler  
Ionenkanäle mit dem Serotoninsystem und die Rolle  
von Calciumflüssen bei Refluxösophagitis**

Inaugural-Dissertation

zur Erlangung des Doktorgrades

der Hohen Medizinischen Fakultät

der Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität

Bonn

**Lisa Welslau**

aus Paderborn

2024

Angefertigt mit der Genehmigung  
der Medizinischen Fakultät der Universität Bonn

1.Gutachterin: PD. Dr. Gudrun Ulrich-Merzenich  
2.Gutachter: Prof. Dr. Dieter Lütjohann

Tag der Mündlichen Prüfung: 29.08.2024

Aus der Medizinischen Klinik III

Direktor: Prof. Dr. med. Brossart

## Bücher

„Alle Bücher dieser Welt

Bringen dir kein Glück,

Doch sie weisen dich geheim

In dich selbst zurück.

Dort ist alles, was du brauchst,

Sonne, Stern und Mond,

Denn das Licht, danach du frugst,

In dir selber wohnt.

Weisheit, die du lang gesucht

In den Büchereien,

Leuchtet jetzt auch jedem Blatt-

Denn nun ist sie dein.“

Hermann Hesse



## Inhaltsverzeichnis

|   |    |
|---|----|
| Abkürzungsverzeichnis .....   | 9  |
| 1. Einleitung.....  | 12 |
| 1.1 Gastroösophageale Refluxkrankheit (GERD).....                                   | 12 |
| 1.1.1 Definition.....   | 12 |
| 1.1.2 Epidemiologie .....   | 13 |
| 1.1.3 Ätiologie .....   | 15 |
| 1.1.4 Pathogenese.....  | 16 |
| 1.1.5 Klinik .....  | 19 |
| 1.1.6 Diagnostik .....  | 19 |
| 1.1.7 Therapie.....   | 21 |
| 1.2 Säureempfindliche Ionenkanäle ( <i>Acid-sensing ion channels</i> ; ASICs) ..... | 24 |
| 1.2.1 Einführung .....  | 24 |
| 1.2.2 <i>Acid-sensing ion channels</i> (ASICs) und Schmerz.....                     | 26 |
| 1.2.3 <i>Acid-sensing ion channels</i> (ASICs) im Gastrointestinal-Trakt.....       | 27 |
| 1.3 Serotonin .....   | 30 |
| 1.3.1 Wirkung von Serotonin im Ösophagus .....                                      | 31 |
| 1.3.2 Kommunikation zwischen Magendarmtrakt und Gehirn.....                         | 32 |
| 1.4 Iberogast classic® (STW 5).....   | 33 |
| 1.4.1 Anwendungsbereiche und Indikation .....                                       | 34 |
| 1.4.2 Wirkungsweise.....  | 35 |
| 1.5 Multitargetwirkung von Pflanzen.....  | 38 |
| 1.5.1 Multitargetwirkung von STW 5 am Beispiel des Reizdarmsyndroms .....           | 38 |
| 1.6 Synergie .....  | 39 |
| 1.7 Fragestellung.....  | 43 |
| 2. Material und Methoden.....   | 45 |

|       |   |    |
|-------|---|----|
| 2.1   | Zellen.....   | 45 |
| 2.1.1 | Fibroblasten .....  | 45 |
| 2.1.2 | <i>Human Intestinal Smooth Muscle Cells (HISMC)</i> .....   | 45 |
| 2.2   | Humane Proben .....   | 45 |
| 2.3   | Medikamente.....  | 45 |
| 2.4   | Chemikalien und Reagenzien.....   | 46 |
| 2.4.1 | Chemikalien .....   | 46 |
| 2.4.2 | Lösungen .....  | 48 |
| 2.4.3 | Wachstumsmedium .....   | 51 |
| 2.5   | Kits .....  | 51 |
| 2.6   | Antikörper.....   | 53 |
| 2.7   | Untersuchung der Expression von <i>Acid-sensing ion channels</i> (ASICs), 5-Hydroxytryptamin-Rezeptor-Subtypen (5-HTR) und Serotonintransporter (SERT) in Rattenösophagi..... | 55 |
| 2.7.1 | Versuchsaufbau.....   | 55 |
| 2.7.2 | Probengewinnung.....  | 56 |
| 2.7.3 | RNA-Isolierung .....  | 57 |
| 2.7.4 | Gelelektrophorese und Western Blotting .....  | 58 |
| 2.8   | Zellkulturmethoden.....   | 59 |
| 2.8.1 | Allgemeine Zellkulturmethoden.....  | 59 |
| 2.8.2 | Auftauen der Zellen .....   | 60 |
| 2.8.3 | Passagieren der Zellen.....   | 60 |
| 2.8.4 | Einfrieren der Zellen und Lagerung .....  | 60 |
| 2.8.5 | Zellzählung .....   | 60 |
| 2.9   | Zell-Viabilitäts-Assay .....  | 61 |
| 2.9.1 | Prinzip.....  | 61 |

|        |  |    |
|--------|--|----|
| 2.9.2  | Stimulierungsprotokoll.....  | 61 |
| 2.10   | Calcium-Assay .....  | 62 |
| 2.10.1 | Prinzip.....   | 62 |
| 2.10.2 | Vorexperimente .....   | 62 |
| 2.10.3 | Vorbereitung der Proben.....   | 62 |
| 2.10.4 | Stimulierungsprotokoll.....  | 63 |
| 2.10.5 | Kombinationsstimulierung.....  | 63 |
| 2.10.6 | Ablauf des Assays .....  | 63 |
| 2.11   | Synergie Quantifizierung .....   | 63 |
| 2.12   | Methoden zur Gewinnung und Untersuchung humaner Ösophagusproben.....   | 64 |
| 2.12.1 | Probengewinnung.....   | 64 |
| 2.12.2 | Endoskopische Beurteilung .....  | 65 |
| 2.12.3 | Immunhistochemie.....  | 65 |
| 2.13   | Statistische Analyse .....   | 66 |
| 2.13.1 | Genexpressionsdaten.....   | 66 |
| 2.13.2 | Western Blotting .....   | 67 |
| 2.13.3 | Zell-Viabilitäts-Assay.....  | 68 |
| 2.13.4 | Calcium-Assay.....   | 68 |
| 3.     | Ergebnisse .....   | 69 |
| 3.1    | Expression von <i>Acid-sensing ion channels</i> (ASICs), 5-Hydroxytryptamin-Rezeptor-Subtypen (5-HTR) und Serotonintransporter (SERT) in Rattenösophagi..... | 69 |
| 3.1.1  | Genexpression.....   | 69 |
| 3.1.2  | Western Blots .....  | 71 |
| 3.2    | Humane Ösophagusproben .....   | 77 |
| 3.2.1  | Klinische Daten.....   | 77 |
| 3.2.2  | Immunhistochemie.....  | 79 |

|       |   |     |
|-------|---|-----|
| 3.3   | Auswirkung von STW 5, dessen Einzelextrakte und Omeprazol auf <i>Human Intestinal Smooth Muscle Cells</i> (HISMC) ..... | 89  |
| 3.3.1 | Viabilitäts-Assay .....   | 89  |
| 3.3.2 | Calcium-Assay.....  | 93  |
| 3.3.3 | Synergie Quantifizierung.....   | 96  |
| 4.    | Diskussion .....  | 104 |
| 5.    | Zusammenfassung .....   | 113 |
| 6.    | Abbildungsverzeichnis.....  | 115 |
| 7.    | Tabellenverzeichnis.....  | 118 |
| 8.    | Literaturverzeichnis .....  | 119 |
| 9.    | Danksagung .....  | 138 |
| 10.   | Publikationen.....  | 139 |



## Abkürzungsverzeichnis

|       |   |
|-------|---|
| 5-HT  | 5-Hydroxytryptamin/ Serotonin                                     |
| 5-HTR | 5-Hydroxytryptamin-Rezeptor                                       |
| Abk   | Abkürzung   |
| AK    | Antikörper  |
| ANS   | Autonomes Nervensystem  |
| ASICs | <i>Acid-sensing ion channels</i>                                  |
| ASS   | Acetylsalicylsäure  |
| BK    | Bradykinin  |
| BMI   | <i>Body mass index</i>  |
| BSA   | <i>Bovine serum albumine</i>                                      |
| bzw.  | beziehungsweise   |
| CI    | Kombinationsindex   |
| CINC  | <i>Cytokine-induced neutrophil chemoattractant</i>                |
| DEG   | Degenerin   |
| DGNM  | Deutsche Gesellschaft für Neurogastroenterologie und Motilität    |
| DGVS  | Deutsche Gesellschaft für Verdauungs- und Stoffwechselkrankheiten |
| DIS   | <i>Dilated intercellular spaces</i>                               |
| DMEM  | <i>Dulbecco´s Modified Eagle Medium</i>                           |
| DMSO  | Dimethylsulfoxide   |
| DNA   | Desoxyriboneukleinsäure   |
| DPBS  | <i>Dulbecco´s Phosphate Buffered Saline</i>                       |
| EDTA  | Ethylendiamintetraessigsäure                                      |
| EnaC  | <i>Epithelial Sodium Channel</i>                                  |
| ENS   | Enterisches Nervensystem  |
| ERD   | <i>Erosive reflux disease/ Erosive Refluxkrankheit</i>            |
| FACS  | <i>Fluorescence-activated cell sorting</i>                        |
| FBS   | <i>Fetal bovine serum</i>   |
| FES   | <i>Feature Extraction Software</i>                                |

|                         |   |
|-------------------------|---|
| FGID                    | <i>Functional gastrointestinal disorder/</i> Funktionelle gastrointestinale Krankheit |
| G2A                     | G2A-Rezeptor/ GPR132  |
| GABA                    | Gamma Aminobuttersäure  |
| GERD                    | <i>Gastroesophageal reflux disease/</i> Gastroösophageale Refluxkrankheit             |
| GIT                     | Gastrointestinaltrakt   |
| GPCR                    | <i>G-protein-coupled-receptor/</i> G-Protein gekoppelter Rezeptor                     |
| GPR                     | <i>G-protein-coupled-receptor/</i> G-Protein gekoppelter Rezeptor                     |
| H <sub>2</sub> -Blocker | Histamin H <sub>2</sub> -Rezeptor Blocker   |
| HCL                     | Salzsäure   |
| H.E.-Färbung            | Hämatoxylin-Eosin-Färbung   |
| HEEC                    | <i>Human esophageal epithelial cell</i>   |
| HISMC                   | <i>Human Intestinal Smooth Muscle Cell</i>  |
| HHN                     | Hypothalamus-Hypophysen-Nebennierenrinden-Achse                                       |
| HRP                     | <i>Horseradish peroxidase</i>   |
| HTR                     | 5-Hydroxytryptamin-Rezeptor   |
| IL-6                    | Interleukin-6   |
| IL-8                    | Interleukin-8   |
| IPA                     | <i>Ingenuity Pathways Analysis</i>  |
| i.v.                    | Intravenös  |
| i.p.                    | Intraperitoneal   |
| kD                      | Kilodalton  |
| MDT                     | Magendarmtrakt  |
| NaCl                    | Natriumchlorid  |
| NaF                     | Natriumfluorid  |
| NERD                    | <i>Non erosive reflux disease/</i> Nicht erosive Refluxkrankheit                      |
| NHDF-C                  | <i>Normal Human Dermal Fibroblasts- Cells</i>   |
| NSAR                    | <i>Non-steroid anti-rheumatic drugs/</i> Nichtsteroidale Antirheumatika               |
| ÖGD                     | Ösophagogastroduodenoskopie   |
| OGR1                    | <i>Ovarian cancer G-protein-coupled receptor</i>                                      |

|        |  |
|--------|--|
| O      | Omeprazol  |
| OR     | Odds Ratio   |
| P2X    | <i>P2X purinoreceptor</i>  |
| PBS    | <i>Phosphate buffer saline</i>   |
| PGP    | <i>Protein gene product</i>  |
| PKD2L1 | <i>Polycystic kidney disease 2-like 1</i>                                      |
| PNS    | Peripheres Nervensystem  |
| PPI    | Protonenpumpeninhibitor  |
| RE     | <i>Refluxesophagitis</i>   |
| RNA    | Ribonukleinsäure   |
| SEM    | <i>Standard Error of the Mean</i>  |
| SERT   | Serotonintransporter   |
| SDS    | Natriumdodecylsulfat   |
| SOC    | <i>Store-operated-channel</i>  |
| STW 5  | Iberogast classic®   |
| STW 6  | <i>Iberis amara (L.)</i>   |
| TALK   | <i>Tandem of P domains in a weakly inward rectifying K<sup>+</sup> channel</i> |
| TASK   | <i>TWIK-related acid-sensitive K<sup>+</sup> channel</i>                       |
| TBS    | Tris-buffered saline   |
| TBST   | Tris-buffered saline + Tween   |
| TDAG   | T-cell receptor  |
| TEMED  | N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin   |
| TM     | Transmembrandomäne   |
| TREM1  | <i>Triggering receptors expressed on myeloid cells 1</i>                       |
| TRESK  | <i>TWIK-related spinal cord K<sup>+</sup> channel</i>                          |
| TRIS   | 2-amino-2-hydroxymethyl-1,3-propandiol   |
| TRPC   | <i>Transient receptor potential canonical</i>                                  |
| TRPP   | <i>Transient receptor potential polycystic</i>                                 |
| TRPV   | <i>Transient receptor potential vanilloid</i>                                  |
| TWIK   | <i>Tandem of P-domains in a Weak Inward Rectifying K<sup>+</sup> channel</i>   |
| ZNS    | Zentrales Nervensystem   |

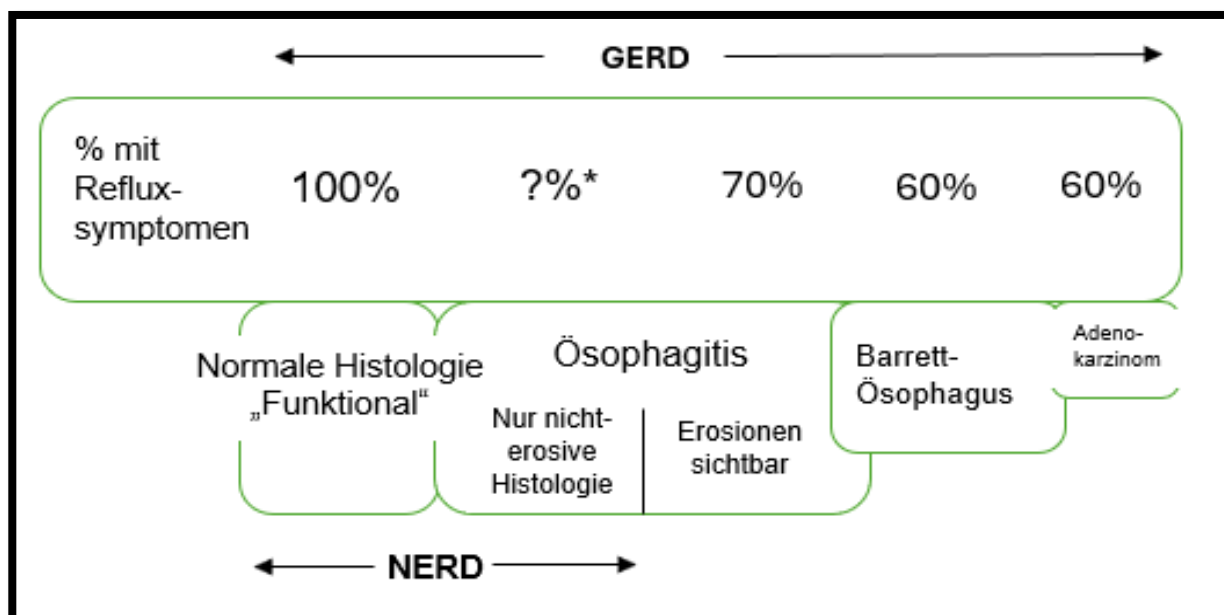
## 1. Einleitung

### 1.1 Gastroösophageale Refluxkrankheit (GERD)

#### 1.1.1 Definition

Laut der Montreal Definition entwickelt sich eine GERD, wenn der Reflux von Mageninhalt störende Symptome und/oder Komplikationen verursacht (Vakil et al., 2006). Unter dem Begriff GERD werden folgende Manifestationen zusammengefasst: erosive Refluxösophagitis verschiedener Schweregrade (ERD), nicht erosive Refluxkrankheit (NERD), hypersensitiver Ösophagus, extraösophageale Manifestationen, Komplikationen der GERD, funktionelle Refluxbeschwerden und Barrett-Ösophagus (Koop et al., 2014). Die Erkrankung kann in ösophageale und extraösophageale Syndrome unterteilt werden. Zu den extraösophagealen Symptomen zählen Laryngitis, Husten, Asthma und Zahnerosionen (Vakil et al., 2006, Zullo et al., 2020). Im Folgenden liegt der Fokus auf ösophagealen Symptomen der GERD.

Die GERD mit endoskopisch nachweisbaren Läsionen (Erosionen, Striktur, Barrett-Ösophagus) wird als erosive gastroösophageale Refluxkrankheit (ERD) definiert. Dabei haben weniger als 50 % aller Patient\*innen mit typischen GERD-Symptomen endoskopisch erkennbare Schleimhautläsionen (Fass und Ofman, 2002). Eine NERD liegt nur vor, wenn die Beschwerden die Lebensqualität beeinträchtigen und NERD kann die Lebensqualität (QoL) ähnlich stark beeinträchtigen wie ERD (Fass und Ofman, 2002). Ein hypersensitiver Ösophagus liegt vor, wenn Refluxereignisse formal quantitativ innerhalb der Norm liegen, aber als Sodbrennen mit positivem Symptomindex wahrgenommen werden (Thoua et al., 2008). Patient\*innen mit funktionellen Refluxbeschwerden klagen zwar über Sodbrennen, es liegt aber weder ein pathologischer Reflux vor (negative pH-Metrie/Impedanz) noch besteht eine zeitliche Assoziation der Schmerzangaben mit physiologischen Refluxereignissen (Fass und Achem, 2011). Abbildung 1 zeigt die Aufteilung der verschiedenen Subgruppen der GERD, die Überschneidung der Krankheiten (nicht proportional) und die geschätzten Anteile der Patient\*innen, welche mit der Erkrankung auch die typischen Symptome zeigen.



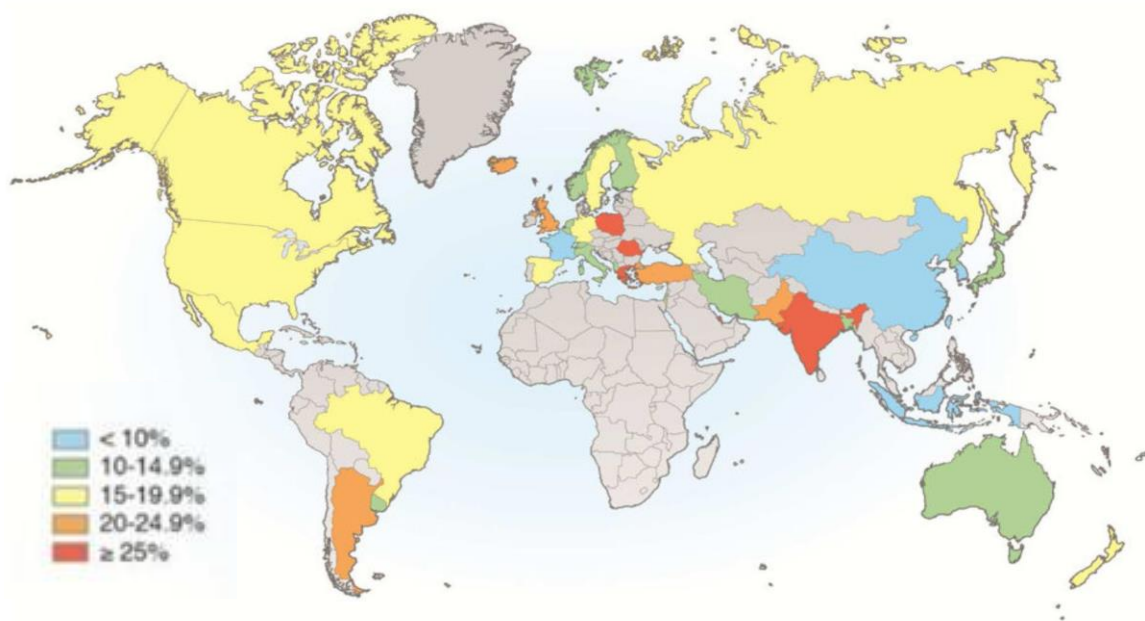
**Abb. 1:** Das Spektrum der GERD

Dargestellt ist das Spektrum der GERD und die Schätzungen der Anteile von Patient\*innen mit Symptomen in Prozent und (nicht-proportional dargestellt) die Überschneidung der Krankheiten. Abk.: ?%\*: hier gibt es keine Daten in der Literatur; NERD: Non erosive reflux disease/ Nicht erosive Refluxkrankheit; GERD: *Gastrooesophageal reflux disease*. Modifiziert nach Ronkainen und Agréus, 2013.

### 1.1.2 Epidemiologie

Die GERD ist eine häufige Krankheit. In Studien, welche als Kriterium Symptome von mindestens einmal pro Woche festlegen, ergab sich eine gepoolte Prävalenz von weltweit ungefähr 13,3 %. Hierfür wurden populationsbasierte Studien untersucht, welche einer geographischen Variation unterliegen. Abbildung 2 zeigt die Prävalenz der gastroösophagealen Refluxsymptome weltweit auf einer farblich markierten Karte. Es ist zu sehen, dass sich die höchste Prävalenz für Süd-Asien und Süd-Europa (mehr als 21 %) und die niedrigste Prävalenz für Südost-Asien, Kanada und Frankreich (unter 10 %) ergibt. Es gibt keine Daten für eine Prävalenz in Afrika (auf der Karte grau markiert) (Eusebi et al., 2017). Die niedrigste Prävalenz von 2,5 % wurde in China festgestellt und die höchste Prävalenz mit 52,1 % in Griechenland (Eusebi et al., 2017). Die Prävalenz der GERD-Symptome stieg bis 1995 um 50 % und blieb seitdem konstant (El-Serag et al., 2014). Somit bleibt, laut einem *Review* von El-Serag et al. (2014), GERD eine häufige Erkrankung weltweit, wobei nur in Ost-Asien eine Prävalenz von konstant unter 10 % zu finden ist. Die hohe Prävalenz dieser Erkrankung hat demnach auch große soziale Konsequenzen, da der

ausgelöste Schmerz und das Unbehagen viele Bereiche des Lebens der Patient\*innen beeinflussen (El-Serag et al., 2014). Es konnte gezeigt werden, dass eine gastroösophageale Refluxerkrankung viele Aspekte des alltäglichen Lebens beeinflusst. Vor allem die gesundheitsbezogene Lebensqualität, Krankheitstage, Produktivität auf der Arbeit und Inanspruchnahme medizinischer Versorgung sind hier zu nennen. Hierbei waren die Auswirkungen von GERD auf diese Parameter größer bei Patient\*innen mit häufigeren und stärkeren GERD-Symptomen (Wahlqvist et al., 2008). Schon 1999 wurde der starke und vermutlich kausale Zusammenhang zwischen gastroösophagealem Reflux und ösophagealem Adenokarzinom erkannt (Lagergren et al., 1999). Die jährliche Inzidenz des ösophagealen Adenokarzinoms stieg weltweit zwischen 1960 und 1990, von 3,5 % in Schottland bis 8,1 % in Hawaii, was mit einer gleichzeitig steigenden Prävalenz von GERD einherging (Edgren et al., 2013).



**Abb. 2:** Prävalenz der wöchentlichen gastroösophagealen Reflux-Symptome weltweit

Abgebildet ist die weltweite Verteilung der gastroösophagealen Reflux-Symptome basierend auf Symptomen mit einer Häufigkeit von einmal die Woche oder mehr. Für die grau markierten Länder konnten keine Daten gefunden werden. Quelle: Modifiziert nach Richter und Rubenstein 2018, adaptiert von Eusebi et al., 2017.

### 1.1.3 Ätiologie

Die Ursachen für die Entstehung einer GERD sind vielfältig und es gibt einige gut dokumentierte Risikofaktoren und Komplikationen (siehe Tabelle 1) (Richter und Rubenstein, 2018).

**Tab. 1:** Assoziation von Risikofaktoren für GERD und deren Komplikationen

| Risikofaktor                 | Symptome | Ösophagitis | Striktur | Ösophageales Adenokarzinom |
|------------------------------|----------|-------------|----------|----------------------------|
| <b>Alter</b>                 | +/-      | +           | +        | ++                         |
| <b>Männliches Geschlecht</b> | +/-      | +           | +/-      | ++                         |
| <b>Weißer Rasse</b>          | +/-      | +           | +        | ++                         |
| <b>Übergewicht</b>           | +        | +           |          | ++                         |
| <b>H. pylori</b>             | +/-      | -           |          | -                          |
| <b>Rauchen</b>               | +        | +           | +        | ++                         |

Modifiziert nach Richter und Rubenstein, 2018. + : positive Assoziation; ++ : starke positive Assoziation; - : negative Assoziation; -- : starke negative Assoziation; +/- : keine Assoziation oder heterogene Daten für Assoziation. Es wurde nur das männliche Geschlecht untersucht.

Laut Ronkainen und Agréus sind Übergewicht und Rauchen die beiden Lebensstilfaktoren, welche eine starke Evidenz haben, mit GERD assoziiert zu sein (Ronkainen und Agréus, 2013). Die gepoolte Prävalenz von gastroösophagealen Refluxsymptomen war höher bei Raucher\*innen (19,6 %) im Vergleich zu Nicht-Raucher\*innen (15,6 %) (Eusebi et al., 2017). Bei Patient\*innen mit Übergewicht, definiert mit einem BMI  $\geq 30$  kg/m<sup>2</sup>, war die gepoolte Prävalenz höher (22,1 %) als bei nicht übergewichtigen Patient\*innen (14,2 %). Das *Odds Ratio* (OR) war 1,73 (Eusebi et al., 2017). Ein weiterer wichtiger Faktor, welcher im Zusammenhang mit gastroösophagealen Refluxsymptomen steht, ist das Alter, denn das OR für gastroösophageale Refluxsymptome bei Patient\*innen mit einem Alter  $\geq 50$  Jahre verglichen mit denen  $< 50$  Jahren, war 1,32. Somit ergibt sich ein Zusammenhang zwischen Alter und gastroösophagealen Refluxsymptomen (Eusebi et al., 2017). Das lässt einen moderaten Anstieg bei der Symptomprävalenz mit steigendem Alter vermuten. Zusätzlich war die gepoolte Prävalenz signifikant höher bei übergewichtigen Patient\*innen

verglichen mit Normalgewichtigen. Andere demographische Faktoren, welche mit Symptomen assoziiert sind, sind NSAR und/oder Aspirin-Einnahme, niedriges Einkommen und niedriges Bildungsniveau, obwohl bei all diesen Faktoren das Ausmaß der Effekte moderat war (Eusebi et al., 2017). Außerdem zeigte sich, dass kein bestimmtes Gen als Ursache für die Erkrankung gefunden werden konnte, sondern GERD eher auf einer polygenen Basis entsteht (Gharakhani et al., 2016).

Medikamente sind mögliche Verursacher einer GERD und die Symptomatik einer bestehenden GERD kann durch sie verstärkt werden. Kalziumantagonisten, Nitropräparate, Theophylline und Aminophylline (Verstärkung eines refluxbedingten Asthmas), Anticholinergika, beta-adrenerge Agonisten, Benzodiazepine, pfefferminzhaltige Präparate und Östrogenpräparate zur postmenopausalen Hormontherapie bewirken die Relaxation des unteren Ösophagussphinkters oder die Störung der ösophagealen Clearance (Lagergren et al., 2000). Außerdem gibt es Medikamente, die motilitätsunabhängig agieren und zu einer toxischen Ösophagitis führen können. Diese kann lokal (ASS, NSAR, Biphosphonate, Doxycylin, Eisensulfat, Ascorbinsäure) oder systemisch (Zytostatika) geschehen (Tutuian, 2010).

#### 1.1.4 Pathogenese

Die GERD wird hauptsächlich durch den retrograden Fluss von Magensäure aus dem Magen in den Ösophagus ausgelöst, welche Symptome verursacht und/oder die ösophageale Schleimhaut angreift (Vakil et al., 2006). Charakteristische Symptome der gastroösophagealen Refluxkrankheit sind retrosternales Brennen (häufig Sodbrennen genannt) und Regurgitation (der retrograde Fluss von Inhalt von Hohlorganen) (Vakil et al., 2006). Die Funktion des Ösophagus ist es, Nährstoffe vom Mund in den Magen zu transportieren und eine Aspiration von Mageninhalt in die Lunge zu verhindern. Für diese Funktion hat der Ösophagus zwei Sphinkter (oberen und unteren ösophagealen Sphinkter) an beiden Enden des tubulären Organs. Der mikroskopische Aufbau der Tunica Mucosa des Ösophagus ist - im Unterschied zu den anderen Organen des Magen-Darm-Traktes - mit einem mehrschichtig unverhornten Plattenepithel mit submukösen Drüsen ausgestattet (Tutuian, 2010).

Die GERD kann entstehen, wenn Faktoren, welche den Ösophagus schädigen, den schützenden Faktoren (die gastroösophageale *Junction Barrier*, *Säure-Clearance*,



Schleimhaut- Widerstand) überlegen sind. Wenn die schützenden Faktoren überwunden sind, kann das Refluxat - bestehend aus Säure, Pepsin, duodenalen Säften und Pankreasenzymen - direkten Schaden an der Schleimhaut anrichten und somit zu den oben genannten Symptomen und Komplikationen führen. Die Mechanismen, welche direkt an der Pathogenese beteiligt sind, sind (1) motorische Abnormalitäten z.B. eingeschränkter Ruhetonus des unteren Ösophagussphinkter, transiente Relaxationen des unteren Ösophagussphinkter, eingeschränkte ösophageale Säure-Clearance und verzögerte Magenentleerung, (2) anatomische Abnormalitäten z.B. Hiatushernie, (3) viszerale Hypersensitivität und (4) eingeschränkter Schleimhautwiderstand (Giorgi et al., 2006). Die Hiatushernie kann hierbei zu einer Dysfunktion des unteren Ösophagussphinkters führen und die verzögerte Magenentleerung kann eine Magendehnung und damit vorübergehende Dehnung des unteren Ösophagussphinkters bewirken, was zu postprandialem Reflux führen kann. Außerdem kann das Gleichgewicht der Schleimhautschutzfaktoren bei erhöhtem Säurereflux zusammenbrechen (Castell et al., 2004). Histopathologische Veränderungen bei der Refluxösophagitis bei GERD sind erhöhte Eosinophile, intrapapilläre Gefäßdilatation, intraepitheliale Einblutung, Papilläre Dehnung, Basalzellhyperplasie, dilatierte interzelluläre Räume (DIS), erhöhte Zellproliferation, Auftauchen von Langerhanszellen und Hyperplasie der Nervenfasern (Miwa et al., 2013).

Lange ging man davon aus, dass zur Pathogenese von GERD lediglich die Säure-induzierte Verletzung des Epithels beiträgt und dass HCL den Ösophagus verletzt, indem es die *Tight Junction* Proteine des Epithels beschädigt. Dies führt zu *dilated intercellular spaces* (DIS), wodurch sich die parazelluläre Permeabilität erhöht. Das Resultat aus den DIS und dem Untergang der Epithelzellen ist, dass HCL Zugang zu sensorischen Neuronen in tieferen Schichten der Mukosa bekommt und dort an chemosensitiven Nozizeptoren Schmerz (Sodbrennen) erzeugen kann (Barlow und Orlando, 2005). Pepsin trägt zur Verletzung durch das Refluxat bei, indem Pepsin die Verbindungsproteine der Zellen spaltet. Die peptische Verdauung der Verbindungsproteine erhöht die Schleimhautpermeabilität, was das Eindringen von Wasserstoff-Ionen in die Schleimhaut erleichtert und Zellen in tieferen Schichten des Epithels angreifbar für die Magensäure macht (Tobey et al., 2001). Standard-Medikament bei gastroösophagealem Reflux sind Protonenpumpeninhibitoren (PPI) (Kahrilas et al., 2008; Koop et al., 2014). Fragen bezüglich deren Wirksamkeit warfen Fälle auf, bei denen die Symptome nicht durch eine PPI-Therapie gemindert

werden konnten. Eine japanische Studie fand heraus, dass ca. 20 % der Patient\*innen mit Refluxösophagitis und ca. 50 % der Patient\*innen mit nicht-erosiver-Refluxösophagitis nicht auf eine PPI-Therapie ansprechen (Miwa et al., 2007).

In einer weiteren Studie von Miwa et al. (2013) wurden ERD und NERD-Patient\*innen Biopsien des distalen Ösophagus entnommen, bevor eine vierwöchige Therapie mit 10 mg Rabeprazol (ein PPI) täglich eingeleitet wurde. Die Symptome wurden mit einem Symptomtagebuch dokumentiert. Patient\*innen, die nach vier Wochen noch Symptome hatten, wurde zwei weitere Wochen Rabeprazol verabreicht (insgesamt sechs Wochen). Die Patient\*innen, welche noch immer keinen Symptomrückgang zeigten, wurden zwei weitere Wochen mit Rabeprazol therapiert (insgesamt acht Wochen). Bei Patient\*innen, welche nicht auf die Therapie ansprachen, waren bei der ERD histopathologisch viele Eosinophile Zellen zu finden und intraepitheliale Blutungen. Bei NERD-Patient\*innen, die nicht auf die Therapie ansprachen, konnte im distalen Ösophagus ein fehlendes Immunostaining für PGP 9.5 (Marker für viszerale sensible Neurone) und DIS gefunden werden. Bei dieser Patient\*innengruppe war mit 0 % nach vier Wochen und 22 % nach acht Wochen der niedrigste Therapieerfolg zu verzeichnen (Miwa et al., 2013). Die Studie zeigt, dass das traditionelle Konzept der Pathogenese der Refluxösophagitis und von Sodbrennen zu einfach ist und dass die Symptome der GERD nicht nur durch Säure induziert sein können (Huo und Souza, 2013). Weiterhin gibt es eine steigende Anzahl von Daten aus denen hervorgeht, dass außerdem immunvermittelte Mechanismen außerdem eine wichtige Rolle spielen und dass alleinige Säuresuppression nicht ausreicht, um alle Patient\*innen mit GERD suffizient zu behandeln. Souza et al. (2009) zeigte, dass Reflux die IL-8 Freisetzung des Ösophagus-Epithels erhöht und dass die Infiltration von Entzündungszellen stattfindet, bevor überhaupt die Schleimhautbarriere gestört ist (Souza et al., 2009, Abdel-Aziz et al., 2015b, Ulrich-Merzenich et al., 2019). Eine Studie von Abdel-Aziz et al. (2015) konnte außerdem an einem subchronischen Ösophagitismodell zeigen, dass epitheliale Ösophagus-Zellen eine Reihe von pro-entzündlichen Zytokinen freisetzen, welche Rezeptoren und Signalkaskaden (CINC1-3 (IL-8), TREM1 und GPR84) aktivieren, die für die Regulation des entzündlichen Prozesses in diesem Modell relevant waren (Abdel-Aziz et al., 2015b). Generell konnte gezeigt werden, dass IL-8 eines der zentralen pro-entzündlichen Zytokine im oberen Gastrointestinaltrakt (GIT) ist (Joel E. Richter, 2007).

### 1.1.5 Klinik

Charakteristische Symptome der GERD sind retrosternales Brennen (häufig Sodbrennen genannt) und Regurgitation (der retrograde Fluss von Inhalt von Hohlorganen). Die häufigste Manifestation der ösophagealen Verletzung ist die Refluxösophagitis (Vakil et al., 2006). Zum anderen gibt es Symptome, die zwar nicht pathognomonisch sind, aber mit einer Refluxerkrankung vereinbar: retrosternale Schmerzen, Dysphagie (Schluckerschwernis), seltene Odynophagie (Schmerzen beim Schlucken), Reizhusten/morgendliches Räuspern, belegte Stimme, Heiserkeit, Reizhusten und Asthmaanfälle (Koop et al., 2014). Es gibt zwei Manifestationsorte von Komplikationen der GERD. Zum einen in der Speiseröhre (z.B. Ösophagitis, Stenosen, Barrett) und zum anderen extraösophageal (z.B. Laryngitis, chronischer Husten, Zahnerosionen, Asthma) (Koop et al., 2014).

### 1.1.6 Diagnostik

Zunächst wird sich bei der Diagnostik auf die Klinik berufen. Hierzu erfolgt eine ausführliche Anamnese der oben genannten Symptome sowie eine Medikamentenanamnese (Koop et al., 2014). Eine GERD wird als wahrscheinlich angesehen, wenn typische Refluxsymptome mindestens ein- bis zweimal pro Woche auftreten und mit einer Beeinträchtigung der Lebensqualität einhergehen (Dent et al., 1999). Führt Sodbrennen die klinische Symptomatik an, so liegt mit hoher Wahrscheinlichkeit (>75 %) eine Refluxerkrankung vor (Vakil et al., 2006). Hier kann als weiteres diagnostisches Werkzeug der sogenannte "PPI-Test" durchgeführt werden. Dabei wird eine Woche probatorisch ein PPI (z.B.: Pantoprazol 40 mg täglich) gegeben und der Symptomverlauf beobachtet. Eine Symptomreduktion von mindestens 50 % wird als positives Testergebnis gewertet und bestätigt dabei die Diagnose. Zu beachten ist, dass der PPI-Test auch bei anderen säureinduzierten Krankheiten, wie peptische Ulkuskrankheit und funktionelle Dyspepsie, positiv sein kann. Außerdem gibt es einen beachtlichen Placeboeffekt, weshalb die Spezifität des Tests nur 24–65 % beträgt und nicht wesentlich höher als der Placebotest (38–41 %) ist (Johnsson et al., 2003). Laut einer Studie von 2010 beträgt die Sensitivität 95,5% bis 98,8%. Somit ist der PPI-Test sensitiv, hat jedoch eine spärliche Spezifität. Auch hier spricht die Studie von einer optimalen Dauer von einer Woche und spricht von einem positiven Test bei einer Symptomreduktion um  $\geq 75$  % (Leone et al., 2010). In der ambulanten Versorgung

ist also ein kurzer PPI-Test sehr hilfreich, denn die Kombination aus favorisierter Symptomantwort und das Fehlen der Alarmsymptome macht zusätzliches Testen unnötig (Bredenoord et al., 2013). Bei unklaren Symptomen sollte keine Probetherapie mit einem PPI mit diagnostischer Zielsetzung erfolgen (Koop et al., 2014).

Alarmsymptome der GERD als diagnostisches Werkzeug zu nutzen ist nicht auf Basis hochwertiger Studien etabliert. Beschrieben und gut vereinbar mit allgemeinen medizinischen Standards sind Dysphagie und Odynophagie, unfreiwilliger Gewichtsverlust (>5 %), eine Anämie insbesondere bei klinischen Hinweisen auf gastrointestinale Blutverluste, sowie klinische/apparative Hinweise auf eine ösophageale/epigastrische Raumforderung, Striktur oder ein Ulkus (Lundell et al., 1999). Wenn aus der Anamnese keine typischen Refluxsymptome hervorgehen, bei langjährigen Beschwerden oder auf ausdrücklichen Wunsch des Patienten/der Patientin, sollte eine weitere Diagnostik mittels ÖGD und/oder pH-Metrie (-Impedanz) erfolgen (Berstad und Hatlebakk, 1995). Die Endoskopie ermöglicht die Differenzierung zwischen erosiver Refluxkrankheit (ERD) und nichterosiver Refluxkrankheit (NERD) sowie die primäre Diagnose der Refluxösophagitis und die Festlegung ihres Schweregrades (Dent et al., 1999). Dafür wird die Los Angeles Klassifikation (Lundell et al., 1999) verwendet:

- Grad A: Eine (oder mehrere) Schleimhautläsionen <0,5 cm. Die Läsionen greifen nicht über die Spitzen zweier Mukosalängsfalten.
- Grad B: Mindestens eine Läsion >0,5 cm. Die Läsionen greifen jedoch noch nicht über die Spitzen zweier Mukosalängsfalten.
- Grad C: Die Läsionen überschreiten mehrere Mukosalängsfalten. Sie nehmen jedoch weniger als 75 % des Gesamtumfangs des Ösophagus ein, d.h. es liegen noch keine zirkulären Defekte vor.
- Grad D: Es liegen zirkuläre Läsionen vor, die mehr als 75 % des Gesamtumfangs des Ösophagus einnehmen.

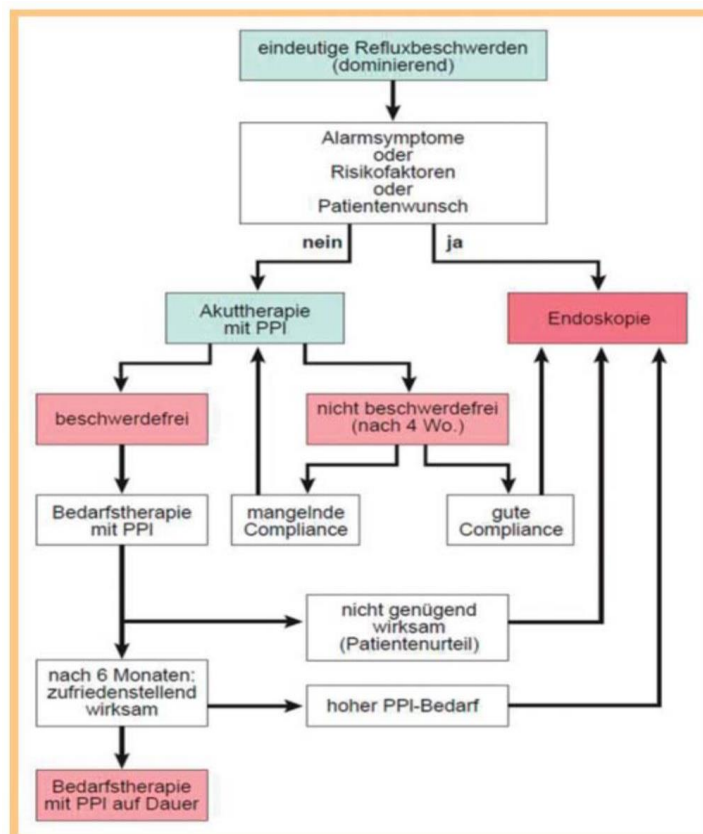
Der generelle diagnostische Gewinn einer Endoskopie bei der GERD ist gering, da viele Patient\*innen keine sichtbaren Erosionen im Ösophagus aufweisen. Trotzdem ist die Endoskopie ein Test mit hoher Spezifität und niedriger Sensitivität für GERD (Bredenoord et

al., 2013). Ein weiteres diagnostisches Mittel ist die 24-Stunden-pH-Metrie. Hierbei erhält man primär die Säureexpositions-Zeit (Scarpulla et al., 2007). Die 24-Stunden-pH-Metrie weist eine hohe Sensitivität und Spezifität auf (Lacy et al., 2010). Eine weitere Möglichkeit zur Diagnostik ist die 24-Stunden-pH-Metrie-Multikanale-Intraluminale-Impedanzmessung. Hier wurde die einfache pH-Metrie durch eine Impedanzmessung ergänzt. Diese ermöglicht die kombinierte Erfassung von Bolusbewegungen und Säureexposition (Sifrim et al., 2004). Diese kann in saure, schwach saure ( $\text{pH} > 4$  und  $\text{pH} < 7$ ) und nicht saure Refluxereignisse ( $\text{pH} > 7$ ) unterteilt werden. Somit kann Aufschluss über die Ursache der Symptome bei persistierenden Refluxbeschwerden unter PPI Therapie gewonnen werden (Koop et al., 2014). Durch diese Untersuchungsmethode ergeben sich weitere Möglichkeiten für die Differenzierung zwischen Patient\*innen mit hypersensitivem Ösophagus (formal normale Säureexposition, aber positive Symptomassoziation) und mit funktionellem Sodbrennen (Savarino et al., 2012). Die Ösophageale-Manometrie (Messung des intraluminalen Ösophagusdrucks und damit Abklärung von Funktionsstörungen der Ösophagusmuskulatur) ist zur Diagnostik der GERD nicht indiziert, da eine motorische Dysfunktion assoziiert mit abnormalem Reflux nicht spezifisch ist. Die Manometrie wird zur Diagnostik von schweren Motilitätsstörungen der Speiseröhre wie zum Beispiel der Achalasie verwendet (Pandolfino und Kahrilas, 2005). Bei histologischen Analysen von Biopsien von Patient\*innen mit GERD können verlängerte Papillen, Hyperplasie der Basalzelllinie mit dilatierten interzellulären Räumen gefunden werden. Entzündungszellen können vorhanden sein, wobei jedoch das vermehrte Auftauchen von Eosinophilen eher mit einer eosinophilen Ösophagitis zusammenhängt. Somit ergibt sich eine hohe Untersuchervariation, eine niedrige Sensitivität und Spezifität. Dies limitiert die histologische Analyse als diagnostische Methode der GERD (Ismail-Beigi et al., 1970). Lediglich wenn zusätzlich zu Refluxsymptomen die Dysphagie als Symptom hinzukommt, erhöht sich der diagnostische Mehrwert einer Biopsie bis zu 9,2%. Da zum einen die Anzahl an Biopsien reduziert, jedoch keine eosinophile Ösophagitis übersehen wird (Oude Nijhuis et al., 2021).

#### 1.1.7 Therapie

Anlass für die ärztliche Konsultation sind häufig Refluxsymptome, welche von den Patient\*innen als belastend empfunden werden. Deshalb ist das Therapieziel zunächst eine zufriedenstellende Symptomkontrolle (Dent et al., 1999). In einer Studie von 2003 waren Patient\*innen mit NERD dann zufrieden, wenn leichte Refluxsymptome maximal einmal

pro Woche auftraten (Junghard et al., 2003). Auch Lebensstilveränderungen sind Teil der Therapie. Hierbei gibt es Evidenz für Gewichtsverlust, Schlafen mit erhöhtem Kopf und Oberkörper, die Beendigung des Tabak- und Alkoholkonsums und das Vermeiden von spätabendlichen Mahlzeiten. Außerdem gibt es Evidenz für das Vermeiden von Nahrungsmitteln, welche potentiell den Reflux verschlimmern könnten, wie zum Beispiel Koffein, Kaffee, Schokolade, scharfe Nahrungsmittel, sehr saure Lebensmittel und Nahrungsmittel mit hohem Fettanteil (Katz et al., 2013). Laut Leitlinie für die GERD von 2014 (die aktualisierte Fassung konsensbasierten S2-Leitlinie (S2k-Leitlinie) GERD steht aktuell (01/23) nur als Konsultationsfassung zur Verfügung) sieht das Therapieschema bei Refluxsymptomen wie folgt aus:



**Abb. 3:** Managementalgorithmus zur Abklärung und Therapie typischer Refluxbeschwerden

Als Flussdiagramm dargestellt wird die diagnostische und therapeutische Vorgehensweise bei Patient\*innen mit Refluxbeschwerden. Wo: Wochen; PPI: Protonenpumpeninhibitor. Quelle: Koop et al., 2014

Laut S2k-Leitlinie können Patient\*innen mit typischem Refluxsyndrom ohne Alarmzeichen oder Risikofaktoren (wie z.B. Gewichtsabnahme, Dysphagie, Blutungshinweise, Familienanamnese für Malignome des oberen Verdauungstraktes, langjährige schwere, insbesondere auch nächtliche Symptome) ohne Endoskopie empirisch mit einem PPI in Standarddosis (Präparate: Esomeprazol 40 mg, Lansoprazol 30 mg, Omeprazol 20 mg, Pantoprazol 40 mg, Rabeprazol 20 mg) über vier Wochen behandelt werden (Katz et al., 2013). Es ist gut belegt, dass PPIs den H<sub>2</sub>-Blockern überlegen sind, sowohl bei der Heilung der Ösophagitis als auch bei der Aufrechterhaltung der Heilung. Bei Vergleichen der verschiedenen PPIs (Omeprazol 20 mg, Pantoprazol 40 mg, Lansoprazol 30 mg, Rabeprazol 20 mg und Esomeprazol 40 mg) zeigte sich ein kleiner, jedoch klinisch nicht relevanter Unterschied in der effektiven Kontrolle der Magensäure zwischen den einzelnen Präparaten (Miner, JR et al., 2003). Endoskopierte Patient\*innen mit einer NERD sollten mit einem PPI in halber Standarddosis behandelt werden. Außerdem sollte bei ungenügendem Ansprechen auf eine vier-wöchige PPI-Therapie die Therapiedauer verlängert werden, die Dosis des PPI erhöht (bis maximal 2x1 Standarddosis) und/oder der PPI gewechselt werden (Koop et al., 2014).

Eine endoskopisch gesicherte Refluxösophagitis ist im Regelfall mit einem pathologischen Säurereflux assoziiert. Somit sollte eine leichte Refluxösophagitis (Los Angeles A/B) über vier Wochen, eine schwere Refluxösophagitis (Los Angeles C/D) über acht Wochen mit einem PPI in Standarddosis behandelt werden. Nach Beendigung der Akuttherapie einer leichten Refluxösophagitis kann, orientierend am klinischen Verlauf, ein Auslassversuch, eine kontinuierliche, intermittierende oder Therapie nach Bedarf erfolgen. Die Langzeittherapie einer schweren Refluxösophagitis sollte unmittelbar im Anschluss an eine (erfolgreiche) Akuttherapie mit Versuchen der PPI-Dosisreduktion im Verlauf erfolgen (Koop et al., 2014). Dabei muss bei der Langzeittherapie zwischen einem Rezidiv (symptomatisch/endoskopisch) und den Nebenwirkungen der PPI-Therapie abgewogen werden (Caos et al., 2005). Möglichkeiten zur chirurgischen Therapie der GERD beinhalten laparoskopische Fundoplikatio oder bariatrische Chirurgie bei Übergewicht. Gründe für eine chirurgische Therapie sind der Wunsch die medikamentöse Therapie zu beenden, fehlende Compliance, Nebenwirkungen der PPI Therapie, große Hiatushernie, therapie-refraktäre Ösophagitis oder persistierende Symptome bei refraktärer GERD (Katz et al., 2013).

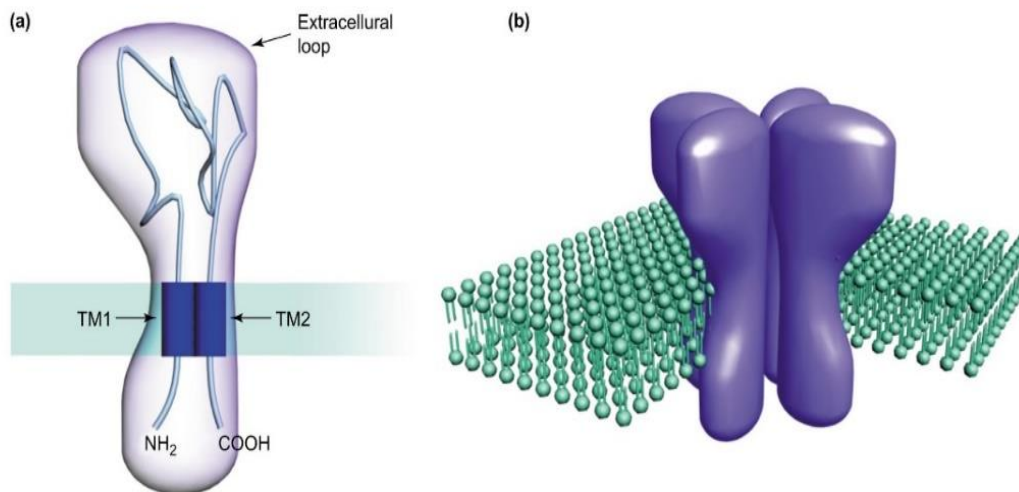
## 1.2 Säureempfindliche Ionenkanäle (*Acid-sensing ion channels*; ASICs)

### 1.2.1 Einführung

*Acid-sensing ion channels* (ASICs) gehören zu den ligandengesteuerten Kanälen. Sie haben einen speziellen Liganden: Protonen ( $H^+$ -Ionen) (Gründer und Pusch, 2015). ASICs sind außerdem für Kationen permeabel und werden durch extrazelluläre Azidose aktiviert (Delaunay et al., 2012). Zu diesen Kationen gehören vor allem Natrium und Kalium (um den Faktor 10 weniger permeabel für  $K^+$  als  $Na^+$ ). Nur wenige ASICs lassen auch einen leichten  $Ca^{2+}$ -Strom erkennen (Gründer und Pusch, 2015). Somit werden ASICs durch extrazelluläre Protonen aktiviert und sorgen hauptsächlich für einen  $Na^+$ -Stromfluss (Wemmie et al., 2006).

1980 wurde erstmals ein durch Säure hervorgerufener Stromfluss in Neuronen beobachtet (Krishtal und Pidoplichko, 1980). 1997 konnte ein Protein geklont werden, welches einen ähnlichen säureinduzierten Stromfluss produziert, ein „*acid-sensing ion channel*“ (ASICs). Dieses Protein ist verwandt mit einem Mitglied der „*degenerin-epithelial Na<sup>+</sup> channel family*“ (DEG-ENaC Familie) (Waldmann et al., 1997). Diesen und anderen verwandten Kanälen wird eine pH-Sensitivität zugesprochen (Lingueglia et al., 1997). Deshalb wurden die DEG-ENaC-Kanäle in ASICs umbenannt, um zu zeigen, dass sie eine verwandte Struktur, Funktion und pH-Sensitivität besitzen (Waldmann und Lazdunski, 1998). Vier ASIC-Gene (*ASIC1*, *ASIC2*, *ASIC3*, *ASIC4*) und sechs ASIC-Untereinheiten (*ASIC1A*, *ASIC1B*, *ASIC2A*, *ASIC2B*, *ASIC3* und *ASIC4*) konnten identifiziert werden. Die verschiedenen Kanäle konnten sowohl im zentralen Nervensystem (ZNS) als auch im peripheren Nervensystem (PNS) nachgewiesen werden (Hesselager et al., 2004).





**Abb. 4:** Struktur der *acid-sensing ionic channels*

Struktur der *acid-sensing ionic channels*. Abgebildet sind a) eine einzelne Untereinheit mit extrazellulärer Schleife (*extracellular Loop*) und einem intrazellulären Terminus (NH<sub>2</sub>: Aminogruppen-terminales Ende, COOH: Säuregruppen-terminales Ende) sowie zwei Transmembrandomänen (TM) b) vier Untereinheiten, die zusammen einen funktionalen Kanal bilden. Quelle: Krishtal, 2003.

Weitere Forschungen zur Struktur, Funktion und Physiologie der ASICs führten zu immer detaillierteren Charakterisierungen. In peripheren sensorischen Neuronen konnten ASICs auf Zellkörpern und sensorischen Endplatten gefunden werden. Hier wurde vermutet, dass diese eine wichtige Rolle in Nozizeption und Mechanosensation spielen (Price et al., 2000). In Neuronen des ZNS konnten ASICs auf dem Zellkörper, Dendriten und dendritischen Ausläufern gefunden werden und es wird vermutet, dass sie zu synaptischer Plastizität beitragen (Wemmie et al., 2002). ASIC1 und ASIC2 Untereinheiten werden zusätzlich in den Bereichen des ZNS exprimiert, welche eine wichtige Rolle in der Schmerzverarbeitung spielen (Wemmie et al., 2003).

ASICs haben außerdem eine bekannte Proteinstruktur von zwei Transmembrandomänen, einem extrazellulären Loop und intrazellulären N- und C-terminalen Domänen (siehe Abbildung 4). Ihre Aktivierung durch eine pH-Absenkung wird durch eine Vielzahl von physiologischen und pathologischen Faktoren bedingt: starke synaptische Transmission, lokale Ischämie, Energieverbrauch und entzündliche Schädigung des Gewebes (Lin et al., 2015). Eine Azidose ist ein bekannter Aktivator von Nozizeptoren und kann somit Schmerzen bei Menschen hervorrufen (Steen und Reeh, 1993). Die hauptsächlichen H<sup>+</sup>-Sensoren

ren sind die ASICs (Waldmann et al., 1997). Sie werden auch in den dorsalen Rückenmarksganglien der sensorischen Neuronen exprimiert und partiell auch in freien sensorischen Nervenendigungen (Voilley et al., 2001). So wurde schon von Wemmie et al. (2003, 2006) vermutet, dass die ASICs (Untertypen) durch ihre Lokalisation und ihre Eigenschaften gute Kandidaten für H<sup>+</sup>-gesteuerte Nozizeptoren sind (Wemmie et al., 2006).

### 1.2.2 *Acid-sensing ion channels* (ASICs) und Schmerz

Viele Stimuli, die Schmerz hervorrufen, wie zum Beispiel Entzündungen im Gewebe, verringern den extrazellulären pH-Wert. Diese Beobachtung lässt schlussfolgern, dass es pH-sensitive Rezeptoren auf nozizeptiven Neuronen geben muss, welche bei Aktivierung Schmerz hervorrufen. Ein Beispiel für diesen Mechanismus sind die ASICs, da saures Milieu bei diesen Kanälen Kationenströme hervorruft. Außerdem konnten sie an den Zellkörpern und den Endplatten der peripheren nozizeptiven Neuronen gefunden werden. Wie schon im vorherigen Abschnitt erwähnt, wurden ASIC1- und ASIC2-Untereinheiten auch in den für die Schmerzverarbeitung wichtigen Arealen im ZNS gefunden (Wemmie et al., 2013). Das legt die Hypothese nahe, dass ASICs zu Schmerzwahrnehmung und -verarbeitung beitragen.

Eine Entzündung ist eine schützende Reaktion des Körpers, induziert durch Gewebsverletzung, Infektion oder Tumorwachstum. Sie repräsentiert eine der Hauptursachen von Schmerz. Die Entzündungs- und Schmerzmediatoren werden von Fibroblasten, Neuronen und Immunzellen freigesetzt. Dazu gehören Histamin, Bradykinin (BK), Prostaglandine (PG), Serotonin (5-HT), Protonen, Zytokine, Peptide und freie Radikale (Dray, 1995). Eine kombinierte Stimulation durch Entzündungsmediatoren (BK, 5-HT, *nerve growth factor*, *glia-derived neurotrophic factor*) erhöht die Expression und Aktivität von ASIC3 (Mamet et al., 2002). Diese Beobachtungen lassen eine Zusammenarbeit zwischen Entzündungsmediatoren und Protonen sowie ihr Zusammentreffen am ASIC3-Kanal vermuten (Wang et al., 2013). Es konnte gezeigt werden, dass die Expression von Genen, welche spezifisch für ASICs sind, bei Entzündung erhöht ist und dass therapeutische Dosen von nicht-steroidalen Antirheumatika diese erhöhte ASIC-Transkription verhindern können (Voilley et al., 2001). Es gibt weiterhin Bedarf an der Therapieoptimierung von akutem und chronischem Schmerz (Allegri et al., 2012). ASICs somit als mögliches Ziel zu betrachten, liegt nahe. Bevor ihr therapeutisches Potential voll ausgeschöpft werden kann,

sollte deutlich mehr über die physiologische Rolle der ASICs bei Schmerzen herausgefunden werden (Wemmie et al., 2006, Dulai et al., 2021).

### 1.2.3 *Acid-sensing ion channels* (ASICs) im Gastrointestinal-Trakt

Säure ist eines der Hauptsekretionsprodukte des Magens, in welchem sie dafür sorgt, Nahrung zu verdauen und den Körper vor Pathogenen, welche über die Nahrung aufgenommen werden können, zu schützen. Gleichzeitig kann eine Azidose (erniedrigter pH-Wert) im Gastrointestinal-Trakt ein pathologischer Zustand sein, welcher durch zu viel Säureaufnahme, zu viel Säuresekretion, defizitäre Eindämmung der Säure, metabolische Azidose und Azidose durch Ischämie oder Entzündung ausgelöst wird. Um diese Herausforderungen zu meistern, hat der Körper Mechanismen auf zellulärer Ebene eingebaut, sowie ein systemisches Monitoring, um schädliche Azidose wahrzunehmen und adäquate Schutzreaktionen in Kraft zu setzen. Diese Funktionen dienen der Vermeidung von Gewebsschädigungen. Im gesamten Magendarmtrakt wird der pH-Wert durch verschiedene Säuresensoren überwacht, welche auf Epithelzellen und sensorischen Neuronen exprimiert werden (Holzer, 2011). Zu diesen Säuresensoren gehören die *acid-sensing ion channels*, welche hauptsächlich in den Neuronen der Rückenmarksganglien beobachtet werden (Waldmann et al., 1997). Abbildung 5 gibt einen Überblick über die verschiedenen Ionenkanäle und ihre Untereinheiten und Rezeptoren, welche durch extrazelluläre Azidose moduliert werden.

|   |  |
|---|--|
| <b>Acid-sensing ion channels (ASIC)</b><br>ASIC1a                      ASIC1b<br>ASIC2a                      ASIC3  | <b>Voltage-dependent ion channels</b><br>G protein-coupled inward rectifier K <sup>+</sup> channels<br>K <sub>v</sub> 1.3<br>K <sub>v</sub> 1.4<br>K <sub>v</sub> 11.1<br>Nifedipine-sensitive L-type Ca <sup>2+</sup> channels<br>Tetrodotoxin-sensitive Na <sup>+</sup> channels |
| <b>Transient receptor potential (TRP) ion channels</b><br>TRPV1                      TRPV4<br>TRPC4                      TRPC5<br>TRPP2 (PKD2L1)  | <b>Other ion channels</b><br>Hyperpolarization-activated cyclic nucleotide-gated channels<br>Gap junction channels (connexins)<br>Acid-sensitive Cl <sup>-</sup> channels  |
| <b>Two-pore domain K<sup>+</sup> (K<sub>2p</sub>) channels</b><br>TALK-1                      TALK-2<br>TASK-1                      TASK-2<br>TASK-3                      TRESK<br>TWIK-1 | <b>Ligand-gated receptor ion channels</b><br>P2X <sub>1</sub> P2X <sub>2</sub><br>P2X <sub>3</sub> P2X <sub>4</sub><br>P2X <sub>5</sub> P2X <sub>7</sub><br>GABA <sub>A</sub>  |
| <b>Proton-sensing G-protein-coupled receptors</b><br>OGR1                              GPR4<br>G2A                                TDAG8   |  |

**Abb. 5:** Überblick über Ionenkanal Untereinheiten und Rezeptoren

Dargestellt ist ein Überblick über die Ionenkanal Untereinheiten und Rezeptoren, welche durch extrazelluläre Azidose moduliert und auf primär afferenten Neuronen exprimiert werden. Quelle: Holzer, 2009. Abk.: ASIC: *Acid-sensing ion channels*; TRP: *Transient receptor potential*; TRPC: *Transient receptor potential canonical*; TRPP: *Transient receptor potential polycystic*; TRPV: *Transient receptor potential vanilloid*; TALK: *Tandem of P domains in a weakly inward rectifying K<sup>+</sup> channel* (Tandem aus P-Domänen in einem schwach einwärts gerichteten K<sup>+</sup> Kanal); TASK: *TWIK-related acid-sensitive K<sup>+</sup> channel* (Kaliumkanal ähnlich dem TWIK, säuresensitiv); TWIK: *Tandem of P-domains in a Weak Inward Rectifying K<sup>+</sup> channel* (Tandem aus P-Domänen in einem schwach einwärts gerichteten Kaliumkanal); TRESK: *TWIK-related spinal cord K<sup>+</sup> channel* (Kaliumkanal verwandt mit TWIK im Rückenmark); OGR: *Ovarian cancer G-protein-coupled receptor*; G2A: *G2 accumulation*; GPR: G-Protein gekoppelter Rezeptor; TDAG8: *T-cell Death-Associated Gene 8*; P2X: *P2X purinoreceptor*; GABA: Gamma Aminobuttersäure.

Übersetzung: *Acid-sensing ion channels*: Säure-sensible Ionen-Kanäle; *Transient receptor potential ion channels*: Ionenkanäle des transienten Rezeptorpotenzials; *Two-pore domain K<sup>+</sup> channels*: Kaliumkanäle mit zwei Poren-Domänen; *Proton-sensing G-protein-coupled receptors*: Säure-sensitivierende G-Protein-gekoppelte Rezeptoren; *Voltage-dependent ion channels*: Spannungsabhängige Ionen-Kanäle; *G protein-coupled inward rectifier K<sup>+</sup> channels*: G-Protein-gekoppelte einwärtsgerichtete Kaliumkanäle; *Nifedipine-sensitive L-type Ca<sup>2+</sup> channels*: Nifedipin sensitive L-Typ Calcium-Kanäle; *Tetrodotoxin-sensitive Na<sup>+</sup> channels*: Tetrodotoxin sensitive Natrium-Kanäle; *Other ion channels*: andere Ionen-Kanäle; *Hyperpolarization-activated cyclic nucleotide-gated channels*: hyperpolarisationsaktivierter zyklisch nukleotidgesteuerter Kanal; *Gap junction channels*: Nexus-Kanäle; *Acid-sensitive Cl<sup>-</sup> channels*: Säure-sensible Chlorid-Kanäle; *Ligand-gated receptor ion channels*: Liganden-gesteuerte Rezeptor-Ionenkanäle.

Im Folgenden wird jedoch nur auf die *acid-sensing ion channel* (ASIC) eingegangen, da sie in dieser Arbeit untersucht wurden. Die ASIC-Untereinheiten, welche im GIT präsent sind, befinden sich hauptsächlich auf den peripheren Ausläufern von primär afferenten Neuronen, die von den Rückenmarks- und Vagusganglien kommen. Es gibt wenig Informationen dazu, ob die ASICs auch auf ösophagealen und gastrischen Epithelzellen exprimiert werden (Akiba et al., 2008). Es gibt verschiedene Mechanismen, die zum Schutz des Ösophagusepithels beitragen, wenn dieser Säure ausgesetzt ist. Akiba et al. (2008) konnte zeigen, dass ASICs zusammen mit den *transient receptor potential vanilloid* (TRPV1) in die ösophageale Hyperämie als Reaktion auf luminale Säureexposition involviert sind. Nicht nur die Schleimhaut trägt zum Schutz vor Magensäure im Ösophagus bei, auch der untere Ösophagussphinkter kontrolliert den Säurereflux vom Magen in die Speiseröhre. Der Sphinkter steht hierbei unter Kontrolle von neuronalen Reflexen, welche säuresensible Neurone mit einbeziehen. Diese passen den Sphinktertonus an den Säurespiegel in Speiseröhre, Magen und Duodenum an (Holzer, 2007). Die molekularen Säuresensoren, die in die Kontrolle der gastro-ösophagealen motorischen Aktivität involviert sind, wurden jedoch noch nicht charakterisiert (Holzer, 2009). Höchstwahrscheinlich sind primär afferente Neurone des enterischen Nervensystems (ENS) beteiligt, da diese auf Säure reagieren können (Schicho et al., 2003). Außerdem ist bekannt, dass Säure einen großen Anteil an dem Schmerz bei der gastroösophagealen Refluxkrankheit hat (Holzer, 2011) und sensorische Neurone im Gastrointestinaltrakt stimuliert (Holzer, 1988). Diese Stimulation wird unter anderem durch ASICs hervorgerufen (Waldmann et al., 1997). Somit sind Säure-Sensoren relevant für die pH-Homöostase auf der zellulären und systemischen Ebene. Besonders im oberen Gastrointestinaltrakt sind Säure-Sensoren wichtig, da dort die höchste Säurekonzentration im Körper herrscht. Neben ASICs sind TRP-Kanäle wichtige Säure-Sensoren. ASICs spielen bei Säure-Hypersensitivität unter Entzündungsbedingungen und Ulzera des oberen Gastrointestinaltraktes eine wichtige Rolle. Außerdem zeigen die oben genannten Punkte und ihre Hochregulierung bei inflammatorischen und nicht-inflammatorischen Krankheiten, dass ASICs potentielle Zielobjekte bei viszeraler Hypersensitivität und Schmerz bei funktionalen gastrointestinalen Krankheiten sind (Holzer, 2015). Trotzdem bedarf es weiterer Forschung über die physiologische Relevanz und die pathologische Aktivität von ASICs im Magendarmtrakt (Holzer, 2011).

### 1.3 Serotonin

Serotonin wird aus der essenziellen Aminosäure Tryptophan durch zwei enzymatische Schritte synthetisiert. Zuerst wird Tryptophan durch die Tryptophanhydroxylase hydroxyliert, was zum Produkt 5-Hydroxytryptophan führt. Der zweite enzymatische Schritt ist die Decarboxylierung von 5-Hydroxytryptophan durch die Aromatische-L-Aminosäure-Decarboxylase unter Verwendung von Pyridoxalphosphat, wodurch 5-Hydroxytryptamin (5-HT) bzw. Serotonin entsteht (Tyce, 1990). Nachdem 5-HT die Serotoninrezeptoren stimuliert hat wird es durch den Serotonintransporter (SERT) inaktiviert und in die Zelle transportiert. Er wird sowohl im enterischen Nervensystem (ENS) (Gershon und Altman, 1971), als auch in den Enterozyten der intestinalen Mukosa exprimiert (Linden et al., 2009). Der Abbau von Serotonin erfolgt hauptsächlich über das Enzym Monoaminoxidase A (MAO A) zu 5-Hydroxyindolessigsäure (Gershon et al., 1976). Serotonin hat viele Funktionen in diversen Systemen, sowohl im Gehirn als auch in der Peripherie. Ungefähr 5 % des Serotonins im Körper lassen sich im ZNS vorfinden und circa 95 % sind im Gastrointestinaltrakt zu finden. Das Serotonin wird dort von den enteroendokrinen Zellen der Schleimhaut freigesetzt, genauer gesagt dem häufigsten Subtyp der enteroendokrinen Zellen: den enterochromaffinen Zellen (Sjölund et al., 1983), welche circa 90 % des Serotonins dort speichern (Gershon, 2004). Circa 10 % des Serotonins ist in den enterischen Neuronen zu finden (Bertaccini, 1960). Serotonin wird vom MDT freigesetzt, wenn enterische Nerven stimuliert werden (Gershon und Tamir, 1981). Serotonin hat im GIT verschiedene motorische und sensorische Funktionen, vermittelt durch submuköse und enterische Neurone, welche über verschiedene 5-HT-Rezeptoren aktiviert werden. Durch Serotonin ausgelöste Reaktionen sind Übelkeit, Erbrechen, Beeinflussung der intestinalen Sekretion und Peristaltik. Außerdem spielt es eine Rolle als enterischer Neurotransmitter (Gershon, 1999). Serotonin entfaltet seine Wirkung durch Bindung an Zelloberflächenrezeptoren, welche in sieben Rezeptorfamilien und mehr als 16 Subtypen aufgrund ihrer strukturellen, funktionalen und pharmakologischen Eigenschaften unterteilt werden können (Raymond et al., 2001). 5-HT Rezeptoren sind auf enterischen Neuronen, enterochromaffinen Zellen, glatten Muskelzellen des GIT und möglicherweise auch auf Enterozyten und Immunzellen zu finden (Gebauer et al., 1993). Menschlichen Mastzellen ist es auch möglich, Serotonin zu synthetisieren und freizusetzen (Kushnir-Sukhov et al., 2007). Serotonin induziert die Adhäsion und Migration von Mastzellen (Kushnir-Sukhov et al., 2006). Im Ösophagus von

Mäusen sind Mastzellen eine nicht neuronale Quelle von Serotonin (Förster, 2008). Es wird vermutet, dass Mastzellen ein zentrales Element bei intestinalen neuroimmunologischen Interaktionen sind, lokalisiert in der Nähe zu enterischen Neuronen, vagalen Nervenendigungen und spinalen sensorischen Neuronen. Eine bidirektionale Kommunikation zwischen Mastzellen und enterischen Neuronen im MDT wird vermutet (van Nassauw et al., 2007).

### 1.3.1 Wirkung von Serotonin im Ösophagus

Wie oben bereits erwähnt entfaltet Serotonin seine Wirkung durch Bindung an Zelloberflächenrezeptoren (Raymond et al., 2001). Auf Proteinebene war die Expression im unteren Ösophagussphinkter bei Menschen am höchsten für 5-HT<sub>3A</sub> und 5-HT<sub>4</sub> Rezeptoren, gefolgt von 5-HT<sub>1A</sub> und 5-HT<sub>2A</sub> Rezeptoren. 5-HT<sub>7</sub> Rezeptoren wurden auch auf einem niedrigen Niveau exprimiert (Li et al., 2015). Somit lässt sich schlussfolgern, dass das serotonerge System eine wichtige Rolle bei der Ösophagusmotilität spielt (Li et al., 2015). In Ratten-Experimenten konnte gezeigt werden, dass Serotonin eine wichtige Rolle in der Pathogenese von GERD spielt. Der signifikante Anstieg der Expression von SERT und die Reduktion der 5-HTR<sub>4</sub> Expression schwächte hier die Effekte von Serotonin ab und dies führte folglich zu einer Schädigung von Ösophagusschleimhaut und Ösophagitis (Yang et al., 2012). Außerdem konnte gezeigt werden, dass 5-HTR<sub>7</sub> sowohl auf Zellen von ösophagealen Biopsien als auch auf humanen ösophagealen Epithelzellen (*human esophageal epithelial cell*; HEEC) exprimiert werden. Durch Experimente mit 5-HTR<sub>7</sub> Agonisten und Antagonisten konnte gezeigt werden, dass Serotonin über diesen Rezeptor die transepitheliale Resistenz und somit auch die epitheliale Barriere senkt (Wu et al., 2016). Dadurch trägt Serotonin vermutlich zur Entstehung der GERD bei (Wu et al., 2016). Während extrazellulärer Azidose wird 5-HT vermutlich gleichzeitig von Thrombozyten und Mastzellen nach Gewebsverletzung oder Entzündung freigesetzt (Dray, 1995), wodurch es die Nozizeptoren sensibler macht (Wang et al., 2013). Erhöhtes Säureaufkommen bewirkt außerdem die Freisetzung von 5-HT von enterochromaffinen Zellen in der Magenschleimhaut von Ratten (Wachter et al., 1998). Ob jedoch enterochromaffine Zellen selbst in der Lage sind, den intraluminalen pH-Wert zu messen und zu kontrollieren, ist noch nicht klar (Holzer, 2015). Yu et al. (2010) entdeckten eine Bindestelle an den ASICs (hier bei ASIC<sub>3</sub>), welche keine Protonen bindet, sondern andere Liganden. Diese konnten den Kanal auch unter normalem pH-Wert aktivieren (Yu et al., 2010). Daran anschließend

entdeckten Wang et al. (2013), dass auch 5-HT ein Ligand für diese Domäne ist und den bereits bestehenden Stromfluss sogar steigern kann. Somit vermuteten die Autor\*innen, dass der Entzündungsmediator 5-HT zum Entzündungsschmerz beiträgt, indem er durch Bindung an die sogenannte *nonproton ligand sensing domain* den Stromfluss bei ASIC3 Kanälen steigert. Dies geschieht jedoch bei 5-HT eher bei niedrigem pH-Wert (Wang et al., 2013). Deshalb ist die kombinierte Stimulierung von ASIC3 Kanälen durch 5-HT und Protonen eine potentielle Angriffstelle für die Behandlung von Entzündungsschmerz (Wang et al., 2013).

### 1.3.2 Kommunikation zwischen Magendarmtrakt und Gehirn

Bereits 1899 erkannten Bayliss und Starling, dass es ein lokales intrinsisches Nervensystem im Gastrointestinaltrakt gibt. Dieses nannten sie *law of the intestine*. Es wird heute peristaltischer Reflex genannt. Es beschreibt die Fähigkeit des Magendarmtraktes, auf Dehnung mit einem peristaltischen Bewegungsreflex zu antworten. Sie fanden heraus, dass dies unabhängig von extrinsischer Innervation geschieht (Bayliss und Starling, 1899). Somit war der Grundstein für die Beschreibung des enterischen Nervensystems (ENS) gelegt, welches aus mehr als  $10^8$  Neuronen besteht (Schemann, 2005).

Das bidirektionale Kommunikationsnetzwerk der Darm-Hirn-Achse beinhaltet das zentrale Nervensystem (ZNS), das autonome Nervensystem (ANS), das enterische Nervensystem (ENS) und die Hypothalamus-Hypophysen-Nebennierenrinden-Achse (HHN). Unter normalen Bedingungen arbeitet die Kommunikation zwischen Magen-Darm-Trakt und dem ZNS autonom. Unter pathologischen Bedingungen erreichen Signale das somatisch-sensible Nervensystem und können Symptome wie Unwohlsein, Übelkeit und Schmerzen erzeugen. Im Gegenzug reagiert das ZNS über das autonome Nervensystem, was zu gastrointestinaler Dysfunktion führen kann (Raskov et al., 2016). Weil der Körper aufgenommene Nahrung wahrnehmen und verarbeiten muss, gibt es bei dem Enterischen Nervensystem ein Netzwerk von Zellen, welche Motilität, Sekretion, Nahrungsaufnahme und sogar die Stimmung und andere Verhaltensweisen koordiniert. In der Vergangenheit wurde in diesem Zusammenhang viel zu den Neuronen des enterischen Nervensystems geforscht, jedoch weiß man heute, dass dieses Netzwerk weit über das enterische Nervensystem hinausreicht. Es besteht aus enterischen Gliazellen, Neuronen von peripheren



Ganglien, welche den MDT innervieren, intrinsischen Neuronen und spezialisierten innerierten epithelialen Sensoren, wie den enteroendokrinen Zellen (Bohórquez und Liddle, 2015). Neuronale und hormonelle Kommunikation in Kombination erlaubt dem Gehirn und den Bakterien im MDT, die Aktivität von intestinalen Zellen zu regulieren. Signale zu und von dem ZNS und den Bakterien benötigen dafür Signaltransduktionszellen, wie enterochromaffine Zellen und dendritische Zellen, welche verschiedene Transmitter, wie 5-HT, Somatostatin, Cholecystokinin und *Corticotropin-releasing Hormon*, freisetzen (Rhee et al., 2009). Studien haben gezeigt, dass Serotonin ein wichtiger Mediator bei der Kommunikation von Magendarmtrakt und Gehirn ist (Kim, 2000). Epitheliale enterochromaffine Zellen fungieren im MDT als sensorische Übersetzerinnen. Sie übertragen über ihre Ausschüttung von 5-HT die Schleimhautprozesse, wie luminale Stimuli, auf intrinsische und extrinsische primär afferente Neuronen (Gershon, 2004). Die Hormonfreisetzung leitet Informationen über eine parakrine, autokrine und endokrine Funktion weiter. Durch direkte Verbindungen zu dem enterischen Nervensystem werden dann Informationen von und zum zentralen Nervensystem weitergegeben (Berg und Kaunitz, 2016).

#### 1.4 Iberogast classic® (STW 5)

STW 5 (Steigerwald, Darmstadt, Germany) ist ein pflanzliches Arzneimittel. Es ist ein fixes Kombinationspräparat, das aus neun verschiedenen Heilpflanzen besteht. Die einzelnen Pflanzen werden häufig in Europa bei funktionalen gastrointestinalen Krankheiten eingesetzt und sind für ihre Multitargeteffekte bekannt (Saller und Reichling, 2002; Allescher, 2006; Allescher und Wagner, 2007; Khayyal et al., 2007; Abdel-Aziz et al., 2010). Die einzelnen Pflanzenextrakte sind gut charakterisierte und standardisierte (Kroll und Cordes, 2006; Wegener und Wagner, 2006) wasser-ethanolische Extrakte aus der Frischpflanze *Iberis amara* (L.) (15 %), den Blättern von *Menthae piperitae* (L.) (5 %), den Blüten von *Matricaria recutita* (L.) (20 %), den Wurzeln von *Glycyrrhiza glabra* (L.) (10 %) und von *Angelica archangelica* (L.) (10 %), den Früchten von *Carum carvi* (L.) (10 %) und von *Silybum marianum* (L.) Gaertn (10 %), den Blättern von *Melissa officinalis* (L.) (10 %) sowie dem Kraut von *Chelidonium majus* (L.) (10 %) (L.: Name des Erstbeschreibers der Pflanze: Carl von Linné). Auszugsmittel für alle Arzneidrogen mit Ausnahme von *Iberis amara* (L.) (Auszugsmittel Ethanol 50 % (V/V)) ist Ethanol 30 % (V/V) mit einer finalen Ethanolkonzentration von 31 % (Reichling und Saller, 2002).

#### 1.4.1 Anwendungsbereiche und Indikation

STW 5 wird empfohlen für die Anwendung bei der Behandlung von funktionellen und motilitätsbedingten Magen-Darm-Erkrankungen wie Reizmagen- und Reizdarmsyndrom, sowie zur unterstützenden Behandlung der Beschwerden bei Magenschleimhautentzündung (Gastritis). Man geht davon aus, dass die Kombination der neun Heilpflanzen für die vielseitige Wirksamkeit bei diesen multifaktoriellen Erkrankungen mit ihren heterogenen und überlappenden Pathomechanismen verantwortlich ist (Abdel-Aziz et al., 2017).

Das Kombinationspräparat STW 5 besitzt belegte klinische Wirksamkeit bei der Behandlung von funktionalen gastrointestinalen Krankheiten (FGIDs) (Rösch et al., 2006). FGIDs sind die häufigsten gastrointestinalen Krankheiten mit einer Prävalenz von bis zu 25 %. Sie sind charakterisiert durch morphologische und physiologische Abnormalitäten, welche häufig in Kombination vorkommen. Dazu gehören Motilitätsstörungen, viszerale Hypersensitivität, veränderte Schleimhaut- und Immunfunktion, verändertes Mikrobiom im MDT und veränderte ZNS-Verarbeitung (Drossman, 2016).

Die Deutsche Gesellschaft für Verdauungs- und Stoffwechselkrankheiten (DGVS) und die Deutsche Gesellschaft für Neurogastroenterologie und Motilität (DGNM) empfehlen in ihren S3-Leitlinien STW 5 für alle Untertypen des Reizdarmsyndroms, welche die häufigste und am besten verstandene funktionelle gastrointestinale Krankheit ist (Andresen et al., 2011). Außerdem ist STW 5 durch seine Multitargetwirkung eine effektive und sichere Therapieoption, um die Symptome der funktionellen Dyspepsie zu behandeln (Rösch et al., 2006). In der aktuellen S3-Leitlinie für Reizdarm (Update Juni 2021) wird STW 5 mit einem Empfehlungsgrad B (starker Konsensus) aufgeführt mit signifikant positiven Effekten auf Schmerz (Layer et al., 2021).

STW 5 kann zur Therapie von Funktionalen- und Motilitätsstörungen des Gastrointestinaltraktes eingesetzt werden, wie funktionelle Dyspepsie und Reizdarmsyndrom. Bei der Gastritis kann es als supportive Therapie eingesetzt werden. Hierbei wirkt es vor allem auf die Symptome von Magenschmerzen, Völlegefühl, Blähungen, gastrointestinale Krämpfe, Übelkeit und Sodbrennen (Madisch et al., 2017). Bei der Dauer der Anwendung gibt es keine Einschränkungen und richtet sich nach Form, Schwere und Verlauf der Erkrankung (Madisch et al., 2017). Kontraindikationen bestehen bei Überempfindlichkeit (Al-

lergie) gegen die Wirkstoffe von Iberogast classic<sup>®</sup>, wenn die Patient\*innen an Lebererkrankungen leiden oder in der Vorgeschichte litten oder wenn sie gleichzeitig Arzneimittel mit leberschädigenden Eigenschaften anwenden und bei Kindern unter 3 Jahren, da keine ausreichenden Erfahrungen vorliegen (Bayer 2020). Warnungen existieren, wenn Zeichen einer Leberschädigung (Gelbfärbung der Haut oder Augen, dunkler Urin, entfärbter Stuhl, Schmerzen im Oberbauch, Übelkeit, Appetitverlust, Müdigkeit) auftreten. Dann sollte die Einnahme von Iberogast classic<sup>®</sup> sofort beendet werden und ein\*e Mediziner\*in aufgesucht werden. Wenn bei erstmaliger Anwendung von Iberogast classic<sup>®</sup> die Beschwerden sich nicht bessern, sollte nach einer Woche ein\*e Mediziner\*in aufgesucht werden, um organische Ursachen auszuschließen. Sollten sich die Beschwerden unter Einnahme von Iberogast classic<sup>®</sup> verschlimmern oder neue Beschwerden hinzukommen, ist grundsätzlich ein\*e Mediziner\*in aufzusuchen.

#### 1.4.2 Wirkungsweise

Über die letzten 25 Jahre wurden sowohl die pharmakologische Wirkungsweise von STW 5 als auch die individuellen Bestandteile genauer erforscht (Abdel-Aziz et al., 2017). Für STW 5 konnten verschiedene Wirkungsmechanismen in präklinischen Studien gezeigt werden: eine Erhöhung der antralen und unteren Ösophagus-sphinkter-Kontraktibilität, eine Relaxation von Magencorpus und Fundus, was zu einem niedrigeren Magendruck führt, Antagonismus von Säuresekretion und Schleimhautentzündung und eine Multitargetwirkung an verschiedenen Rezeptoren und Ionen-Kanälen (Brierley und Kelber, 2011). Es konnte in pharmakologischen Studien gezeigt werden, dass die Einzelnextrakte der pflanzlichen Kombination STW 5 synergistisch arbeiten und dadurch kooperativ auf entzündliche Prozesse im Darm wirken (Hoser et al., 2014).

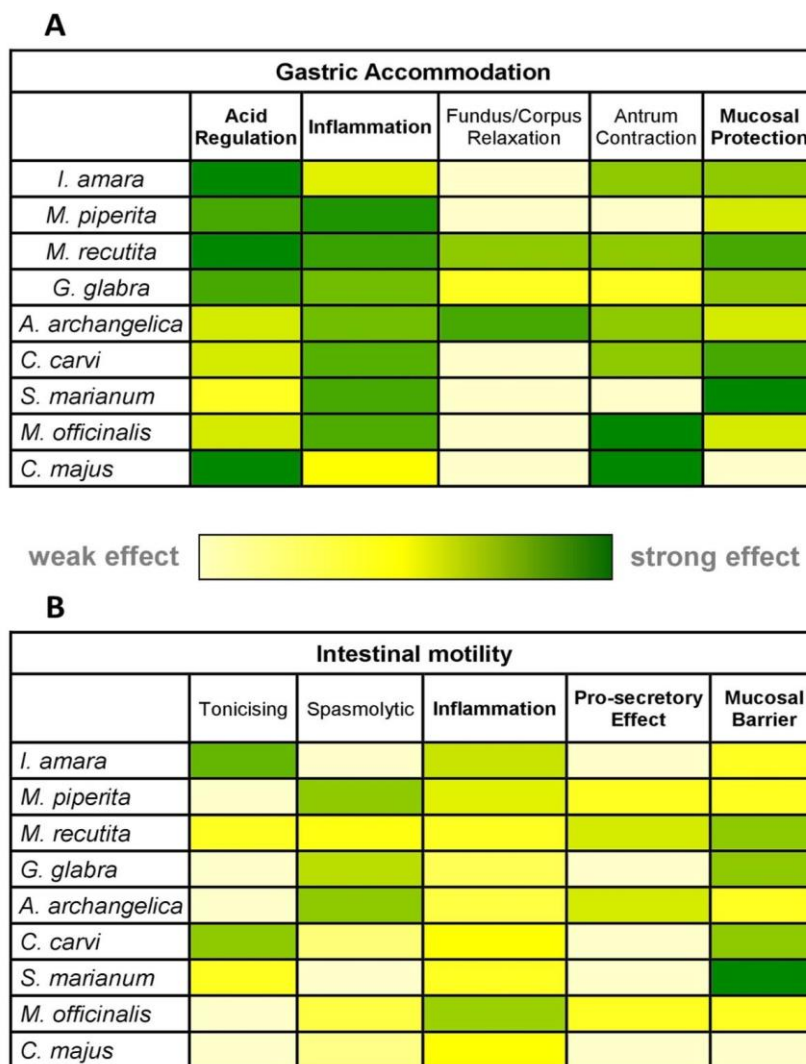
Die ersten Studien identifizierten einen dualen Wirkmechanismus auf die gastrointestinale Motilität mit einem spasmolytischen Effekt auf die Acetylcholin-induzierte Muskelkontraktionen der intestinalen Muskulatur und einen tonisierenden Effekt in relaxiertem Zustand. Dies kann in Teilen erklären, warum STW 5 sowohl bei hypotonischen, als auch bei spastischen Symptomen bei funktioneller Dyspepsie und dem Reizdarmsyndrom wirkt (Ammon et al., 2006). Dies konnte sowohl durch pharmakologische Modelle (Heinle et al., 2006) als auch durch Studien an humanen isolierten intestinalen Segmenten (Schemann et al., 2008) und auch in entzündetem intestinalen Gewebe *in vitro* und *in vivo* bestätigt

werden (Michael et al., 2009; Sibaev et al., 2013; Wadie et al., 2012). Im Magen konnte eine regionspezifische Wirkungsweise von STW 5 *in vitro* beobachtet werden. Hier wurde eine Inhibition vom  $\text{Ca}^{2+}$ -Einstrom durch *store-operated channels* (SOC) im Magenfundus beobachtet und eine Stimulation eines  $\text{Ca}^{2+}$ -Einstroms durch L-Typ-Calciumkanäle im Antrum festgestellt werden (Schemann et al., 2006). Diese regionspezifische Wirkungsweise konnte durch eine humane *in vivo* Studie bestätigt werden (Pilichiewicz et al., 2007). Im unteren Ösophagussphinkter konnte eine anspannende Wirkung, ausgelöst durch die Wirkung von STW 5 an L-Typ-Calciumkanäle *in vitro* identifiziert werden (Schemann et al., 2008). Eine fehlerhafte Säureregulation kann zu Symptomen der funktionellen Dyspepsie beitragen. Es konnte gezeigt werden, dass STW 5 die pathologisch erhöhte Säuresekretion *in vivo* und *in vitro* reduziert (Khayyal et al., 2001). Die Schleimhautbarriere ist wichtig für den Schutz des ganzen GIT vor Schäden, welche durch externe oder interne aggressive Substanzen (z.B. Drogen, Bakterientoxine, Säure, Pepsin) ausgelöst werden können. Die Schleimhautbarriere wird stark beeinflusst durch Prostaglandin E2 (PGE2) und die Muzinsekretion von Becherzellen. Es konnte gezeigt werden, dass STW 5 sowohl die Muzinsekretion als auch die PGE2-Konzentration im Gewebe *in vivo* bei Versuchen an Ratten erhöht (Khayyal et al., 2001). Auch anti-inflammatorische Effekte konnten für STW 5 im GIT gezeigt werden, sowohl *in vitro* als auch *in vivo*. Im Ösophagus konnte STW 5 die akute und sub-chronische Refluxösophagitis abschwächen (Abdel-Aziz et al., 2010). Auch im Magen konnten anti-inflammatorische Eigenschaften von STW 5 gezeigt werden (Khayyal et al., 2001).

Im unteren GIT konnte in verschiedenen *in vitro* und *in vivo* Studien die anti-inflammatorische Wirkung von STW 5 gezeigt werden. Hier sind multiple Mechanismen involviert, wie die Aktivierung von Adenosin-A2-Rezeptoren, die Inhibition von Entzündungsmediatoren wie TNF-alpha, IL-8 und Leukotrienen und die Erhöhung von Anti-Entzündungsmediatoren wie IL-10 verursachen (Abdel-Aziz et al., 2017). Außerdem konnte gezeigt werden, dass STW 5 Radikale abfangen kann und anti-oxidative Eigenschaften besitzt (Ger mann et al., 2006). Zusätzlich nimmt STW 5 Einfluss auf 5-HT-sensitive und mechano-sensitive intestinale, afferente Nervenfasern, sodass die Reaktionsfähigkeit dieser sinkt (Mittler et al., 2011). Hierbei konnte die größte Affinität von STW 5 für 5HT3- und 5HT4-Rezeptoren gefunden werden (Simmen et al., 2006). In einer *in vitro* Studie konnte gezeigt

werden, dass STW 5 5HT<sub>3</sub>-Rezeptoren blockiert (Abdel-Aziz et al., 2007), was die positive Wirkung von STW 5 auf Übelkeit und Erbrechen bei funktioneller Dyspepsie erklären könnte (Abdel-Aziz et al., 2017).

Abbildung 6 fasst die Beiträge der Einzelnextrakte von STW 5 auf die verschiedenen Pathomechanismen bei funktioneller Dyspepsie und bei Reizdarm zusammen.



**Abb. 6:** Beitrag von Einzelnextrakten von STW 5 zur Multitargetaktivität bei verschiedenen Pathomechanismen bei (A) funktioneller Dyspepsie und (B) Reizdarmsyndrom

Die zugrundeliegende Analyse basiert auf einem multi-step Clustering von publizierten pharmakologischen Daten adaptiert von Abdel-Aziz et al. (2017). Relative Effektstärken jedes Extraktes sind auf einer Skala als Farbintensität dargestellt (hellgelb für schwachen

Effekt bis dunkelgrün für starken Effekt). Übersetzung: *Gastric Accomodation*: Magenanpassung; *Acid Regulation*: Säureregulation; *Antrum Contraction*: Antrumkontraktion; *Mucosal Protection*: Schleimhautschutz; *weak effect*: schwacher Effekt; *strong effect*: starker Effekt; *Intestinal motility*: intestinale Motilität; *Tonicising*: Tonisierend; *Spasmolytic*: Spasmolytisch; *Pro-secretory Effect*: pro-sekretorischer Effekt; *Mucosal Barrier*: Schleimhautbarriere. Abkürzungen: I. amara: Iberis amara, M. piperita: Menthae piperita, M. recutita: Matricaria recutita, G. glabra: Glycyrrhiza glabra, A. archangelica: Angelica archangelica, C. carvi: Carum carvi, S. marianum: Silybum marianum, M. officinalis: Melissa officinalis, C. majus: Chelidonium majus Quelle: Ulrich-Merzenich et al., 2019.

## 1.5 Multitargetwirkung von Pflanzen

Pflanzliche Arzneimittel können aus verschiedenen Pflanzen bestehen und komplexe Extrakte mit einer großen Anzahl von aktiven Substanzen enthalten. Die Kombination eben dieser Extrakte mit verschiedenen gastrointestinal aktiven Substanzen zeigt sich als vorteilhaft für heterogene Krankheiten wie z.B. funktionelle Dyspepsie (Rösch et al., 2006).

Der "Synergistische Multi-target-Effekt" bezeichnet den Umstand, dass Einzelbestandteile eines Mono-Extrakts oder einer Pflanzenextraktkombination (beides Vielstoffgemische) nicht nur ein einzelnes Ziel im Körper erreichen, sondern verschiedene und dafür potentiell in einer synergistischen Weise kooperieren (Wagner und Ulrich-Merzenich, 2009). Mögliche Medikamentenziele sind hierbei Enzyme, Substrate, Metaboliten und Proteine, wie Rezeptoren, Ionenkanäle, Transportproteine, DNA/RNA, Ribosomen, monoklonale Antikörper, physikalisch-chemische Mechanismen und Signalkaskaden (Imming et al., 2006). In einem biologischen System wirken bei einem Vielstoffgemisch alle Einzelextrakte zusammen und können durch ihre Kombination sogar einen höheren Effekt bewirken, als von den Einzelextrakten allein erwartet. Eine solche synergistische Wirkung wird für STW 5 mit ihrer Kombination aus neun Einzelextrakten (Abdel-Aziz et al., 2017) vermutet. Eine solche Kombination kann aber auch zu additiven oder antagonistischen Effekten führen.

### 1.5.1 Multitargetwirkung von STW 5 am Beispiel des Reizdarmsyndroms

Viele Krankheiten sind ein Zusammenspiel von verschiedenen lokalen und systemischen Gegebenheiten. Ihre Entstehung ist komplex und dies spiegelt sich auch in den Auswirkungen auf den Körper wider. Es bedarf häufig einer Therapie, die sowohl die Entstehungsmechanismen angeht als auch die Auswirkungen behandelt. Am Beispiel von Iberogast classic®/STW 5 soll hier das Konzept der Multitargetwirkung von Pflanzenextrakten erklärt werden. Das Reizdarmsyndrom ist eine Krankheit mit multifaktorieller Entstehung

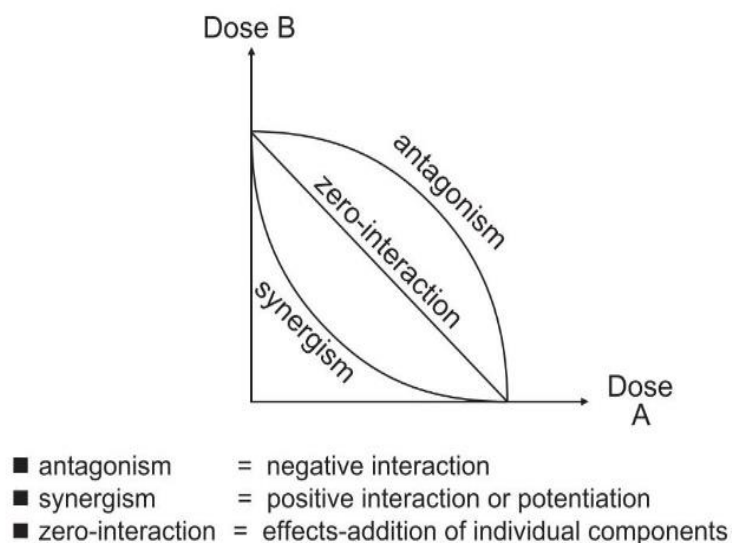
(Enck et al., 2016). Nach den Rome IV Kriterien sind Symptome des Reizdarmsyndroms eine Kombination der Folgenden: Motilitätsstörungen, viszerale Hypersensitivität, veränderte Schleimhaut- und Immunfunktion, verändertes Mikrobiom und veränderte ZNS-Prozessierung (Drossman, 2016). Es ist nicht wahrscheinlich, dass ein einziges Medikament allein bei dieser Krankheit helfen wird. Viele Patient\*innen brauchen einen komplexeren Ansatz mit multidisziplinärer Therapie, welche unter anderem Ernährungstherapie, Medikation und Psychotherapie beinhaltet (Enck et al., 2016). Medikamente mit einem einzigen Angriffspunkt helfen Patient\*innen bei speziellen pathophysiologischen Abnormalitäten. Beim Reizdarmsyndrom jedoch werden antispasmodische Medikamente, Laxantien, Durchfallmedikamente, Schmerzmedikamente, selektive Antibiotika und Probiotika verwendet. Trotz allem müssen viele von diesen Medikamenten kombiniert werden, um die Symptome zu lindern. Somit lässt sich festhalten, dass eine multifunktionelle Therapie des Reizdarmsyndroms mit einer höheren Wahrscheinlichkeit die gewünschte therapeutische Wirkung erzielt (Allescher et al., 2020).

Es konnte in diversen Studien gezeigt werden, dass STW 5 Auswirkungen auf viele Entstehungsmechanismen und Symptome von Erkrankungen im Magendarmtrakt hat. Es beeinflusst die Säureregulation, die Expression von bestimmten Kanälen und Rezeptoren, die Entzündung, die Muskelrelaxation im Fundus/Korpus des Magens, die Kontraktion des Magenansatzes und den Schleimhautschutz (Abdel-Aziz et al., 2017). Durch diesen *Multitarget*-Effekt von STW 5 können die zugrundeliegenden Mechanismen des Reizdarmsyndroms behandelt werden, womit eine generelle Verbesserung der Reizdarmsymptome erreicht werden kann (Allescher et al., 2020).

## 1.6 Synergie

Schon sehr lange werden Medikamente in Kombination genutzt, um Krankheiten zu behandeln und Symptome zu lindern. Die traditionelle chinesische Medizin (TCM) und die traditionelle indische Medizin, die auch heute noch in hohem Maße pflanzliche Medikamente einsetzen, sind klassische Beispiele. Aber auch bei komplexen Pathophysiologien gehört die Gabe von Medikamentenkombinationen zum täglichen Alltag in der westlichen Medizin (Beispiele: Kombination antiretroviraler Therapie bei der Behandlung von HIV-1 positiven Personen (Atta et al., 2019), Kombination von ACE-Hemmern,  $\beta$ -Blockern und Aldosteronantagonisten bei der Herzinsuffizienztherapie (Tomasoni et al., 2022)).

Die Schwierigkeit eine einheitliche Definition von Synergie zu finden zeigt sich unter anderem daran, dass es viele Publikationen zu dem Thema gibt (Loewe, 1953). Mehr oder weniger einig sind sich die Verfasser darin, dass Synergie entsteht, wenn zwei oder mehr Komponenten (Medikamente) zusammenkommen und der Effekt größer ist als die Summe der Einzeleffekte der Komponenten, wenn diese für sich gegeben werden. Dabei entsteht entweder mit gleicher Dosis ein "1+1>2"-Effekt oder ein gleicher Effekt mit verringerter Dosis ( $D_1 + D_2 < 1$ ) (Huang et al., 2019). Eine genauere Erklärung ergibt sich durch die "Isobologramm-Methode" von Loewe (1953). Sie bildet die Grundlage für mehrere Synergiebestimmungsmethoden und erfasst die Beziehung zweier Wirkstoffe in Kombination graphisch. Hierbei wird dargestellt, wie sich die beiden Wirkstoffe zueinander verhalten, mit einer X und einer Y-Achse, welche für die Dosisraten der Einzelkomponenten in Bezug auf das gleiche Effektniveau (z.B.: IC<sub>50</sub>) stehen (siehe Abbildung 7). Das Isobologramm wurde in Folge von Berenbaum mathematisch beschrieben (Berenbaum, 1989).



**Abb. 7:** Isobole für keine Interaktion, Synergismus und Antagonismus

Pharmakologische *in vitro* und Tierversuche können für die Darstellung der Isobole bei einer Mischung von zwei Substanzen genutzt werden. Diese Methode bietet eine graphische Darstellung mit linear angeordneten X- und Y-Achsen, welche die Dosisrate von den einzelnen Komponenten darstellt. Übersetzung: *Dose*: Dosis; *Antagonism*: Antagonismus; *zero-interaction*: keine Interaktion; *Synergism*: Synergismus; *negative interaction*: negative Interaktion; *positive interaction*: positive Interaktion oder Potenzierung; *effects-addition of individual components*: Effekaddition von einzelnen Komponenten. Quelle: Wagner und Ulrich-Merzenich, 2009.



Wenn zwei Medikamente kombiniert werden, ist Synergie, betrachtet bezogen auf den Effekt, ein Effekt, welcher größer ist als durch die einfache Addition der Einzeleffekte zu erwarten wäre. Die Dosis, die für den Effekt benötigt wird, ist geringer. Bei antagonistischen Effekten ist der Effekt geringer als durch die Addition der Einzeleffekte zu erwarten wäre. Es wird eine höhere Dosis für den gegebenen Effekt benötigt.

Der Kombinationsindex (CI) formuliert diesen Zusammenhang mathematisch (siehe Seite 64ff). Ist  $CI=1$  handelt es sich um einen additiven Effekt. Ein  $CI<1$  zeigt einen synergistischen Effekt und ein  $CI>1$  einen antagonistischen Effekt (Chou, 2006). Der Kombinationsindex (CI) ist ein quantitatives Maß basierend auf dem Massenwirkungsgesetz des Grades der Arzneimittelwechselwirkung in Bezug auf Synergismus und Antagonismus für einen gegebenen Endpunkt der Effektmessung (Chou und Talalay, 1981). Zur einfachen Berechnung des CI haben die Autoren ein Computerprogramm entwickelt (CompuSyn (2005) / CalcuSyn (1998)). Hier werden Dosis und Effektdaten ( $fa$ ) für jedes Medikament allein und ihre Kombination eingegeben. Zur Berechnung des Kombinationsindexes sollten die Medikamente in mindestens fünf Konzentrationen im Versuch eingesetzt werden. Hierbei sollten idealerweise zwei Konzentrationen über dem  $IC_{50}$  und zwei Konzentrationen unter dem  $IC_{50}$  für den untersuchten Effekt liegen (Chou, 2014).

Für ein einzelnes Medikament kann die Dosis und die entsprechende Wirkung in einem zweidimensionalen Dosis-Wirkungs-Diagramm angegeben werden. Wenn jedoch die Interaktion von zwei Medikamenten oder Wirkstoffen untersucht werden soll, kommt dies als dritter Parameter hinzu, sodass ein dreidimensionales Diagramm nötig wäre. Durch Festlegung eines Punktes auf der Dosis-Wirkungs-Kurve pro Medikament, für welchen dann die Kombination ausgerechnet wird, gelangt man von dem dreidimensionalen Diagramm zurück in eine zweidimensionale Darstellung durch das Isobologramm. Dieser Punkt ist häufig der  $IC_{50}$ -Wert, also die mittlere inhibitorische Konzentration, bei der ein Medikament 50 % der Inhibition erreicht. Es werden sich also zwei Medikamente in Kombination bei einer gleichen inhibitorischen Konzentration von 50 %, 75 % et cetera angeschaut. Hierdurch kann sich die Interaktion bei einem festgelegten Punkt angeschaut werden. Eine Isobole kann als eine Linie oder Kurve zwischen zwei Punkten des gleichen Effekts verstanden werden (Wagner und Ulrich-Merzenich, 2009). Die meiste Literatur bezieht sich hier auf die inhibitorische Konzentration (IC), jedoch kann die Wirkung auch

auf den Effekt und somit die Effektkonzentration (EC) bezogen werden. Das Erstellen von Isobolen benötigt das Wissen der Konzentrationen und der Einzelkomponenten bei verschiedenen EffektleveIn. Somit können die Konzentrationen von Substanzen anhand der Isobolen ermittelt werden, welche am meisten für den Synergieeffekt sorgen. Zusammengefasst lässt sich sagen, dass Daten von verschiedenen Effektstärken nötig sind für die Identifikation der Interaktion, da Qualität und Quantität der Interaktion von der Effektstufe abhängen (Wagner und Ulrich-Merzenich, 2009).

Die Ziele der Synergieforschung sind 1) die Effektivität des therapeutischen Effekts steigern 2) die Dosis erniedrigen, bei dem gleichen oder größeren Effekt, um Toxizität zu vermeiden, 3) die Medikamentenresistenz minimieren oder verlangsamen, und 4) selektiven Synergismus gegen ein bestimmtes Ziel erzeugen (Chou, 2006). Ob jedoch zwei oder mehr Medikamente synergistische Effekte haben muss experimentell bewiesen werden (Huang et al., 2019). Synergie-Forschung ist in den letzten Jahren in der Phytomedizin immer wichtiger geworden. Hierbei gilt es synergistische Effekte eines Kombinationspräparats, bestehend aus verschiedenen bioaktiven Substanzen, genauer zu untersuchen und die zugrundeliegenden Mechanismen zu verstehen (Wagner und Ulrich-Merzenich, 2009). Ein Beispiel ist die Wirkung von STW 5 auf die IL-8-Freisetzung im oberen Gastrointestinaltrakt. IL-8 ist eins der zentralen Zytokine bei Entzündungen im oberen Gastrointestinaltrakt (Souza et al., 2009). Inwiefern STW 5 nun in diesen Mechanismus eingreift, wurde anhand von Versuchen mit HET-Zellen (MDT-Epithelzellen) gezeigt. Hier wurden die Zellen mit den verschiedenen Extrakten von STW 5 stimuliert und beobachtet, wie sich die IL-8-Freisetzung verändert. Das hat gezeigt, dass *Iberis Amara (L.)* (STW 6) eine deutliche Freisetzung von IL-8 induziert, obwohl die IL-8-Freisetzung durch den Gesamtextrakt (STW 5) vergleichbar mit der Kontrollprobe war. Daraufhin wurden Kombinationsversuche mit *Iberis Amara (L.)* gemacht um zu schauen, welcher Extrakt die IL-8-Freisetzung von STW 6 wieder mindert (Ulrich-Merzenich et al., 2019).

**Tab. 2:** Die IC55 und IC75-Werte von Dreierkombinationen und die Kombinationsindices (CI)

| Auswahl von Pflanzenextraktkombinationen |                              |                              | IC-Werte ( $\mu\text{l/ml}$ ) |                  | Kombinationsindex (CI)  |                      |
|--|------------------------------|------------------------------|-------------------------------|------------------|-------------------------|----------------------|
|  |                              |                              | IC <sub>55</sub>              | IC <sub>75</sub> | CI bei IC <sub>55</sub> | bei IC <sub>75</sub> |
| <i>Iberis amara</i>                      | <i>Menthae piperitae</i>     | <i>Matricaria recutita</i>   | 0.82;                         | 0.05             | 1.0;                    | 0.02                 |
| <i>Iberis amara</i>                      | <i>Menthae piperitae</i>     | <i>Glycyrrhiza glabra</i>    | 4.44;                         | 6.91             | 0.12;                   | 2.68                 |
| <i>Iberis amara</i>                      | <i>Menthae piperitae</i>     | <i>Angelica archangelica</i> | 48.0;                         | 1635.7           | 1.14;                   | 50.95                |
| <i>Iberis amara</i>                      | <i>Menthae piperitae</i>     | <i>Carum carvi</i>           | 17.84;                        | 1170.4           | 1282;                   | 22 103               |
| <i>Iberis amara</i>                      | <i>Menthae piperitae</i>     | <i>Silybum marianum</i>      | 2.48;                         | 15.6             | 0.18;                   | 0.9                  |
| <i>Iberis amara</i>                      | <i>Matricaria recutita</i>   | <i>Glycyrrhiza glabra</i>    | 1.76;                         | 649.8            | 0.97;                   | 125.8                |
| <i>Iberis amara</i>                      | <i>Matricaria recutita</i>   | <i>Carum carvi</i>           | 7.04;                         | 112.7            | 480.4;                  | 460102               |
| <i>Iberis amara</i>                      | <i>Glycyrrhiza glabra</i>    | <i>Angelica archangelica</i> | 44.31;                        | 61.1             | 55.6;                   | 25.25                |
| <i>Iberis amara</i>                      | <i>Glycyrrhiza glabra</i>    | <i>Carum carvi</i>           | 9.55;                         | 246.1            | 55.6;                   | 25.26                |
| <i>Iberis amara</i>                      | <i>Glycyrrhiza glabra</i>    | <i>Silybum marianum</i>      | 3.6;                          | 47.2             | 0.32;                   | 0.41                 |
| <i>Iberis amara</i>                      | <i>Angelica archangelica</i> | <i>Carum carvi</i>           | 6.04E-4;                      | 6.1E11           | 0.03;                   | 1.8E10               |
| <i>Iberis amara</i>                      | <i>Carum carvi</i>           | <i>Silybum marianum</i>      | 1.67;                         | 3.01             | 0.15;                   | 0.08                 |

Die IC-Werte sind angegeben als Extraktkonzentrationsäquivalente zu  $\mu\text{l/ml}$  von STW 5. Die CI-Werte stimmen mit IC55 und IC75-Werten überein. Grau markiert sind die synergistischen Kombinationen. Entnommen aus Ulrich-Merzenich et al., 2019.

Es konnte gezeigt werden, dass *Iberis amara* (L.) die IL-8-Freisetzung stark in die Höhe trieb, obwohl STW 5 als Gesamtextrakt keine IL-8-Erhöhung zeigt. Deshalb wurde untersucht, welche Extrakte die durch *Iberis amara* (L.) verursachte IL-8-Erhöhung wieder senken. Hierbei wurden Dreierkombinationen untersucht, bei denen die CI-Werte zwischen starker Synergie (CI<0.03) bis zu sehr starkem Antagonismus (CI: 480) reichten. Es konnte gezeigt werden, dass *Silybum marianum* (L.) *gaertn* der effektivste Kombinationspartner war, um die IL-8-Freisetzung wieder zu senken (Ulrich-Merzenich et al., 2019).

### 1.7 Fragestellung

Um das Verständnis der Pathogenese der Refluxösophagitis zu vertiefen, wurden folgende Hypothesen generiert, die sich mit verschiedenen Aspekten der Krankheit und ihrer Behandlung befassen.

Ein Kommunikationsnetzwerk zwischen säuresensiblen Ionenkanälen und dem Serotoninsystem ist in die Pathogenese der Refluxösophagitis involviert. Speziell die säuresensible Ionenkanäle (ASICs) und die 5-Hydroxytryptaminrezeptoren (5-HTR) sowie 5-Hydroxytryptamin (Serotonin) sind an Entzündungsprozessen und Schmerzwahrnehmung im Ösophagus beteiligt. Bestimmte Zelltypen sind wesentlich für die Prozesse, die mit der Refluxösophagitis und ihren Symptomen verbunden sind. Omeprazol und STW 5 beeinflussen dieses Kommunikationsnetzwerk, wobei der Einfluss von STW 5 unter anderem durch seine Multitargetwirkung hervorgerufen wird. Die Freisetzung von Calcium

im Ösophagus wird durch Omeprazol und STW 5 beeinflusst und es gibt eine synergistische Wirkung von Einzelextrakten von STW 5 auf diese Freisetzung.

Grundlage für diese Hypothesen waren Vorarbeiten zum Kommunikationsnetzwerk zwischen säuresensiblen Ionenkanälen (ASICs) und 5-Hydroxytryptaminrezeptoren (Serotonin). In 30-40 % der Fälle einer GERD persistieren die Symptome der Patient\*innen trotz PPI-Therapie (Souza, 2010), sodass davon auszugehen ist, dass weitere Prozesse als nur die Säure an der Entstehung der Erkrankung und der Symptome beteiligt sind. Außerdem konnte festgestellt werden, dass für die Schleimhautverletzung bei funktioneller Dyspepsie und Reizdarmsyndrom ein Entzündungsprozess wichtig ist. Da diese beiden Krankheiten bei Symptomen und Pathogenese mit GERD überlappen, wurde in dieser Arbeit hauptsächlich mit einem Modell einer Refluxösophagitis bei Ratten sowie an humanen Ösophagusproben geforscht. Hierbei wurden die Tiere zusätzlich zur PPI-Therapie mit dem pflanzlichen Präparat STW 5 behandelt. In vorherigen Studien erfolgten bereits die Untersuchungen der Genexpression und der Proteinnachweis einiger säuresensibler Kanäle und einiger 5-HTR mittels Western Blot. In dieser Arbeit wurden die Western Blot Versuche weiterentwickelt, um final alle relevanten Genexpressionsdaten mit den Western Blot Daten vergleichen zu können. Weiterhin herrschte Unklarheit, ob es auch möglich ist, die untersuchten Kanäle im humanen Ösophagusgewebe nachzuweisen und wie diese Expression mit der Symptomausprägung zusammenhängt. Da STW 5 eine nachgewiesene Multitargetwirkung hat und nicht nur Entzündung eine wichtige Rolle bei der GERD spielt, sondern auch die Motilität, wurde anhand von *Human Intestinal Smooth Muscle Cells* (HISMC) die Calciumfreisetzung in diesen Zellen durch Stimulierung mit verschiedenen Substanzen (Capsaicin, Omeprazol, STW 5, Einzelextrakte von STW 5) untersucht. Durch Stimulierung mit einer Kombination von Einzelextrakten von STW 5 sollte erforscht werden, inwiefern einzelne Substanzen synergistisch auf die Calciumfreisetzung wirken.

## 2. Material und Methoden

### 2.1 Zellen

#### 2.1.1 Fibroblasten

Humane Hautfibroblastenzellen (*normal human dermal fibroblasts-cells*; NHDF-C) wurden von PromoCell (Heidelberg, Deutschland) bezogen. Die Zellen wurden aus der Dermis juveniler Vorhaut isoliert.

#### 2.1.2 *Human Intestinal Smooth Muscle Cells* (HISMC)

HISMC wurden von ScienCell Research Laboratories (Carlsbad, USA) bezogen. Die humanen intestinalen Muskelzellen wurden aus dem Gastrointestinaltrakt isoliert und in Flüssigstickstoff eingefroren. HISMCs aus den Passagen 2-10 wurden in den Versuchen eingesetzt.

### 2.2 Humane Proben

Die Proben wurden im Rahmen endoskopischer Untersuchungen in der Abteilung für gastrointestinale Endoskopie der Universität Kairo, Kairo, Ägypten von Dr. Abdel Meguid Kassem gewonnen und freundlicherweise zur Verfügung gestellt. Alle Patient\*innen gaben ihren *Informed consent* und alle durchgeführten Maßnahmen wurden durch das lokale ethische Komitee genehmigt. Die Maßnahmen wurden durchgeführt nach den *Ethical guidelines* der Deklaration von Helsinki (as revised in 2000).

### 2.3 Medikamente

- STW 5/Iberogast classic®:

Das aus neun Heilpflanzen bestehende Phytotherapeutikum und seine Einzextrakte wurden von der Steigerwald Arzneimittelwerk GmbH, Bayer Consumer Health als Lyophilisate zur Verfügung gestellt. Diese wurden in *Dulbecco's Modified Eagle's Medium* (DMEM) gelöst (Konzentrationen siehe Tabelle 3). Die Stammlösungen wurden in Aliquoten bei 80 °C eingefroren. Vor Versuchsbeginn wurden Aliquote aufgetaut und die Versuchslösungen hergestellt (1:10 Verdünnung).

**Tab. 3:** STW 5 und seine Einzelkomponenten

| Komponenten         | Binominaler Name                    | Name                   | mg/ml* | %   |
|---------------------|-------------------------------------|------------------------|--------|-----|
| <b>STW 5</b>        |                                     | Iberogast classic®     | 59     | 100 |
| <b>STW 6</b>        | <i>Iberis amara (L.)</i>            | Bittere Schleifenblume | 18     | 15  |
| <b>STW 5-K II</b>   | <i>Menthae piperitae (L.)</i>       | Pfefferminzblätter     | 88     | 5   |
| <b>STW 5-K III</b>  | <i>Matricaria recutita (L.)</i>     | Kamillenblüten         | 58     | 20  |
| <b>STW 5-K IV</b>   | <i>Glycyrrhiza glabra (L.)</i>      | Süßholzwurzel          | 100    | 10  |
| <b>STW 5-K V</b>    | <i>Angelica archangelica (L.)</i>   | Angelikawurzel         | 99     | 10  |
| <b>STW 5-K VI</b>   | <i>Carum Carvi (L.)</i>             | Kümmel                 | 47     | 10  |
| <b>STW 5-K VII</b>  | <i>Silybum marianum (L.) gaertn</i> | Mariendistel           | 20     | 10  |
| <b>STW 5-K VIII</b> | <i>Melissa officinalis (L.)</i>     | Melissenblätter        | 71     | 10  |
| <b>STW 5-K IX</b>   | <i>Chelidonium majus (L.)</i>       | Schöllkraut            | 75     | 10  |

Die Tabelle zeigt STW 5 und seine Einzelkomponenten. \*: Lösungsmittel Alkohol (31%). Adaptiert von Abdel-Aziz et al., 2017.

- Capsaicin:

Der TRPV1 Blocker wurde von Cayman Chemicals (Ann Arbor, Michigan, USA) bezogen (LOT#: 0462904-29). Es wurde als ein kristalliner Feststoff geliefert. Capsaicin wurde für *in-vitro* Experimente verwendet und mit DMSO und DMEM (ohne Phenolrot) zu einer Konzentration von 80 µM verdünnt.

- Omeprazol

Der PPI Omeprazol wurde von Sigma Aldrich Deutschland bezogen. Es wurde in DMEM gelöst und in einer Konzentration von 10-100 µg/ml eingesetzt.

## 2.4 Chemikalien und Reagenzien

### 2.4.1 Chemikalien

Alle Chemikalien waren von analytischem Grad. Die Quelle der Chemikalien, die in diesen Versuchen benutzt wurden, sind in der folgenden Tabelle aufgelistet:

**Tab. 4:** Chemikalien

| <b>Chemikalien</b>                                     | <b>Quelle</b>                         |
|--|---------------------------------------|
| Acrylamid/Bis-Acrylamid-Lösung (30 %)                  | Sigma Aldrich, St. Louis, USA         |
| Ammonium persulphat                                    | Sigma Aldrich, St. Louis, USA         |
| Dimethylsulfoxid (DMSO)                                | Sigma Aldrich, St. Louis, USA         |
| Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA)                    | Sigma Aldrich, St. Louis, USA         |
| Essigsäure   | Sigma Aldrich, St. Louis, USA         |
| Ethanol (absolute)                                     | AppliChem, Deutschland                |
| Fetales Kälberserum ( <i>fetal bovine serum</i> , FBS) | Gibco Life Technologie, Carlsbad, USA |
| Formaldehydlsg. 4 %, gepuffert pH 6,9                  | Sigma Aldrich, St. Louis, USA         |
| Formaldehyd 37 wt. %                                   | Sigma Aldrich, St. Louis, USA         |
| Glycerol   | Merck, Deutschland                    |
| Glycin   | Sigma Aldrich, St. Louis, USA         |
| Magermilchpulver                                       | Sigma Aldrich, St. Louis, USA         |
| Methanol (100 %)                                       | Applichem GmbH, Deutschland           |
| Mowiol (wasserlösliches Einbettmittel)                 | Hoechst, Deutschland                  |
| N,N,N',N'-Tetramethylethylenediamin (TEMED)            | Sigma Aldrich, St. Louis, USA         |
| Natriumdesoxycholat                                    | Sigma Aldrich, St. Louis, USA         |
| Natriumfluorid (NaF)                                   | Sigma Aldrich, St. Louis, USA         |
| Natriumthovanadat                                      | Sigma Aldrich, St. Louis, USA         |
| Natriumpyrophosphat                                    | Sigma Aldrich, St. Louis, USA         |
| Poly-L-Lysine-Lösung (Coating-Lösung)                  | Biochrom/Merck, Deutschland           |
| Sodium dodecyl sulfat-Lösung (SDS, 20 %)               | Biorad, Deutschland                   |
| Protease Inhibitor Cocktail                            | Sigma Aldrich, St. Louis, USA         |
| Tris Base (Trizma)                                     | Sigma Aldrich, St. Louis, USA         |
| Tris HCL   | Sigma Aldrich, St. Louis, USA         |
| Triton X 0,1 %   | Sigma Aldrich, St. Louis, USA         |
| Tween 20   | Sigma Aldrich, St. Louis, USA         |

### 2.4.2 Lösungen

- Poly-L-Lysine-Lösung (Coating-Lösung): 1,5 ml Poly-L-Lysine (Stocklösung 0,1 mg/ml) von Biochrom/Merck, Deutschland wurde mit 8,5 ml sterilem Aqua Destillata verdünnt (Endkonzentration: 0,015 mg/ml).
- Calcium und Magnesium freier-Dulbecco's phosphate buffered saline (DPBS): Es wurde von Life Technologies (Gibco), Deutschland bezogen.
- Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM): Es wurde von Life Technologies (Gibco), Deutschland bezogen.
- Fetales Bovine Serum (FBS) stammte von Life Technologies (Gibco).
- Trypsin (10-fach konzentriert, Lösungsmittel DPBS): Es wurde bezogen von PAA, Deutschland. 5 ml der Lösung wurden mit 45 ml DPBS verdünnt (Endkonzentration 0,25% Trypsin).
- Antibiotika: Penicillin/Streptomycin-Gemisch (je 5000 IU/ml) wurde von Thermo Fisher Scientific Deutschland bezogen.
- Western Blot Lösungen:

#### **RIPA Lysepuffer für die Proteinisolation pH 7,5 (vor SDS und Tritonzugabe; Lösungsmittel Aqua dest.)**

|                             |        |
|-----------------------------|--------|
| Tris HCL                    | 20 mM  |
| Triton X-100                | 1 %    |
| Glycerol                    | 20 mM  |
| EDTA                        | 2.5 mM |
| Sodium Pyrophosphat         | 10 mM  |
| NaF                         | 50 mM  |
| SDS                         | 0,1 %  |
| Sodium Desosycholat         | 1 %    |
| Protease Inhibitor Cocktail | 1 %    |
| Sodium Orthovanadat         | 0,5 %  |



**10 % Separations Gel-Puffer (8 ml)**

|                                |         |
|--------------------------------|---------|
| Aqua Destillata                | 3,2 ml  |
| Acrylamid/Bis-Acrylamid (30 %) | 2,67 ml |
| 1,5 M Tris-Base, pH 8,8        | 2 ml    |
| SDS (10 %)                     | 80 µL   |
| Ammonium Persulphat (10 %)     | 80 µL   |
| TEMED                          | 8 µL    |

**6 % Stacking Gel-Puffer (5ml)**

|                                |         |
|--------------------------------|---------|
| Aqua Destillata                | 2,6 ml  |
| Acrylamid/Bis-Acrylamid (30 %) | 1 ml    |
| 0,5 M Tris-HCL, pH 6,8         | 1,25 ml |
| SDS (10 %)                     | 50 µL   |
| Ammonium persulphat (10 %)     | 50 µL   |
| TEMED                          | 5 µL    |

**Protein Sample Puffer**

|                  |                |
|------------------|----------------|
| Tris HCL, pH 6,8 | 50 mM          |
| SDS              | 2 % (w/v)      |
| Glycerol         | 10 % (v/v)     |
| Bromophenol Blau | 0,0025 % (w/v) |
| 1 M DTT          | 10 % (v/v)     |

**Laemmli Gelelektrophorese-Puffer (Running-Puffer) pH 8,3**

|           |             |
|-----------|-------------|
| Tris Base | 25 mM       |
| SDS       | 0,5 % (w/v) |
| Glycine   | 192 mM      |

**Towbin Transferpuffer pH 8,6**

|          |        |
|----------|--------|
| Tris HCL | 25 mM  |
| Glycine  | 192 mM |

|          |            |
|----------|------------|
| Methanol | 20 % (v/v) |
|----------|------------|

***Tris-buffered saline (TBS) pH 7,6***

|           |       |
|-----------|-------|
| Tris Base | 20 mM |
|-----------|-------|

|      |        |
|------|--------|
| NaCl | 140 mM |
|------|--------|

***Waschpuffer (Tris-buffered saline with Tween20 (TBST)) pH 7,6***

|           |       |
|-----------|-------|
| Tris Base | 20 mM |
|-----------|-------|

|      |        |
|------|--------|
| NaCl | 140 mM |
|------|--------|

|          |             |
|----------|-------------|
| Tween 20 | 0,1 % (v/v) |
|----------|-------------|

**Blockierlösung:**

|            |        |
|------------|--------|
| TBS pH 7,6 | 150 ml |
|------------|--------|

|             |       |
|-------------|-------|
| Milchpulver | 7,5 g |
|-------------|-------|

|          |           |
|----------|-----------|
| Tween 20 | 1 % (v/v) |
|----------|-----------|

**Antibody-Dilution-Buffer:**

|            |       |
|------------|-------|
| TBS pH 7,6 | 20 ml |
|------------|-------|

|             |     |
|-------------|-----|
| Milchpulver | 5 g |
|-------------|-----|

|          |           |
|----------|-----------|
| Tween 20 | 1 % (v/v) |
|----------|-----------|

**1. Antikörper**

|                          |       |
|--------------------------|-------|
| Antibody-Dilution-Buffer | 10 ml |
|--------------------------|-------|

|                                   |       |
|-----------------------------------|-------|
| 2. Antikörper (ASIC, 5-HTR, SERT) | 10 µl |
|-----------------------------------|-------|

Verdünnung 1:1000

**3. Antikörper**

|                          |       |
|--------------------------|-------|
| Antibody-Dilution-Buffer | 40 ml |
|--------------------------|-------|

|                                  |       |
|----------------------------------|-------|
| 4. Antikörper (goat-anti-rabbit) | 20 µl |
|----------------------------------|-------|

Verdünnung 1:2000

**Stripping Buffer (Lot# QB211998) pH 8,0:**

Der Stripping Puffer wurde von Thermo Fisher Scientific, Deutschland bezogen.

**Western blotting Luminol Reagenz:**

Detection Reagent 1, Peroxide Solution (Lot# QB213483)

Detection Reagent 2, Luminol Enhancer Solution (Lot# QC213481A)

Bezogen wurden diese Lösungen von Thermo Fisher Scientific, Deutschland.

**2.4.3 Wachstumsmedium**

Nährmedium:

Das Nährmedium wurde zur Propagierung der Zellen hergestellt, wobei für die verschiedenen Versuche unterschiedliche Konzentrationen des Nährmediums verwendet wurden.

Die Herstellung erfolgte wie folgt:

- 1 % FBS haltiges Serum (495 ml DMEM + 5 ml FBS)
- 10 %/12 % FBS haltiges Serum (440/450 ml DMEM + 50/60 ml FBS) mit 1 ml Penicillin/Streptomycin (je 5000 IU/ml) auf 100 ml Medium

Freezing Medium:

Das Einfriermedium wurde hergestellt, um die Zellen in Flüssigstickstoff lagern zu können. Es wurde wie folgt hergestellt: 7 ml DMEM (mit Phenolrot/ohne Phenolrot), 2 ml FBS, 1 ml DMSO. Die Lösung ohne Phenolrot wurde für die Versuche eingesetzt, um den Einfluss des Phenolrots auf die fluorometrische Messung zu vermeiden.

**2.5 Kits**

- In Vitro Toxicology Assay Kit, Resazurin basiert (TOX-8)

Dieses Kit wurde von Sigma Aldrich Merck, USA bezogen. Es wurde verwendet, um fluorometrisch die Zellzahl zu bestimmen. Verwendet wurde dafür der Farbstoff Resazurin, der zur Bestimmung der metabolischen Aktivität der Zellen dient. Lebende Zellen reduzieren die oxidierte Form (blau) und

erhöhen damit gleichzeitig die Menge an fluoreszierendem Intermediat Resofurin (rot), der damit einen Indikator für die Zytotoxizität der untersuchten Substanz darstellt. Die Menge an Farbstoffumwandlung wird fluorometrisch gemessen.

- Calcium-Assay Kit

Das Screen Quest Fluo-8 No Wash Calcium-Assay Kit (Lot# 163103S) wurde von AAT Bioquest, Inc., USA bezogen. Es enthält Fluo-8 NW, 10X Pluronic F127 Plus, HHBS (Hanks´ buffer with 20 mM Hepes) zur Herstellung einer Dye-Loading Solution. Das Prinzip des Assays ist unter 2.11.1 beschrieben.

- PAXgene RNA Kit/ PaxGene blood RNA kit

Es wurde von Qiagen, Hilden, Deutschland bezogen und zur RNA-Isolierung aus den Proben genutzt.

## 2.6 Antikörper

Die folgenden Antikörper wurden für die Western Blots genutzt. Die Quelle und benutzten Verdünnungen sind in der folgenden Tabelle dargestellt:

**Tab. 5:** Antikörper zur Durchführung der Western Blots

| Antikörper                          | Spezifizierung                  | Host   | Anwendung    | Quelle                   | Verdünnung |
|-------------------------------------|---------------------------------|--------|--------------|--------------------------|------------|
| Anti-5-Hydroxytryptamin Rezeptor 1A | Lot# ASR021AN0250<br>Polyclonal | Rabbit | Western Blot | Alomone Lab              | 1:1000     |
| Anti-5-Hydroxytryptamin Rezeptor 1B | Lot# ASR022AN0150<br>Polyclonal | Rabbit | Western Blot | Alomone Lab              | 1:1000     |
| Anti-5-Hydroxytryptamin Rezeptor 1D | Lot# ASR023AN0150<br>Polyclonal | Rabbit | Western Blot | Alomone Lab              | 1:1000     |
| Anti-5-Hydroxytryptamin Rezeptor 2A | Lot# ASR033AN0150<br>Polyclonal | Rabbit | Western Blot | Alomone Lab              | 1:1000     |
| Anti-5-Hydroxytryptamin Rezeptor 2B | Lot# ASR035AN0150<br>Polyclonal | Rabbit | Western Blot | Alomone Lab              | 1:1000     |
| Anti-5-Hydroxytryptamin Rezeptor 4  | Lot# ASR036AN0150<br>Polyclonal | Rabbit | Western Blot | Alomone Lab              | 1:1000     |
| Anti-5-Hydroxytryptamin Rezeptor 5B | Lot# ASR040AN0150<br>Polyclonal | Rabbit | Western Blot | Alomone Lab              | 1:1000     |
| Anti-ASIC1                          | Lot# ASC014AN0650<br>Polyclonal | Rabbit | Western Blot | Alomone Lab              | 1:1000     |
| Anti-ASIC2                          | Lot# AN-01<br>Polyclonal        | Rabbit | Western Blot | Alomone Lab              | 1:1000     |
| Anti-ASIC3                          | Lot# ASC018AN0750<br>Polyclonal | Rabbit | Western Blot | Alomone Lab              | 1:1000     |
| Anti-ASIC4                          | Lot# AN-01<br>Polyclonal        | Rabbit | Western Blot | Alomone Lab              | 1:1000     |
| Serotonin Transporter Ab (SERT)     | Polyclonal                      | Rabbit | Western Blot | Novus Biologicals        | 1:1000     |
| Goat-anti-rabbit IgG-HRP            | Lot# F2215<br>HRP conjugated    | Goat   | Western Blot | Santa Cruz Biotechnology | 1:2000     |

Abkürzungen: SERT: Serotonintransporter, Ab: Antikörper, HRP: *Horseradish peroxidase*; Übersetzungen: Host: Wirt, Goat: Ziege, Rabbit: Kaninchen, conjugated: konjugiert, Polyclonal: Polyklonal

## Antikörper für das Kontrollgewebe

Anti-5-Hydroxytryptamin-Rezeptor 1A, Anti-5-Hydroxytryptamin-Rezeptor 1B, Anti-5-Hydroxytryptamin-Rezeptor 1D, Anti-5-Hydroxytryptamin-Rezeptor 2A, Anti-5-Hydroxytryptamin-Rezeptor 2B, Anti-5-Hydroxytryptamin-Rezeptor 4, Anti-5-Hydroxytryptamin-Rezeptor 5B, Anti-ASIC1, Anti-ASIC3, Anti-ASIC4 Antikörper (Quelle: Kaninchen; Reaktivität: Ratte) und Anti-Pan ASICs (1:500) stammten von Alomone Labs (Jerusalem, Israel). Anti-Serotonin Aks (goat anti-rat) stammten von Abcam (Cambridge, Vereinigtes Königreich), Anti-SERT Aks stammten von Bio-Techne (1:500) (Minneapolis, USA). Die sekundären Aks Anti-Ziege und Anti-Kaninchen IgG Aks (1:1000) stammten von der Firma Santa Cruz Biotechnology (Dallas, USA).

**Tab. 6:** Antikörper für die Anfärbung der Paraffinschnitte

| Antikörper     | Spezifizierung  | Host                     | Anwendung  | Quelle      | Verdünnung            |
|----------------|---|--------------------------|--|-------------|-----------------------|
| Serotonin Ab   | IgG1 kappa, <i>Clone:</i> 5HT-H209, <i>Monoclonal</i> | Maus, <i>Mouse</i>       | <i>IHC-Paraffin, Mouse, human, rat</i>                               | Genetex     | 1:100                 |
| Serotonin Ab   | M0758, <i>Clone:</i> 5HT-H209, <i>Monoclonal</i>      | Maus, <i>Mouse</i>       | <i>IHC-Paraffin, Human, Rat</i>                                      | Dako        | 1:100                 |
| ASIC4 Ab       | Aa121-170, <i>Polyclonal</i>                          | Rabbit                   | <i>IHC, IHC-Paraffin, Western Blot, Human, Mouse, Rat and others</i> | LSBio       | 1:100                 |
| ASIC4 Ab       | Bs-12129R, <i>Polyclonal</i>                          | Kaninchen, <i>Rabbit</i> | <i>Western Blot, IHC-P, IF-Paraffin, Human, Mouse, Rat</i>           | Biossusa    | 1:50                  |
| ASIC4 Ab       | <i>Polyclonal</i>                                     | Kaninchen, <i>Rabbit</i> | <i>Western Blot, IHC, IF, Rat, Human, Mouse</i>                      | Alomone Lab | 1:50                  |
| ASIC4 (D3), Ab | Scc-377063, <i>Monoclonal</i>                         | Maus, <i>Mouse</i>       | <i>Western Blot, IHC-Paraffin, Mouse, Human, Rat</i>                 | Santa Cruz  | 1:50/100/250/500/1000 |

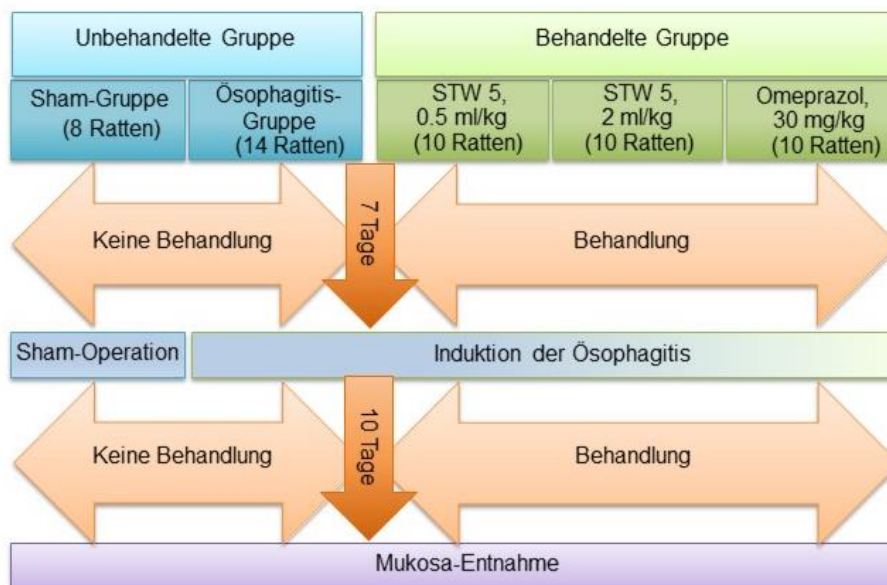
Abkürzungen: IHC: Immunhistochemie, IF: Immunfluoreszenz, P: Paraffin, AK/Ab: Antikörper, Kursiv markiert: positiv reagierende Aks; Übersetzungen: Host: Wirt, Mouse: Maus, Rabbit: Kaninchen, Rat: Ratte, Human: Mensch, and others: und andere, Clone: Klon, Monoclonal: Monoklonal, Polyclonal: Polyklonal

## 2.7 Untersuchung der Expression von *Acid-sensing ion channels* (ASICs), 5-Hydroxytryptamin-Rezeptor-Subtypen (5-HTR) und Serotonintransporter (SERT) in Rattenösophagi

### 2.7.1 Versuchsaufbau

Die Tierversuche wurden durchgeführt nach der *European Communities Council Directive* von 1986 (86/609/EEC) und genehmigt durch die Ethik-Kommission für Tierexperimente (NRW, Deutschland) (Abdel-Aziz et al. 2015a).

Erwachsene, männliche Wistar Ratten wurden blind in fünf Gruppen (siehe Abbildung 8) unterteilt: Sham Operation (acht Tiere), Ösophagitis Gruppe (14 Tiere), STW 5 und Omeprazol Behandlung (je zehn Tiere). Zwei Gruppen erhielten anstatt des Medikamentes Wasser (Sham und Ösophagitis-Gruppe), zwei Gruppen erhielten STW 5 (0,5 oder 2 ml/kg) und eine Gruppe erhielt Omeprazol (30 mg/kg) einmal täglich per oraler Gabe. Gestartet wurde damit sieben Tage vor der Induktion der Ösophagitis. Eine der Gruppen, welche nur Wasser erhielt, wurde sham-operiert. In allen anderen Gruppen wurde eine Ösophagitis induziert (siehe Abbildung 9). Die Tiere wurden für weitere zehn Tage behandelt und dann unter Anästhesie getötet (Abdel-Aziz et al. 2015a).



**Abb. 8:** Versuchsaufbau des subchronischen Rattenmodells

Gezeigt wird die Aufteilung der Ratten in zwei unbehandelte Gruppen (Sham (8 Ratten) und Ösophagitis-Gruppe (14 Ratten)) und drei Behandlungsgruppen (STW 5 (0,5 ml/kg)

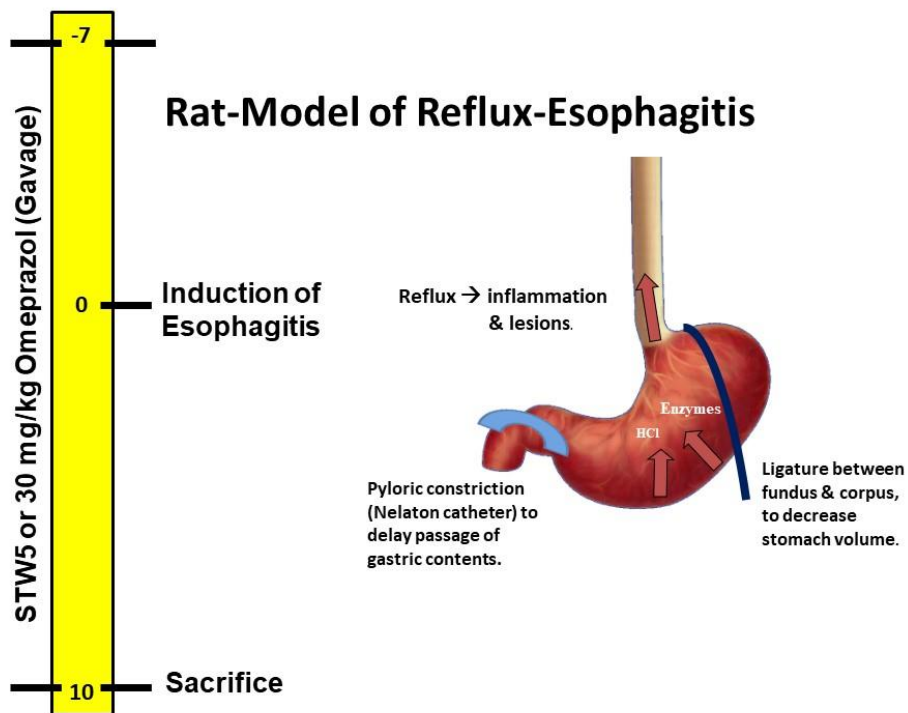
(10 Ratten), STW 5 (2 ml/kg) (10 Ratten), Omeprazol 30 mg/kg (10 Ratten)). Außerdem wird die zeitliche Achse des Versuchs visualisiert: nach 7 Tagen Sham-Operation oder Induktion der Ösophagitis und nach 10 Tagen Mukosaentnahme. Die Abbildung wurde freundlicherweise zur Verfügung gestellt von Anastasiia Shcherbakova.

Die Experimente wurden in vier erfolgreichen Versuchsrunden durchgeführt, wobei jede Runde Tiere aus allen Gruppen enthielt (Sham-Gruppe (2 Ratten), Ösophagitis-Gruppe (3-4 Ratten), STW 5 oder Omeprazol (2-3 Ratten)). Die Refluxösophagitis wurde, bis auf wenige Modifikationen, wie von Omura et al. (1999) beschrieben induziert. Die durch verschiedene Ligationen induzierte Ösophagitis sowie der Zeitablauf der Behandlung sind schematisch in Abbildung 9 dargestellt. Eine separate Gruppe von Tieren wurde nur Sham operiert, wobei sie anästhesiert, ihr Abdomen geöffnet und dann wieder zugenäht wurde, ohne weitere chirurgische Manipulationen. Die Tiere wurden zehn Tage nach der Ösophagitis-Induktion oder Sham-Operation getötet (Abdel-Aziz et al., 2015a).

#### 2.7.2 Probengewinnung

Während der Anästhesie wurde Blut für die RNA-Analyse aus der posterioren V. cava entnommen. Die unteren 3 cm des Ösophagus wurden entnommen, longitudinal geöffnet, makroskopisch betrachtet und gemäß dem Grad der Schädigung beurteilt (0= keine Schädigung bis 5= Perforation). Die Ösophagus-Proben wurden gewogen und in drei Teile geschnitten: ein Teil wurde in 10 % Formalin fixiert und in Paraffin gebettet, ein Teil wurde bei -80 °C in einem RNAlater<sup>®</sup>Tube für die RNA-Array Analyse gelagert und ein Teil wurde verwendet um *Whole Cell Lysates* für die Western Blots vorzubereiten und dafür bei -80 °C gelagert (Abdel-Aziz et al., 2015a).





**Abb. 9:** Darstellung des subchronischen Rattenmodells zur Induktion der Ösophagitis

Die Durchführung der Ösophagitisinduktion erfolgte wie bei Omura et al., (1999) beschrieben. Gezeigt werden die zeitliche Achse des Modells und die grobe graphische Darstellung des Vorgangs der Ösophagitisinduktion. Zum einen wird bei der Ösophagitisinduktion eine Pyloruskonstriktion durch einen Katheter bewirkt und zum anderen eine Magengastroligatur gezogen, um das Magenvolumen zu verkleinern. Dies führt zu Reflux und infolgedessen zu Entzündung und Läsionen in der Speiseröhre. Übersetzung: *Rat-Model of Reflux-Esophagitis*: Ratten Modell der Refluxösophagitis; *Induction of Esophagitis*: Induktion der Ösophagitis; *Sacrifice*: Opferung; *Gavage*: Sondennahrung; *lesions*: Läsionen; *Pyloric constriction (Nelaton catheter) to delay passage of gastric contents*: Pylorusverengung (Nelaton Katheter), um die Passage von Mageninhalt zu verzögern; *Ligature between fundus & corpus, to decrease stomach volume*: Ligatur zwischen Fundus und Corpus, um das Magenvolumen zu verringern. Die Abbildung wurde freundlicherweise zur Verfügung gestellt von Dr. Heba Abdel-Aziz.

Durchgeführt wurden die Tierversuche sowie die Probengewinnung am Institut für Pharmazeutische Chemie, Westfälische Wilhelms-Universität Münster von Dr. Heba Abdel-Aziz.

### 2.7.3 RNA-Isolierung

Die Daten der Transkriptomanalysen stammen aus dem Experiment von Abdel-Aziz et al., 2015a. Die RNA wurde von den Gewebe- und Blutproben mit dem PaxGene tissue

RNA kit und dem PaxGene blood RNA kit (Qiagen, Hilden, Deutschland) isoliert. Die Genexpression wurde mittels des *Agilent whole genome microarray* (Ratte) untersucht, wie von Ulrich-Merzenich et al. (2012) beschrieben. Diese Analysedaten einschließlich der Daten zur Genexpression der ASICs, den 5-HTR Untertypen und SERT wurden von Dr. Gudrun Ulrich-Merzenich zur Verfügung gestellt.

#### 2.7.4 Gelelektrophorese und Western Blotting

Die Proteine der *Whole Cell Lysates* wurden mittels Polyacrylamid-Gelelektrophorese entsprechend ihrer Größe und Ladung aufgetrennt. Hierzu wurden die Proben in RIPA-Puffer gelöst und die Lysate, wie von Gouni-Berthold et al. (2001) beschrieben, aufbereitet. Gleiche Teile von Protein (10-40µg) wurden 1:4 mit 5x Laemli Puffer gemischt, für fünf Minuten gekocht und nach Größe aufgetrennt durch eine 10% SDS-Page. Nach der Gelelektrophorese wurden die Proteine von dem Gel auf eine Nitrocellulose-Membran (8,5 cm x 13,5 cm) (Biorad, Deutschland) mittels einer Trans-Blot Turbo Maschine (BioRad, Deutschland) übertragen, wie in Ulrich-Merzenich et al. (2007) beschrieben. Die Gelelektrophoresen und Blotverfahren wurden größtenteils von Dr. Gudrun Ulrich-Merzenich und Anastasiia Shcherbakova durchgeführt. Die Proteinbanden der ASICs, 5-HTR Untertypen und SERT wurden auf den Nitrocellulosemembranen mit Hilfe von spezifischen Antikörpern nachgewiesen.

Hierzu wurden die Nitrocellulosemembranen in einer Pipettierschale mit Blockierlösung bedeckt und mindestens eine Stunde bei Raumtemperatur inkubiert. Nach einer Stunde wurde die Blockierlösung entfernt und der Antikörper-Dilution-Puffer mit dem 1. Antikörper hinzugegeben. Dieser wurde bei 4 °C über Nacht inkubiert. Nach Entfernen des Antikörper-Dilution-Puffers mit dem 1. Antikörper wurde die Membran sechsmal fünf Minuten mit TBST gewaschen. Danach wurde der 2. Antikörper-Dilution-Puffer hinzugefügt und eine Stunde bei Raumtemperatur inkubiert. Nach Entfernen des 2. Antikörper-Dilution-Puffers wurde die Membran erneut sechsmal für fünf Minuten mit TBST gewaschen.

Zur Auswertung wurden je 1 ml Detection Reagent 1 und 1 ml Detection Reagent 2 in einer Pipettierschale gemischt und die Membran eine Minute bei lichtarmer Bedeckung inkubiert. Danach erfolgte die Immunodetektion wie unter 2.13.2 beschrieben. Um weitere Proteinbanden auf den Nitrocellulosemembranen nachzuweisen, wurden die Antikörper

entfernt. Hierzu wurden die Antikörper mit 10 ml Stripping Puffer für fünf Minuten bei 37 °C entfernt. Danach wurde die Membran zweimal mit TBS gewaschen.

## 2.8 Zellkulturmethoden

### 2.8.1 Allgemeine Zellkulturmethoden

Die Zellen wurden in 75 cm<sup>2</sup> behandelten Zellkulturflaschen mit Entlüftungskappe aus Plastik (BD Falcon, Deutschland) kultiviert. Die Flaschen wurden in einem Inkubator (37 °C, 95 % relative Luftfeuchtigkeit, 5 % CO<sub>2</sub>; STERI-CULT 200 Model 3035, S/N: 38006-1446, Incubator Forma Scientific, Inc., USA) inkubiert und täglich mit einem Mikroskop (Olympus CK2, Japan) begutachtet. Das Zellkulturmedium wurde zweimal wöchentlich gewechselt. Die Antibiotika Penicillin und Streptomycin wurden eingesetzt, um die Zellen vor bakterieller Kontamination zu schützen. Die Arbeit mit den Zellen erfolgte unter sterilen Bedingungen an der Werkbank (Gelaire TC 60, Seriennummer 51078, Gelaire Flow Laboratories Netheler-Hinz GmbH, Deutschland).

#### Fibroblasten

Die Fibroblasten wurden in nicht beschichteten Zellkulturflaschen mit *Dulbecco's modified Eagle's medium* (DMEM) + 10 % FBS + Antibiotika (Penicillin/Streptomycin je 5000 IU/ml) kultiviert. Verwendet wurden die Zellpassagen 21-26.

#### HISMC

Die humanen intestinalen Muskelzellen wurden in Zellkulturflaschen kultiviert, welche zuvor mit einer Poly-L-Lysin-Lösung beschichtet wurden. Die HISMC wurden in *Dulbecco's modified Eagle's medium* (DMEM) + 10 %/12 % FBS + Antibiotika (Penicillin/Streptomycin je 5000 U/ml) kultiviert. Die Zellpassagen 2-15 wurden verwendet.

#### Beschichtung der Zellkulturflaschen und Versuchsplatten

Die HISMC benötigten eine Oberflächenmodifikation zur Adhäsion. Diese wurde mit einer Poly-L-Lysin-Lösung, sowohl bei den Zellkulturflaschen als auch bei den Versuchsplatten durchgeführt. Die Poly-L-Lysin-Lösung wurde wie folgt hergestellt: 1,5 ml Poly-L-Lysine-lösung wurde mit 8,5 ml sterilem Wasser versetzt. Anschließend wurde die Lösung steril filtriert.

Die Zellkulturflaschen wurden mit jeweils 3 ml Poly-L-Lysine-Lösung und die Well-Plates mit je 50 µl Poly-L-Lysin-Lösung per Well beschichtet und über Nacht in den Inkubator gestellt.

### 2.8.2 Auftauen der Zellen

Das zuvor in flüssigem Stickstoff eingefrorene Zellröhrchen wurde im Wasserbad auf einer Heizplatte (40 °C) schnell aufgetaut. Die 1 ml Zellflüssigkeit (kalt) aus dem Zellröhrchen wurde in ein 15 ml Tube überführt, DMEM ohne FBS wurde tropfenweise hinzugefügt und gemischt. Dann wurde die Flüssigkeit zehn Minuten zentrifugiert, um das im Freezingmedium enthaltene DMSO komplett zu entfernen. Der Überstand wurde entfernt und das Pellet in 1 ml DMEM + 10 % FBS aufgelöst. Dies wurde dann in eine zuvor beschichtete Zellkulturflasche zusammen mit 9 ml Nährmedium gefüllt und im Inkubator inkubiert.

### 2.8.3 Passagieren der Zellen

Zellen von beinahe vollständig (80-90 %) bewachsenen Zellkulturflaschen wurden trypsinisiert und auf neue Zellkulturflaschen aufgeteilt. Zuerst wurde der Überstand aus den Zellkulturflaschen abpipettiert und diese dann zweimal mit jeweils 5 ml DPBS gewaschen. Danach wurden 5 ml Trypsin hinzugefügt, um die Zellen 3-5 Minuten bei 37 °C abzulösen. Daraufhin wurde die Reaktion mit 1 ml DMEM + 10 % FBS gestoppt und in ein 15 ml Tube gefüllt. Die Mischung wurde sechs Minuten zentrifugiert (1200 rpm) und der Überstand abpipettiert. Das Zell-Pellet wurde in 3 ml DMEM + 10 % FBS gelöst. Davon wurden je 1,5 ml mit 8,5 ml DMEM + 10 % FBS gemischt und die neuen Zellkulturflaschen mit je 5 ml Zell-Lösung befüllt.

### 2.8.4 Einfrieren der Zellen und Lagerung

Die Zellen wurden, wie bereits beschrieben, trypsinisiert, das Zell-Pellet in 1 ml Einfriermedium aufgelöst und mit einer sterilen Pipette in ein Cryotube (Nunc, Deutschland) überführt. Die Zellen zuerst drei Stunden bei -20 °C und dann für ca. 24h bei -80 °C gelagert. Danach wurden sie in flüssigen Stickstoff überführt und gelagert.

### 2.8.5 Zellzählung

Für die Zellzählung wurde eine Neubauerzählkammer verwendet. Auf einen Objektträger wurden 10 µl der Zelllösung gegeben, welche aufgrund der Kapillarkraft die Zählkammer

mit einem definierten Volumen von 0,1 µl pro Eckquadrat füllt. Unter einem Lichtmikroskop (Olympus CK2-TR, Seriennummer T2-5M02278, Olympus Optical Co., Ltd., Japan) wurde bei 100facher absoluter Vergrößerung die Zellzahl in vier Eckquadraten gezählt. Die durchschnittliche Zellzahl pro Eckquadrat wurde mit  $10^4$  multipliziert, um die Zellzahl pro ml zu berechnen. Hierdurch konnte berechnet werden, welche Verdünnung erfolgen muss, um eine bestimmte Zellzahl pro Well zu erhalten.

## 2.9 Zell-Viabilitäts-Assay

### 2.9.1 Prinzip

Die Viabilität der HISMC unter Einfluss der Testsubstanzen wurde im Vergleich zu unbehandelten Kontrollproben mit dem *In Vitro Toxicology Assay Kit* (TOX-8) untersucht. Hier wird die Zellzahl durch Nachweis der metabolischen Aktivität der Zellen gemessen. Das Prinzip der Messung wurde bereits unter 2.5 beschreiben.

Hierfür wurden HISMC auf mit Poly-L-Lysin-Lösung beschichteten 384er Platten ausgesät. Es wurden verschiedene Serumkonzentrationen und Volumina verwendet: 10.000 Zellen/100 µl DMEM mit 10 % FBS; 10.000 Zellen/25 µl DMEM mit 10 % FBS; 10.000 Zellen/100 µl DMEM mit 1 % FBS. Nach 24 Stunden Zelladhäsionszeit wurden die Zellen zweimal mit DMEM gewaschen und über Nacht mit DMEM ohne FBS belassen, um die Zellzyklen zu synchronisieren.

### 2.9.2 Stimulierungsprotokoll

Die Zellen wurden mit STW 5, den Einzelnextrakten und Omeprazol in unterschiedlichen Konzentrationen (1 µl/ 2 µl/ 4 µl/ 8 µl per 100 µl mit einer Konzentration 10 µg/µl) stimuliert, jeweils mit und ohne Capsaicin (0,5 µl pro Well).

Die Platten wurden wie folgt stimuliert: Bei den Platten mit 100 µl/well wurde mit je 1 µl/ 100 µl (0,1 µg/µl) oder 2 µl/ 100 µl (0,2 µg/µl) Extrakt stimuliert. Die Platte mit 25 µl/well wurde mit 1 µl/ 25 µl (0,4 µg/µl) oder 2 µl/ 25 µl (0,8 µg/µl) Extrakt stimuliert. Es wurden jeweils acht Wells ohne und acht Wells mit 0,5 µl Capsaicin zusätzlich stimuliert sowie zwei Kontrollreihen angesetzt, welche ohne Stimulierung belassen wurden. Danach wurden die stimulierten Zellen 21 Stunden inkubiert.

Schließlich wurde der Resazurin-Assay durchgeführt, indem in jedes 100 µl-well 10 µl Resazurin und in jedes 25 µl-well 2,5 µl Resazurin (jeweils 10 % des Gesamtvolumens) hinzugefügt wurde. Nach zwei und vier Stunden wurde die Resazurin-Umsetzung gemessen.

## 2.10 Calcium-Assay

### 2.10.1 Prinzip

Das *Screen Quest Fluo-8 NW-Calcium-Assay* ist ein fluoreszenzbasiertes Nachweisverfahren für die intrazelluläre Calciummobilisierung. Fluo-8 NW kann Zellmembranen durchdringen, die einen Calcium-G-Protein gekoppelte Rezeptoren (GPCR) besitzen. In der Zelle wird Fluo-8 NW zu einem negativ geladenen fluoreszierenden Farbstoff gespalten, der in den Zellen verbleibt und dessen Fluoreszenz bei Bindung an Calcium verstärkt wird. Fluo 8-NW hat eine lange Wellenlänge, hohe Sensitivität und 100-250mal höhere Fluoreszenz, wenn es Komplexe mit Calcium formt.

### 2.10.2 Vorexperimente

Die zu verwendende optimale Zellzahl wurde für Fibroblasten (unbeschichtete 96-Wellplatten) und HSMC (beschichtete 96-Wellplatten) getestet. Dabei wurden Versuche mit 10.000 Zellen/well, 20.000 Zellen/well, 30.000 Zellen/well, 40.000 Zellen/well bis zu 50.000 Zellen/well durchgeführt.

Außerdem wurden verschiedene Prozentzahlen an FBS (10 % und 12 %) im Nährmedium getestet, um herauszufinden unter welchen Bedingungen die HSMC am besten wachsen.

Weiterhin wurden folgende Endkonzentrationen der Stimulierungslösung Capsaicin (80 µM) getestet: 2 µl/well, 3 µl/well, 4 µl/well.

### 2.10.3 Vorbereitung der Proben

Nachdem 20.000 HSMCs/well in eine 96-Wellplatte ausgesät wurden, wurden diese 24 Stunden mit Nährmedium (DMEM, 10 % FBS) im Inkubator belassen. Dann wurde der Überstand entfernt und die Zellen einmal mit 200 µl DMEM gewaschen. Nun wurden die Zellen für weitere 24 Stunden in „Hungermedium“ (DMEM, 1 % FBS) belassen. Das Medium wurde entfernt und die Zellen stimuliert.

#### 2.10.4 Stimulierungsprotokoll

Der Überstand in den Wells wurde abpipettiert und je nach Well 180 µl, 190 µl, 194 µl, 198 µl oder 200 µl „Hungermedium“ (DMEM (ohne Phenolrot), 1 % FBS) hinzugefügt. Die Einzelnextrakte von STW 5 wurden in äquimolaren Mengen zum Gesamtextrakt angesetzt und 1:10 (100 µl Extrakt + 900 µl DMEM ohne FBS und Phenolrot) verdünnt. Diese Einzelnextrakt-Lösungen sowie Omeprazol als Referenzmedikament wurden nun in der entsprechenden Verdünnung auf die Zellen gegeben. Die Endkonzentration jeder Lösung pro Well variierte dabei (1 µl/ml, 3 µl/ml, 5 µl/ml, 10 µl/ml). Alle Stimulierungen wurden jeweils in Duplikaten/Triplikaten angesetzt, jeweils mit und ohne Capsaicinstimulierung. Die Kontrollproben wurden als Quadruplex angesetzt. Nach 20 Stunden Stimulationszeit im Inkubator wurden 100 µl Zellüberstand abgenommen und die Calcium Bestimmung nach Protokoll durchgeführt.

#### 2.10.5 Kombinationsstimulierung

Es wurden Versuchsreihen mit zwei 3er-Kombinationen von Einzelnextrakten von STW 5 gemacht, um herauszufinden, ob die Einzelnextrakte synergistisch arbeiten. Kombination 1 bestand dabei aus *Menthae piperitae* (L.), *Matricaria recutita* (L.) und *Melissa officinalis* (L.) und Kombination 2 aus *Glycyrrhiza glabra* (L.), *Angelica archangelica* (L.) und *Sylibum marianum* (L.) gaertn. Hierfür wurden die Kombinationen dosisäquivalent zu STW 5 (siehe Tabelle 3) hergestellt und in Konzentrationen von 1-10 µl/ml verwendet. Alle Stimulierungen wurden jeweils in Duplikaten/Triplikaten angesetzt, jeweils mit und ohne Capsaicinstimulierung. Die Kontrollproben wurden als Quadruplex angesetzt.

#### 2.10.6 Ablauf des Assays

Das Assay wurde nach Herstellerangaben durchgeführt. Nach Hinzugabe der Dye Loading Solution wurde die Platte 30 Minuten bei 37 °C und weitere 30 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert, bevor die Calciumfreisetzung bei einer Wellenlänge von 560 nm mit dem FLUOstar *multi-plate reader* (BMG Labtech, Germany) gemessen wurde.

#### 2.11 Synergie Quantifizierung

Zur Quantifizierung der synergistischen, additiven und antagonistischen Wirkungen der verschiedenen Pflanzenextraktkombinationen wurde die Chou-Talalay-Kombinationsindexmethode (CI) angewendet (Chou und Talalay, 1984).

Die Kombinationen der neun verschiedenen Pflanzenextrakte wurden in mindestens zwei unabhängigen Experimenten mit jeweils zwei Replikaten getestet. Der CI-Wert wurde mit Hilfe der CompuSyn Software berechnet. Die Software für die Berechnung des CI basiert auf folgenden Gleichungen (Chou, 2006):

$$CI = \frac{(D)_1}{(D_x)_1} + \frac{(D)_2}{(D_x)_2} = \frac{(D)_1}{(D_m)_1 [f_a / (1 - f_a)]^{1/m_1}} + \frac{(D)_2}{(D_m)_2 [f_a / (1 - f_a)]^{1/m_2}}$$

$(D_x)_1$  ist die Dosis des Medikaments (Extrakts)  $D_1$  allein, welches ein System zu  $x$  % inhibiert (hier  $Ca^{2+}$  Freisetzung bei stimulierten HISMC).  $(D_x)_2$  ist die Dosis des Medikaments (Extrakts)  $D_2$  allein, welches ein System zu  $x$  % inhibiert.  $(D)_1$  und  $(D)_2$  sind die Dosen der Medikamente  $D_1$  und  $D_2$  in der Kombination welche ein System zu  $x$  % inhibiert.  $D_m$  ist die mediane Effektdosis,  $f_a$  ist die betroffene Fraktion (*fraction affected*) bei  $x$  % Hemmung,  $m$  ist die Steigung der Median-Effekt-Grade (Chou, 2006). Eine Neuordnung der Median-Effekt-Gleichung erlaubt die Berechnung der Dosis:

$$D_x = D_m [f_a / (1 - f_a)]^{1/m}$$

Der CI für dreifach Kombinationen kann berechnet werden aus der ursprünglichen Gleichung für  $n$ -Medikamentenkombinationen bei  $x$  % Hemmung (Ulrich-Merzenich et al., 2019) und wird durch folgende Gleichung beschrieben:

$${}^n(CI)_x = \sum_{j=1}^n \frac{(D)_j}{(D_x)_j}$$

Die Synergie Quantifizierung wurde freundlicherweise von Anastasiia Shcherbakova durchgeführt und zur Verfügung gestellt.

## 2.12 Methoden zur Gewinnung und Untersuchung humaner Ösophagusproben

### 2.12.1 Probengewinnung

Die Ösophagus-Biopsien wurden im Rahmen endoskopischer Untersuchungen in der Abteilung für gastrointestinale Endoskopie der Universität Kairo, Ägypten von Prof. Abdel Meguid Kassem gewonnen. Zunächst wurde beurteilt, ob es sich endoskopisch um unverändertes Ösophagusgewebe handelt oder ob eine Refluxösophagitis besteht. Pati-



ent\*innen mit Barrett Ösophagus, ösophagealen Polypen oder Moniliasis (Candidamykose) wurden nicht eingeschlossen. Es wurde das Einverständnis von allen Patient\*innen eingeholt. Die Prozeduren wurden von dem örtlichen ethischen Komitee genehmigt und nach den ethischen Grundsätzen der Deklaration von Helsinki (2000) durchgeführt (World Medical Association, 2013).

Eine ausführliche medizinische Anamnese wurde bei allen Patient\*innen erhoben und besonderes Augenmerk auf die Indikationen für eine ÖGD und Symptome des oberen und unteres Gastrointestinaltraktes gelegt. Bei allen Patient\*innen wurden mindestens zwei endoskopische Biopsien aus dem distalen Ösophagus, oberhalb der Z-Linie, gewonnen. Die ÖGD wurde mit einem Video Chip OLYMPUS CV-240 (Tokyo, Japan) oder einem PENTAX EPM-3500 (Tokyo, Japan) Endoskop unter Sedierung (Midazolam i.v.) gemacht. Die Biopsate wurden mit einer Biopsie-Pinzette entnommen und sofort in Formalin (10 % Lösung) gelegt. Innerhalb von 24 Stunden wurden die Proben in Paraffin eingebettet (Abdel-Aziz et al., 2015a). Die 5 µm dicken Paraffinschnitte wurden mit Hämatoxylin-Eosin gefärbt und ohne Kenntnis der Probenidentität zufällig durch einen Histopathologen untersucht. Jede Probe erhielt einen Score mit folgender Skalierung: 0 = normal, 1 = leichte Entzündung (Ödem, Infiltrationen), 2 = moderate Entzündung (Epithelschädigungen) und 3 = schwere Entzündung (schwere Ödeme, ausgedehnte Ulzerationen, Abszesse). Dies geschah durch das Institut für Anatomie von Prof. Winfried Neuhuber, Universität Erlangen-Nürnberg.

#### 2.12.2 Endoskopische Beurteilung

Auf Basis der Endoskopie wurden die Patient\*innen durch Prof. Kassem nach der Los Angeles Klassifikation in folgende Gruppen eingeteilt: endoskopisch normaler Ösophagus, Grad A Ösophagitis, Grad B Ösophagitis oder Grad C Ösophagitis (Abdel-Aziz et al., 2015b).

#### 2.12.3 Immunhistochemie

Aufgrund des begrenzten Probenmaterials wurden für die Immunhistologie die Antikörper vorab mit Kontrollgewebe ausgetestet. Bei dem „Kontrollgewebe“ handelt es sich um Rattendarm- und Pankreasgewebe aus der ursprünglichen Versuchsreihe (Abdel-Aziz et al. 2015b), die für derartige Zwecke tiefgefroren (-80 °C) gelagert waren. Weiterhin wurde

humanes Gewebe eines endokrinen Tumors, insbesondere für den Serotoninnachweis, als Positivkontrolle eingesetzt.

Die Positiv-Kontrollgewebeproben wurden in Paraffin eingebettet und mittels Standardmethoden mit Hämatoxylin-Eosin (H.E.) gefärbt. Eine H.E.-Färbung wurde auch für alle experimentellen Ösophagusproben nochmals als Übersichtsfärbung durchgeführt, um den Zustand des Gewebes beurteilen zu können. Dies geschah auch durch das Institut für Anatomie von Prof. Winfried Neuhuber, Universität Erlangen-Nürnberg.

Die in Paraffin eingebetteten humanen Proben wurden von dem Pathologischen Institut der Universität Bonn immunhistochemisch mit ASIC4 und Serotonin Antikörpern angefärbt. Besonderer Dank gilt hier Frau Esch für die Durchführung der histologischen Schnitte und der Anfärbungen und Herrn Dr. Thore Thiesler für die Unterstützung bei der Beurteilung der Proben.

Die angefärbten Paraffinschnitte wurden gemeinsam mit Herrn Dr. Thiesler vom Pathologischen Institut begutachtet und in zwei Gruppen eingeteilt: Präparate mit ASIC4 oder Serotonin positiven Zellen und Präparate ohne ASIC4 oder Serotonin positiven Zellen. Zum Ausschluss von Färbungsartefakten und einer besseren Beurteilung der Färbung des Gewebes ohne AK, wurde immer auch eine H.E.-Färbung durchgeführt. Es wurde keine Quantifizierung der angefärbten Zellen und kein Vergleich der Intensität der Färbung durchgeführt. Anhand der Probennummer konnten die immunhistochemischen Daten mit der Klinik der Patient\*innen in Zusammenhang gebracht werden.

Es wurden verschiedene Oberflächenmarker getestet, um herauszufinden, welche Zellen im humanen Ösophagus ASIC4 und Serotonin exprimieren bzw. freisetzen und welche Zellen sich im Rattencolon anfärben ließen. Durch die Pathologie der Universität Bonn wurden folgende Oberflächenmarker getestet: S100, CD38+, CD3+, CD20+, CD68+, MUM1.

## 2.13 Statistische Analyse

### 2.13.1 Genexpressionsdaten

Die Agilent Feature Extraction Software (FES) wurde zum Auslesen und Verarbeiten der Microarray-Bilddateien verwendet. Für die Bestimmung der differentiellen Genexpression

wurden die von FES abgeleiteten Ausgabedateien mit dem Rosetta Resolver® System zur Analyse von Genexpressionsdaten (Rosetta Biosoftware) analysiert. Die hintergrundkorrigierten Intensitätsdaten wurden für die Berechnung des Verhältnisses Versuchsprobe/Kontrolle verwendet. Die Verhältnisse wurden anhand einer gemeinsamen "künstlichen Referenz" (4 kombinierte Kontrollproben) berechnet. Diese gemeinsame Referenz wurde als Basiswert für alle Proben verwendet. Eine globale Korrelationsanalyse aller Verhältnisdaten wurde durchgeführt. Die Datensätze wurden gefiltert, um Gene zu entfernen, die in keinem Vergleich differenziell reguliert waren.

Die berechneten Verhältnisse (Probe/Kontrolle) wurden mit Ingenuity Systems Inc. (Qiagen, Hilden, Deutschland) analysiert. Die Daten wurden als hoch- oder herunterreguliert betrachtet, wenn das Expressionsverhältnis Probe/Referenzkontrolle  $\geq 2$  mit einem p-Wert  $< 0,01$  war. Die Genbank wurde als Gen-Identifikator und die Gene der Ingenuity®-Wissensbasis als Gen-Referenzsatz verwendet. Für alle Analysen wurden die Filter für alle Analysen auf Säugetiere eingestellt. Mit dieser allgemeinen Einstellung wurden in jeder Gruppe gemeinsam oder differenziell regulierte Gene ermittelt und die so genannten kanonischen Pfade (gut untersuchte Signal- und Stoffwechselwege innerhalb der Ingenuity Pathways Analysis (IPA)) identifiziert.

Die Benjamini-Hochberg-Korrektur für Mehrfachtests wurde als statistischer Test zur Berechnung der Falschentdeckungsrate in IPA-Funktionen und -Pfadern verwendet. Gemeinsame und einzigartige Genregulationen in den verschiedenen Beobachtungsgruppen wurden mit dem "*Compare Analysis Tool*" ermittelt.

### 2.13.2 Western Blotting

Der Proteinnachweis auf den Membranen wurde mit einer Peqlab Gel-Documentation-Station evaluiert. Hierbei wurde die Intensität der Banden bei den entsprechenden Molekulargewichtsmarkern digital festgehalten. Danach wurden die Bilder mit der ImageJ software (NIH, USA) quantifiziert. Die Daten stammen jeweils aus mindestens drei unabhängigen Experimenten, sofern nicht anders angegeben. Die Auswertung der Ergebnisse erfolgte mit Excel und Sigma Stat.

Die gemessenen Werte der Proteinbanden wurden mittels der  $\beta$ -Aktin-Banden normalisiert. Die Ergebnisse wurden als Quotient der Bande im Verhältnis zu  $\beta$ -Aktin dargestellt.

Die statistische Auswertung erfolgte mit dem Programm Sigma Stat. Es wurde der Standardfehler des Mittelwertes (Standard Error of the Mean, SEM) errechnet. Der Unterschied zwischen den einzelnen Gruppen wurde bei normalverteilten Daten durch einen Student's T-Test analysiert. Ansonsten wurde der Mann-Whitney Rank Sum Test verwendet. Folgende Signifikanzwerte wurden in den Diagrammen dargestellt: \*:<0,05; \*\*:<0,01; \*\*\*:< 0,001.

### 2.13.3 Zell-Viabilitäts-Assay

Die Zellviabilität wurde ermittelt, indem die Fluoreszenz bei 560/590 nm mit einem FLUOstar *multi-plate reader* (BMG Labtech, Germany) gemessen wurde. Für die Auswertung wurden die Messungen zwei Stunden nach Resazurinzugabe verwendet. Die Daten stammen aus mindestens drei unabhängigen Experimenten mit einem Minimum von jeweils zwei Replikaten, sofern nicht anders angegeben. Es wurde das prozentuale Verhältnis zum Kontrollwert, jeweils mit und ohne Capsaicinstimulierung, errechnet. Die Ergebnisse wurden mit und ohne Capsaicinstimulierung, als ein Vielfaches der Kontrolle mit dem Standardfehler des Mittelwertes (*Standard Error of the Mean*, SEM) dargestellt.

### 2.13.4 Calcium-Assay

Auch bei dem Calcium-Assay stammen die Daten aus mindestens drei unabhängigen Experimenten, sofern nicht anders angegeben. Die Ergebnisse wurden, mit und ohne Capsaicinstimulierung, als ein Vielfaches der Kontrolle mit dem Standardfehler des Mittelwertes (*Standard Error of the Mean*, SEM) dargestellt.

Die statistische Auswertung erfolgte mit dem Programm Sigma Stat. Es wurde der Standardfehler des Mittelwertes (*Standard Error of the Mean*, SEM) errechnet. Der Unterschied zwischen den einzelnen Gruppen wurde bei normalverteilten Daten durch einen Student's T-Test analysiert. Ansonsten wurde der Mann-Whitney Rank Sum Test verwendet. Die Daten wurden schließlich in Säulendiagrammen dargestellt. Hier wurden die Mittelwerte + *Standard Error of the Mean* verwendet und die Signifikanzwerte in Bezug auf die Ösophagitisgruppe als \* $p < 0,05$ ; \*\* $p < 0,01$ ; \*\*\* $p < 0,001$  angegeben.

### 3. Ergebnisse

#### 3.1 Expression von *Acid-sensing ion channels* (ASICs), 5-Hydroxytryptamin-Rezeptor-Subtypen (5-HTR) und Serotonintransporter (SERT) in Rattenösophagi

Im Folgenden sind die Ergebnisse zur Expression der *Acid Sensing Ion Channels*, 5-Hydroxytryptamin-Rezeptor-Subtypen und des Serotonintransporters in den Ösophagi der behandelten und unbehandelten Tiere vergleichend dargestellt.

##### 3.1.1 Genexpression

Die Anzahl der Tiere, die zum Ende der Studie noch lebten, war: acht bei der Sham-Operation, neun für die Ösophagitis-Gruppe, sechs für die niedrige Dosis und sieben für die hohe Dosis STW 5, sechs für die Omeprazol-Gruppe. Alle anderen Tiere starben während der Studie oder mussten wegen ethischer Bedenken getötet werden (diese Entscheidung fällt die Versuchsleitung gemäß dem Tierschutzgesetzes (Ratsch 2008)).

**Tab. 7:** Genexpressionsdaten der ASICs im ösophagealen Rattengewebe

#### Sham vs. Öso Ösophagitis vs. Behandlungsgruppe -phagitis

| Rezeptor/<br>Kanal | Ösophagitis | STW 5<br>0,5 ml/kg | STW 5<br>2 ml/kg | Omeprazol<br>30 mg/kg |
|--------------------|-------------|--------------------|------------------|-----------------------|
| ASIC1              | +1,33       | -1,38              | -1,27            | -1,25                 |
| ASIC2              | +2,68       | -2,7*              | -2,44 (p=0,09)   | -2,73 (p=0,08)        |
| ASIC3              | +1,13       | -1,29              | -1,00            | -1,03                 |
| ASIC4              | +3,83***    | -1,36              | -4,79***         | -4,00***              |
| ASIC5              | +1,02       | -9,53              | +1,00            | -1,02                 |

Die Genexpression wurde als ein Vielfaches der Genexpressionsdaten (*Agilent whole genome microarray*) im Vergleich der Sham- und Ösophagitis-Gruppe bzw. der Ösophagitis- und den Behandlungsgruppen angegeben (STW 5 (0,5 ml/kg), STW 5 (2 ml/kg), Omeprazol 30 mg/kg). Die Anzahl der Tiere pro Gruppe: Sham (acht Tiere), Ösophagitis (neun Tiere), Behandlungsgruppe STW 5 (0,5 ml/kg) (sechs Tiere), Behandlungsgruppe STW 5 (2ml/kg) (sieben Tiere), Omeprazol (sechs Tiere). \* p<0.05; \*\* p<0.01; \*\*\* p<0.001.

Die Genexpressionsdaten zeigen eine geringe, jedoch statistisch signifikante Erhöhung der Genexpression von ASIC4. Im Vergleich zu der Sham-Versuchsreihe stieg die Genexpression von ASIC4 in der Ösophagitis-Versuchsreihe um ein 3,83-faches an. In den

Behandlungsgruppen mit STW 5 (2 ml/kg) und Omeprazol (30 mg/kg) konnte eine niedrigere Genexpression von ASIC4 um ein -4,79-faches bzw. -4,00-faches im Vergleich zur Ösophagitisgruppe beobachtet werden.

**Tab. 8:** Genexpressionsdaten von 5-HTRs und SERT im ösophagealen Rattengewebe  
**Sham vs. Öso- Ösophagitis vs. Behandlungsgruppe**  
**phagitis**

| Rezeptor/<br>Kanal | Ösophagitis | STW 5<br>0,5 ml/kg | STW 5<br>2 ml/kg | Omeprazol<br>30 mg/kg |
|--------------------|-------------|--------------------|------------------|-----------------------|
| 5-HTR1A            | +1,03       | +1,24              | +1,28            | +2,69*                |
| 5-HTR1B            | -1,45       | +1,85              | +1,81            | +2,65                 |
| 5-HTR1D            | +1,02       | -1,13              | -1,14            | +0,69                 |
| 5-HTR2A            | +3,02***    | -1,46              | -5,36***         | -3,88***              |
| 5-HTR2B            | +6,64***    | -1,6               | -7,92***         | -3,68***              |
| 5-HTR4             | -3,5*       | -1,0               | -1,9             | -1,27                 |
| 5-HTR5A            | -1,09       | +0,75              | +0,76            | +3,63*                |
| 5-HTR7             | +9,38***    | -4,11**            | -15,45***        | -6,83***              |
| SERT               | -2,4**      | +1,71              | +2,77***         | +2,42*                |

Die Genexpression wurde als ein Vielfaches der Genexpressionsdaten (*Agilent whole genome microarray*) im Vergleich der Sham- und Ösophagitis-Gruppe bzw. der Ösophagitis- und den Behandlungsgruppen angegeben (STW 5 (0,5 ml/kg), STW 5 (2 ml/kg), Omeprazol 30 mg/kg). Die Anzahl der Tiere pro Gruppe: Sham (acht Tiere), Ösophagitis (neun Tiere), Behandlungsgruppe STW 5 (0,5 ml/kg) (sechs Tiere), Behandlungsgruppe STW 5 (2ml/kg) (sieben Tiere), Omeprazol (sechs Tiere). \* p<0.05; \*\* p<0.01; \*\*\* p<0.001.

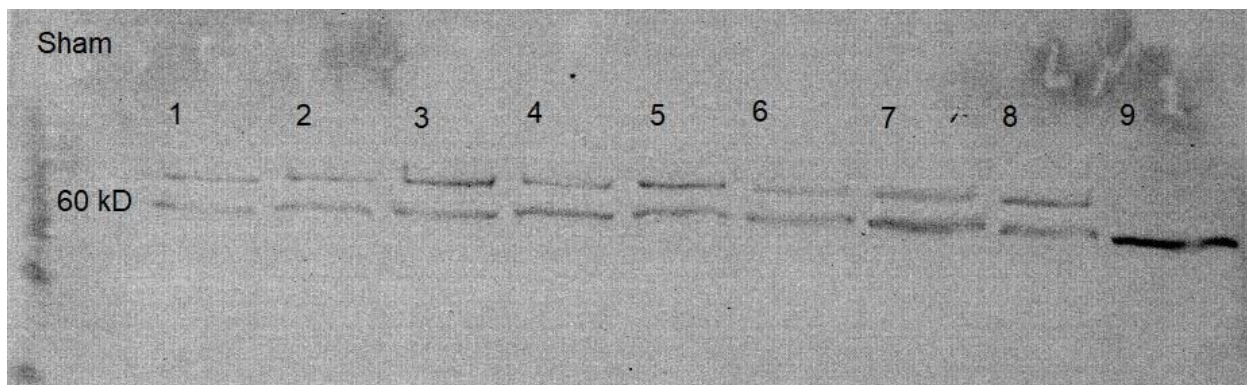
Die Genexpressionsdaten zeigen eine geringe, jedoch statistisch signifikante Erhöhung der Genexpression bei Ösophagitis von 5-HTR2A (3,02-fach), 5-HTR2B (6,64-fach), 5-HTR7 (9,38-fach) und eine niedrigere Genexpression von SERT (-2,4-fach). In den Behandlungsgruppen mit STW 5 (2 ml/kg) und Omeprazol (30 mg/kg) konnte eine statistisch signifikante Herabregulation Genexpression von 5-HTR2A (-5,36-fach bzw. -3,88-fach), 5-HTR2B (-7,92-fach bzw. -3,68-fach), 5-HTR7 (-15,45-fach bzw. -6,83-fach) beobachtet werden. Die Hemmung von 5-HTR7 durch Omeprazol war um den Faktor -6,83 geringer als bei STW 5 (-15,4-fach), und sie konnte die gesteigerte Expression in der Ösophagitis-Gruppe nicht kompensieren.

### 3.1.2 Western Blots

Im Folgenden wird die qualitative und semiquantitative Expression von ASIC1-4 und 5-HT-Rezeptoren sowie SERT in Rattenösophagi untersucht. Die Abbildungen 10, 11, 12, 14 und 15 zeigen die qualitativen Ergebnisse der Western Blots, während die Abbildungen 13, 16, 17 und 18 die quantitative Auswertung der Western Blots in Form von Diagrammen (als ein Vielfaches von  $\beta$ -Aktin) zeigen.

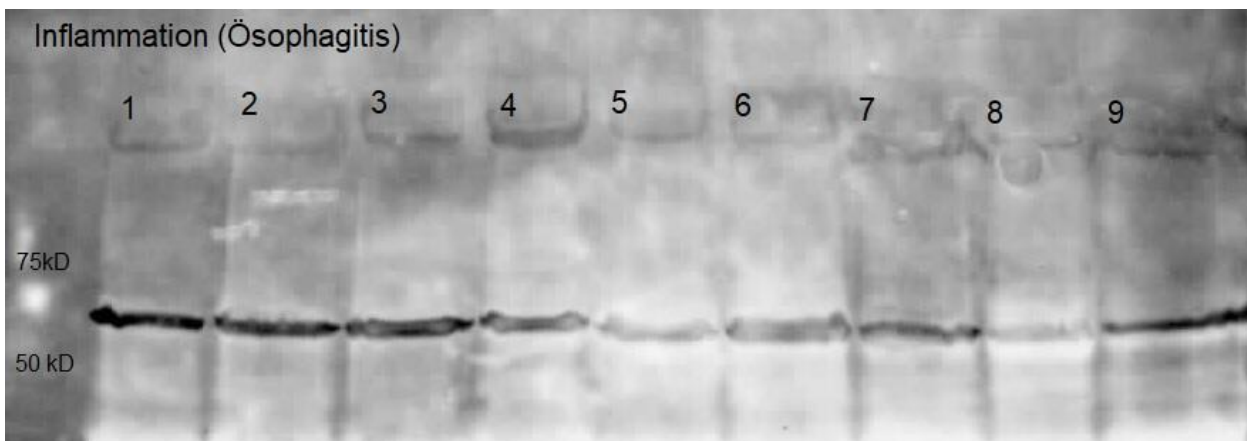
#### Acid Sensing Ion Channels (ASICs)

Im Folgenden sind repräsentative Western Blots von ASIC3 und ASIC4 dargestellt.



**Abb. 10:** ASIC3-Expression in Rattenösophagi in der Sham-Gruppe

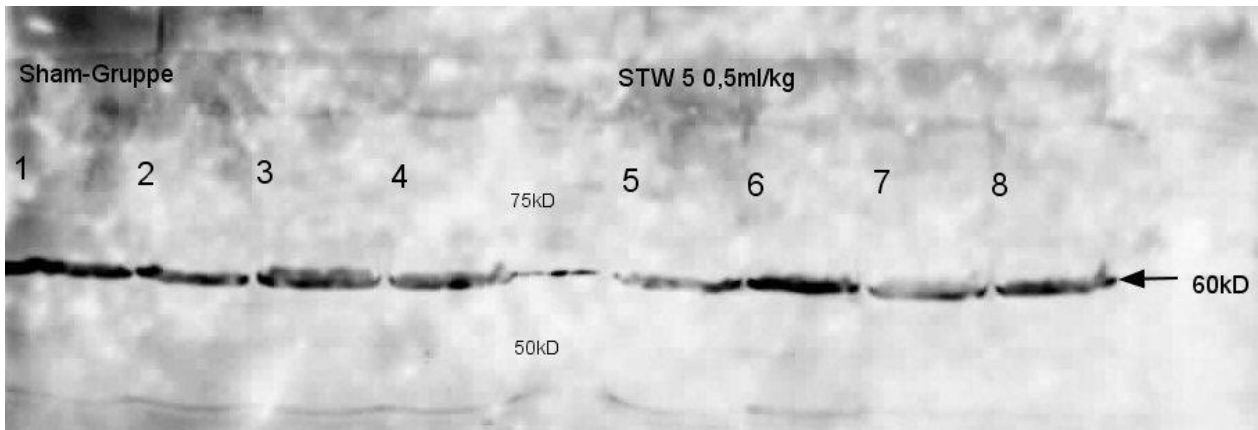
Die Banden 1-8 sind jeweils Ösophaguslysatsproben von sham-operierten Tieren. Die hier dargestellte Bande liegt bei 60 kD und ist spezifisch für ASIC3. Das Bild steht repräsentativ für eins von drei unabhängigen Experimenten. Rechts dargestellt ist der Molekulargewichtsmarker.



**Abb. 11:** ASIC4-Expression in Rattenösophagi in der Entzündungs-Gruppe

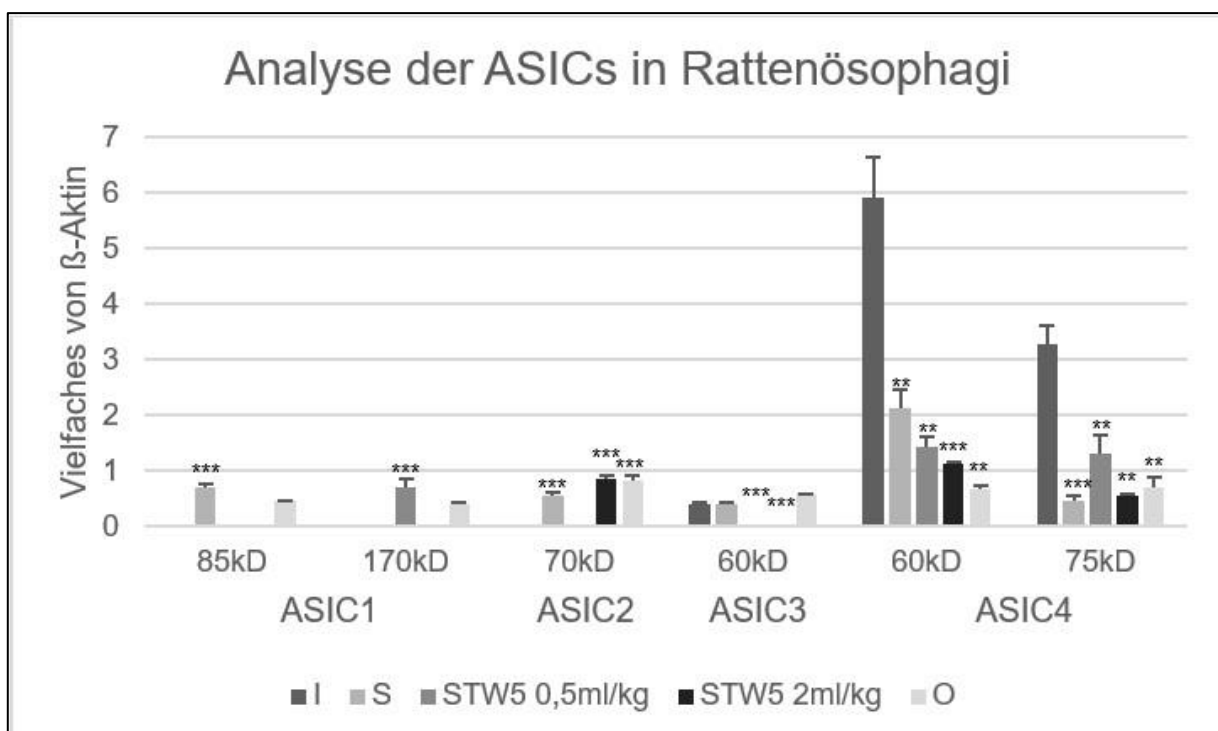
Die Banden 1-9 sind jeweils Ösophaguslysatsproben von Tieren, bei denen eine Ösophagitis induziert wurde. Die hier dargestellte Bande liegt bei 60 kD und ist spezifisch für

ASIC4. Das Bild steht repräsentativ für eins von drei unabhängigen Experimenten. Links dargestellt ist der Molekulargewichtsmarker.



**Abb. 12:** ASIC4-Expression in Rattenösophagi in der Sham-Gruppe und nach der Behandlung mit STW 5

Die Banden 1-4 sind jeweils Ösophaguslysatsproben von sham-operierten Tieren und die Banden 5-8 sind jeweils Ösophaguslysatsproben von STW 5 behandelten Tieren. Die hier markierte Bande liegt bei 60 kD und ist spezifisch für ASIC4. Das Bild steht repräsentativ für eins von drei unabhängigen Experimenten. Rechts dargestellt ist der Molekulargewichtsmarker.



**Abb. 13:** Die Expression von ASICs in Rattenösophagi in verschiedenen Versuchsgruppen (I= Entzündung (Ösophagitis), S= Sham, STW 5 (0,5 ml/kg), STW 5 (2 ml/kg), O= Omeprazol 30 mg/kg)

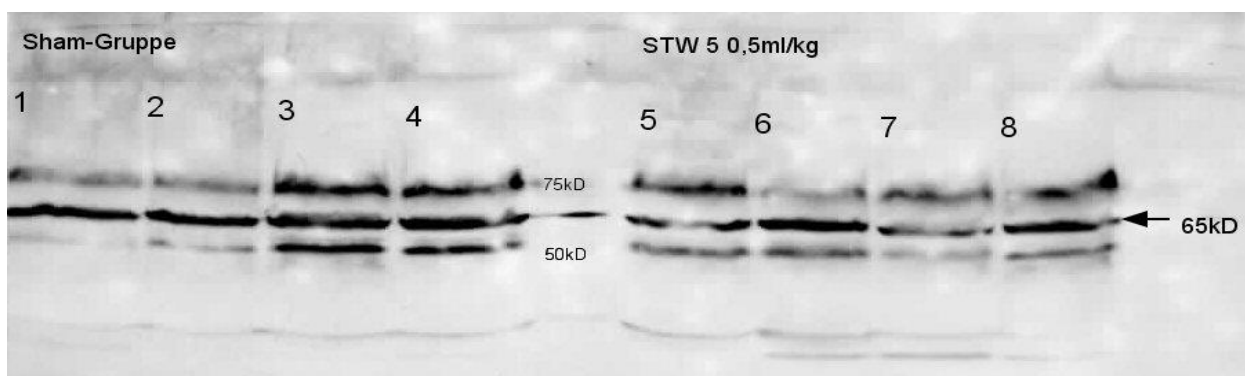


Dargestellt ist die in den Western Blots (n=3) gemessene Expression von ASIC1-4 als ein Vielfaches von  $\beta$ -Aktin. Die angegebenen kD-Werte entsprechen den Molekulargewichten der untersuchten ASICs (laut Herstellerangaben: ASIC1: 85 kD, 170 kD; ASIC2: 70 kD; ASIC3 60 kD; ASIC4: 60 kD, 75 kD). Dargestellt sind die Mittelwerte+SEM. Signifikanzwerte angegeben in Bezug auf die Ösophagitisgruppe \* $p < 0,05$ ; \*\* $p < 0,01$ ; \*\*\* $p < 0,001$  (verwendete Tests: ASIC 1 alle Gruppen *Mann-Whitney Rank Sum Test*; ASIC 2 nur I (Entzündung) *Mann-Whitney Rank Sum Test* sonst *Student's T-Test*; ASIC 3 60 kD nur O (Omeprazol) *Mann-Whitney Rank Sum Test* sonst *Student's T-Test*, 80 kD nur I (Entzündung) und O (Omeprazol) *Mann-Whitney Rank Sum Test* sonst *Student's T-Test*, ASIC 4 alle Gruppen *Mann-Whitney Rank Sum Test*).

Es konnte gezeigt werden, dass die ASIC-Kanäle in den verschiedenen Versuchsgruppen unterschiedlich stark exprimiert werden. Bei ASIC1 konnte bei 85 kD eine statistisch signifikante Erhöhung in der Sham-Gruppe im Vergleich zur Ösophagitis-Gruppe und bei 170 kD eine statistisch signifikante Erhöhung in der STW 5 (0,5 ml/kg) -Gruppe im Vergleich zur Ösophagitis-Gruppe gezeigt werden. Bei ASIC2 konnte eine statistisch signifikante Erhöhung sowohl in der Sham-Gruppe als auch in den Gruppen STW 5 (2 ml/kg) und Omeprazol 30 mg/kg festgestellt werden. Jeweils bei ASIC3 und bei 60 kD sind die STW 5 (0,5 ml/kg) - und STW 5 (2 ml/kg) -Gruppen im Vergleich zur Ösophagitis-Gruppe statistisch signifikant herabreguliert. Bei ASIC4 sind bei beiden kD-Werten die Versuchs-Gruppen im Vergleich zur Ösophagitis-Gruppe statistisch signifikant herabreguliert.

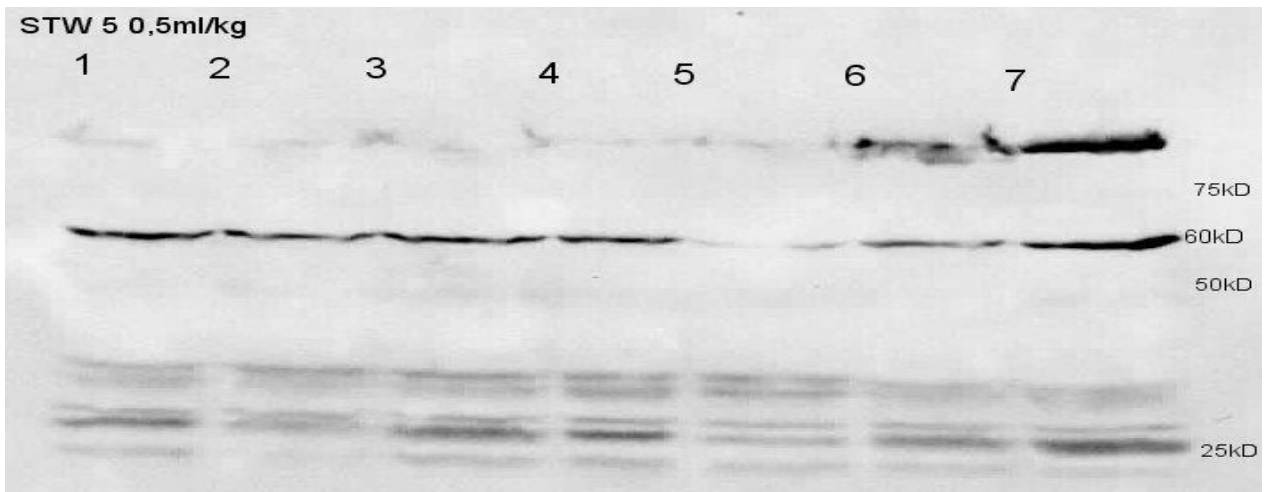
## 5-HTR und SERT

Im Folgenden sind die Ergebnisse der Western Blots der 5-HTR und SERT dargestellt.



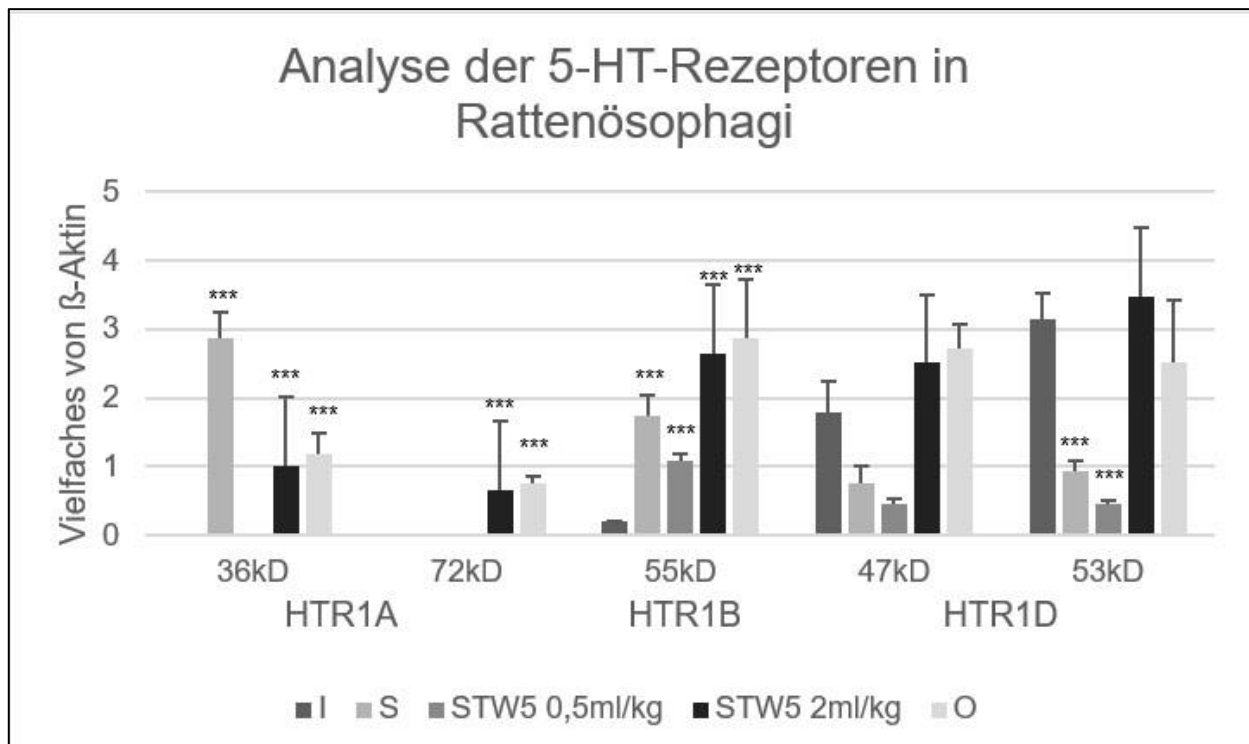
**Abb. 14:** 5-HTR1B-Expression in Rattenösophagi nach der Behandlung mit STW 5

Die Banden 1-4 sind jeweils Ösophaguslysatproben von sham-operierten Tieren und die Banden 5-8 sind jeweils Proben von STW 5 behandelten Tieren. Die hier markierte Bande liegt bei 65kD und ist spezifisch für 5-HTR1B. Das Bild steht repräsentativ für eins von drei unabhängigen Experimenten.



**Abb. 15:** 5-HTR2B- Expression in Rattenösophagi nach der Behandlung mit STW 5

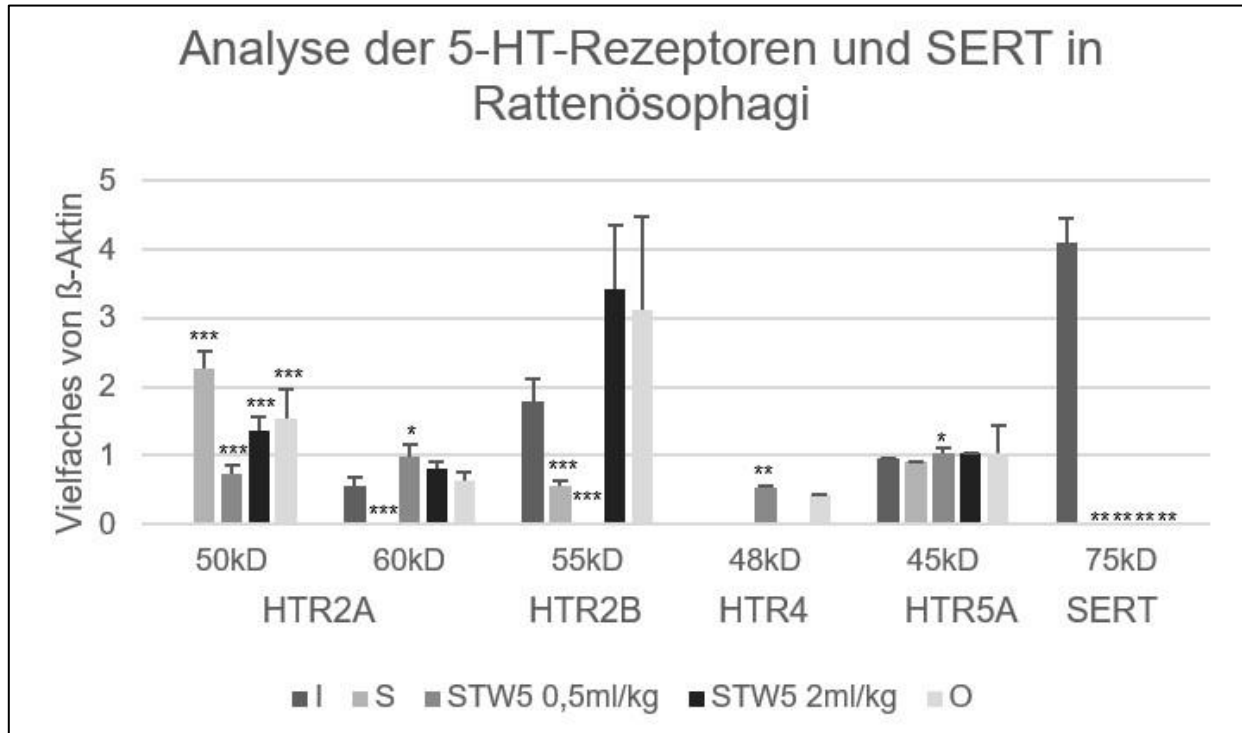
Die Banden 1-7 sind jeweils Ösophaguslysatsproben von Einzeltieren nach Behandlung mit STW 5. Die hier markierten Banden liegen bei 25 kD und 60 kD und sind spezifisch für 5-HTR2B. Das Bild steht repräsentativ für eins von drei unabhängigen Experimenten.



**Abb. 16:** Die Expression von 5-HT-Rezeptoren in Rattenösophagi in verschiedenen Versuchsgruppen (I= Entzündung (Ösophagitis), S= Sham, STW 5 (0,5 ml/kg), STW 5 (2 ml/kg), O= Omeprazol 30 mg/kg)

Dargestellt ist die in den Western Blots gemessene Expression von 5-HTR1A, 5-HTR1B, 5-HTR1D als ein Vielfaches von  $\beta$ -Aktin. Die angegebenen kD-Werte entsprechen den Molekulargewichten der untersuchten 5-HTR (laut Herstellerangaben: 5-HTR1A: 36 kD, 72 kD; 5-HTR1B: 55 kD; 5-HTR1D 47 kD, 53 kD). Dargestellt sind die Mittelwerte+SEM.

Signifikanzwerte angegeben in Bezug auf die Ösophagitisgruppe \* $p < 0,05$ ; \*\* $p < 0,01$ ; \*\*\* $p < 0,001$  (verwendete Tests: HTR 1A alle Gruppen *Mann-Whitney Rank Sum Test*; HTR 1B alle Gruppen *Mann-Whitney Rank Sum Test*; HTR 1D alle Gruppen *Student's T-Test*).

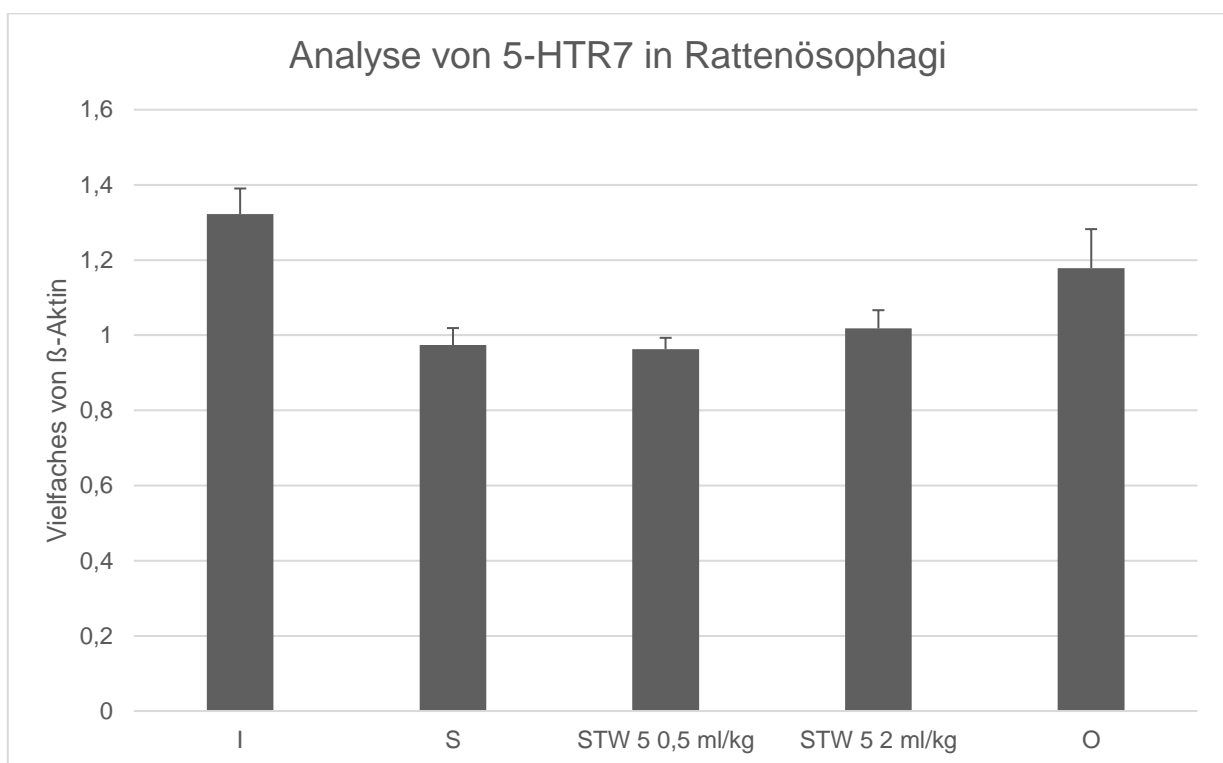


**Abb. 17:** Die Expression von 5-HT-Rezeptoren und SERT in Rattenösophagi in verschiedenen Versuchsgruppen (I= Entzündung (Ösophagitis), S= Sham, STW 5 (0,5 ml/kg), STW 5 (2 ml/kg), O= Omeprazol 30 mg/kg)

Dargestellt ist die in den Western Blots gemessene Expression von 5-HTR2A, 5-HTR2B, 5-HTR4, 5-HTR5A, SERT als Vielfaches von  $\beta$ -Aktin. Die angegebenen kD-Werte entsprechen den Molekulargewichten der untersuchten 5-HTR (laut Herstellerangaben: 5-HTR2A: 50 kD, 60 kD; 5-HTR2B 55 kD; 5-HTR4 48 kD; 5-HTR5A 45 kD; SERT 75 kD). Dargestellt sind die Mittelwerte+SEM. Signifikanzwerte angegeben in Bezug auf die Ösophagitisgruppe \* $p < 0,05$ ; \*\* $p < 0,01$ ; \*\*\* $p < 0,001$  (verwendete Tests: HTR 2A alle Gruppen *Mann-Whitney Rank Sum Test*; HTR 2B 55 kD nur I (Entzündung) und S (Sham) *Mann-Whitney Rank Sum Test* sonst *Student's T-Test*; HTR4 alle Gruppen *Mann-Whitney Rank Sum Test*; HTR 5A alle Gruppen *Mann-Whitney Rank Sum Test*; SERT alle Gruppen *Mann-Whitney Rank Sum Test*).

Auch die 5-HT-Rezeptoren und der SERT werden in den verschiedenen Versuchsgruppen unterschiedlich reguliert. 5-HTR1A zeigt bei 36 kD eine statistisch signifikante Erhöhung in der Sham-, der STW 5 (2 ml/kg) - und der Omeprazol-Gruppe. Bei 72 kD zeigt sich lediglich eine Erhöhung in der STW 5 (2 ml/kg) - und der Omeprazol-Gruppe. Bei 5-HTR1B zeigt sich bei 55 kD eine statistisch signifikante Erhöhung in allen Gruppen im

Vergleich zur Ösophagitis-Gruppe. Bei 5-HTR1D zeigt sich bei 53 kD eine statistisch signifikante Herabregulation des Kanals in der Sham- und STW 5 (0,5 ml/kg) -Gruppe im Vergleich zur Ösophagitis-Gruppe. 5-HTR2A zeigt bei 50 kD eine statistisch signifikante Erhöhung in allen Gruppen im Vergleich zur Ösophagitis-Gruppe. Bei 5-HTR2B zeigt sich bei 55 kD eine statistisch signifikante Herabregulation des Kanals in den Gruppen Sham und STW 5 (0,5 ml/kg) im Vergleich zur Ösophagitis-Gruppe. Bei SERT zeigt sich in allen Gruppen eine statistisch signifikante Herabregulation des Transporters im Vergleich zur Ösophagitis-Gruppe.



**Abb. 18:** Die Expression von 5-HT-Rezeptoren und SERT in Rattenösophagi in verschiedenen Versuchsgruppen (I= Entzündung (Ösophagitis), S= Sham, STW 5 (0,5 ml/kg), STW 5 (2 ml/kg), O= Omeprazol 30 mg/kg)

Die densitometrische Auswertung zeigte keine statistisch signifikanten Veränderungen von 5-HTR7 (die Daten sind in Bezug zu  $\beta$ -Aktin dargestellt). Diese Western Blot Analysen wurden von Anastasiia Shcherbakova durchgeführt. Dargestellt sind die Mittelwerte+SEM. Signifikanzwerte angegeben in Bezug auf die Ösophagitisgruppe \* $p < 0,05$ ; \*\* $p < 0,01$ ; \*\*\* $p < 0,001$  (verwendeter Test: *Student's T-Test*).

Die Western Blot Analysen von 5-HTR7 zeigen eine generelle Hochregulierung der Expression des Kanals in allen Versuchsgruppen. Zudem zeigen sie eine unterschiedliche Regulierung des Rezeptors in den verschiedenen Versuchsgruppen, wovon keine der

Gruppen eine statistisch signifikante Hoch- oder Herabregulation im Vergleich zur Ösophagitisgruppe aufweist.

### 3.2 Humane Ösophagusproben

#### 3.2.1 Klinische Daten

In der folgenden Tabelle werden die klinischen Daten und Befunde der ÖGD von insgesamt 38 Patient\*innen zusammengefasst. Bei allen Patient\*innen wurde im Rahmen der ÖGD eine Ösophagusprobe entnommen, aus der für die histologische Untersuchungen Parafinschnitte angefertigt wurden.

**Tab. 9:** Demographische Patient\*innen Daten der ÖGD

|                   | Ösophageale Mukosa endoskopisch normal (n=17) | Grad A Reflux Ösophagitis (n=9) | Grad B Reflux Ösophagitis (n=10) | Grad C Reflux Ösophagitis (n=2) |
|-------------------|---|---------------------------------|----------------------------------|---------------------------------|
| Geschlecht (m/w)  | 11/6  | 7/2                             | 6/4                              | 1/1                             |
| Alter (MW +/- SD) | 45,1(+14,7)                                   | 35,2(+13,4)                     | 45,8(+11,5)                      | 52,5(+7,5)                      |
| PPI-Einnahme      | 8   | 5                               | 5                                | 1                               |

Die Daten stammen von 38 Patient\*innen von denen im Rahmen einer ÖGD an der Universität Kairo Ösophagusproben genommen wurden. Abkürzungen: ÖGD: Ösophagoduodenoskopie, m: männlich, w: weiblich, MW +/- SD: Mittelwert +/- Standardabweichung, PPI: Protonenpumpeninhibitor

Das Gesamtkollektiv von 38 Patient\*innen wurde anhand des endoskopischen Befundes in vier Gruppen eingeteilt (siehe Tabelle 9). Insgesamt gab es 25 männliche Patienten und 13 weibliche Patientinnen. Fast die Hälfte der Patient\*innen hatte bei der Untersuchung eine endoskopisch normale Ösophagismukosa und acht dieser 17 Patient\*innen nahmen PPIs ein.

**Tab. 10:** ÖGD-Indikationen

| ÖGD-Indikation                 | Ösophageale Mukosa endoskopisch normal (n=17) | Grad A Reflux Ösophagitis (n=9) | Grad B Reflux Ösophagitis (n=10) | Grad C Reflux Ösophagitis (n=2) |
|--------------------------------|---|---------------------------------|----------------------------------|---------------------------------|
| Abdominelle Schmerzen          | 7   | 4                               | /                                | /                               |
| +Reflux                        | 2   | 2                               | 8                                | 1                               |
| +Erbrechen                     | 2   | 1                               | /                                | /                               |
| +Gewichtsverlust               | 1   | /                               | /                                | /                               |
| +GI-Blutung                    | 1   | /                               | /                                | /                               |
| Duodenale Biopsie + Aspiration | 1   | /                               | /                                | /                               |
| Schweres Sodbrennen            | 1   | 2                               | /                                | /                               |
| Dysphagie                      | 1   | /                               | 1                                | 1                               |

|                                |   |   |   |   |
|--------------------------------|---|---|---|---|
| Anämie                         | 1 | / | / | / |
| Untersuchung vor der Reflux OP | / | / | 1 | / |

Abkürzungen: ÖGD: Ösophagoduodenoskopie, GI: gastrointestinale

Die Indikationen für die Untersuchung der Speiseröhre waren vielseitig. Am häufigsten wurde die ÖGD angeordnet aufgrund von abdominellen Schmerzen (elf Patient\*innen) und abdominellen Schmerzen plus Refluxbeschwerden (13 Patient\*innen) (siehe Tabelle 10).

**Tab. 11:** Zusätzliche Befunde der ÖGD

| Nebenbefunde der ÖGD (Mehrfachnennungen möglich) | Ösophageale Mukosa endoskopisch normal (n=17) | Grad A Reflux Ösophagitis (n=19) | Grad B Reflux Ösophagitis (n=10) | Grad C Reflux Ösophagitis (n=2) |
|--|---|----------------------------------|----------------------------------|---------------------------------|
| Hiatus Hernie                                    | 3   | /                                | 3                                | 1                               |
| Diffuse Gastritis                                | 6   | 5                                | 2                                | 1                               |
| Antrale Gastritis                                | 2   | 2                                | 2                                | /                               |
| Duodenitis                                       | 4   | 3                                | 3                                | /                               |
| Pangastritis                                     | 1   | 2                                | 3                                | /                               |
| Inkompetente Kardia                              | 1   | /                                | /                                | /                               |
| Magenerosion                                     | /   | /                                | 1                                | /                               |
| Magenulcus                                       | 1   | /                                | /                                | /                               |
| Präpylorischer Ulcus                             | 1   | /                                | 2                                | /                               |
| Blasse Magenmukosa                               | 1   | /                                | /                                | /                               |
| Keine  | 2   | /                                | /                                | /                               |

Abkürzungen: ÖGD: Ösophagoduodenoskopie

Auch die Nebenbefunde bei der Untersuchung des Ösophagus waren vielseitig. Hier wurde am häufigsten eine diffuse Gastritis (14 Patient\*innen), eine Duodenitis (zehn Patient\*innen) und eine Hiatushernie (sieben Patient\*innen) diagnostiziert (siehe Tabelle 11).

Tabelle 12 zeigt die immunhistochemische Anfärbung der Paraffinschnitte der Ösophagusproben der Patient\*innen mit humanen Antikörpern gegen ASIC4 und Serotonin.

**Tab. 12:** Immunhistochemie der Ösophaguspräparate

| Immunhistochemie    | Ösophageale Mukosa endoskopisch normal (n=17) | Grad A Reflux Ösophagitis (n=9) | Grad B Reflux Ösophagitis (n=10) | Grad C Reflux Ösophagitis (n=2) |
|---------------------|---|---------------------------------|----------------------------------|---------------------------------|
| ASIC4               | 7   | 5                               | 7                                | 1                               |
| Serotonin           | 2   | 3                               | 3                                | 2                               |
| ASIC4 und Serotonin | /   | 2                               | 3                                | 1                               |

Die Ösophagusproben wurden als Paraffinschnitte immunhistochemisch mit ASIC4- und Serotonin-Antikörpern angefärbt. Die Antikörper-Färbungen wurden im Vergleich zur H.E.-Färbung beurteilt, um Artefakte auszuschließen. Abkürzungen: ASIC: acid-sensing ion channel

Nach immunhistochemischer Untersuchung der Ösophagusproben lässt sich feststellen, dass in allen Befundgruppen positive Nachweise sowohl für ASIC4 als auch für Serotonin zu finden sind. Somit lässt sich sagen, dass ASIC4 sowohl in der endoskopisch normalen Mukosa als auch in Grad A, Grad B und Grad C der Refluxösophagitis exprimiert wird. Auch Serotonin (5-HT) konnte im endoskopisch gesunden Ösophagus und auch bei Grad A-C der Refluxösophagitis nachgewiesen werden. Da in allen vier Gruppen sowohl ASIC4 als auch Serotonin nachzuweisen war, besteht die Möglichkeit, dass säuresensible Kanäle (hier ASIC4) und Serotonin ein Kommunikationsnetzwerk bilden, welches in die Schmerzwahrnehmung und –weiterleitung involviert sein kann. Aufgrund der kleinen Anzahl an Proben, lässt sich keine Aussage über die Beeinflussung der Entzündung auf die Expremierung von ASIC4 und die Freisetzung von Serotonin in der ösophagealen Mukosa machen.

### 3.2.2 Immunhistochemie

Die Auswertung der immunhistochemisch angefärbten Proben zeigt, dass von den 38 Patient\*innen-Proben, 20 Proben ASIC4 und zehn Patient\*innen-Proben Serotonin positiv waren. Bei ASIC4 waren sieben Proben im endoskopisch normalen Ösophagus positiv und insgesamt 13 Proben im endoskopisch veränderten Ösophagus. Bei Serotonin waren zwei Proben im endoskopisch normalen Ösophagus positiv und insgesamt acht Proben im endoskopisch veränderten Ösophagus.

Anschließend wurden die klinischen Daten mit den immunhistochemisch aufbereiteten Proben verglichen. Hierbei wurde darauf geachtet, ob die Klinik der Patient\*innen mit der Anfärbung von entweder ASIC4 oder Serotonin in den Proben übereinstimmt und ob hier ein Zusammenhang gesehen werden konnte (siehe Tabelle 13).

**Tab. 13:** Auswertung der ASIC4 immunhistochemisch positiven Schnitte

|                                | Ösophageale Mukosa endoskopisch normal (n=7) | Grad A Reflux Ösophagitis (n=5) | Grad B Reflux Ösophagitis (n=7) | Grad C Reflux Ösophagitis (n=1) |
|--------------------------------|--|---------------------------------|---------------------------------|---------------------------------|
| Geschlecht (m/w)               | 6/1  | 3/2                             | 6/1                             | 1/0                             |
| Alter (MW +/- SD)              | 38,1 (+12,8)                                 | 37,2 (+10,3)                    | 47,57 (+8,57)                   | 45                              |
| PPI-Einnahme                   | 3  | 2                               | 3                               | /                               |
| <b>ÖGD-Indikation</b>          |  |                                 |                                 |                                 |
| Abdominelle Schmerzen          | 3  | 3                               | /                               | /                               |
| +Reflux                        | 1  | /                               | 5                               | /                               |
| +Erbrechen                     | 1  | 1                               | /                               | /                               |
| +Gewichtsverlust               | /  | /                               | /                               | /                               |
| +GI-Blutung                    | /  | /                               | /                               | /                               |
| Duodenale Biopsie + Aspiration | 1  | /                               | /                               | /                               |
| Schweres Sodbrennen            | /  | 1                               | /                               | /                               |
| Dysphagie                      | 1  | /                               | 1                               | 1                               |
| Anämie                         | /  | /                               | /                               | /                               |
| Untersuchung vor der Reflux OP | /  | /                               | 1                               | /                               |

Abkürzungen: ÖGD: Ösophagoduodenoskopie, m: männlich, w: weiblich, MW +/- SD: Mittelwert +/- Standardabweichung, PPI: Protonenpumpeninhibitor, ASIC: acid-sensing ion channel, GI: gastrointestinale

Die Daten zeigen, dass die sieben Patient\*innen mit positiver ASIC4-Anfärbung und endoskopisch normalem Ösophagus als Indikation für die ÖGD hauptsächlich abdominelle Schmerzen angaben. Die 13 weiteren Patient\*innen mit endoskopisch veränderten Ösophagi hatten hauptsächlich abdominelle Schmerzen und Reflux als Symptome. Fast die Hälfte der untersuchten Patient\*innen nahm PPIs ein und hatte trotz Einnahme eine symptomatische Indikation zur ÖGD. Das bestätigt, dass der Schmerz oder die Symptome der Patient\*innen durch mehr als nur Säure hervorgerufen werden. Ob jedoch die Expression der ASIC4 in nachweisbarem Zusammenhang mit den Symptomen trotz PPI-Einnahme steht, bedarf weiterer Untersuchungen.



Im Folgenden ist die Auswertung der Paraffinschnitte in Abhängigkeit zur Serotoninfärbung dargestellt.

**Tab. 14:** Auswertung der Serotonin immunhistochemisch positiven Schnitte

|                                | Ösophageale Mukosa endoskopisch normal (n=2) | Grad A Reflux Ösophagitis (n=3) | Grad B Reflux Ösophagitis (n=3) | Grad C Reflux Ösophagitis (n=2) |
|--------------------------------|--|---------------------------------|---------------------------------|---------------------------------|
| Geschlecht (m/w)               | 1/1  | 1/2                             | 2/1                             | 1/1                             |
| Alter (MW +/- SD)              | 54,5 (+0,5)                                  | 41,33 (+8,7)                    | 47 (+8,3)                       | 52,5(+7,5)                      |
| PPI-Einnahme                   | 1  | 2                               | 2                               | 1                               |
| <b>ÖGD-Indikation</b>          |  |                                 |                                 |                                 |
| Abdominelle Schmerzen          | /  | 2                               | /                               | /                               |
| +Reflux                        | /  | /                               | 2                               | 1                               |
| +Erbrechen                     | /  | 1                               | /                               | /                               |
| +Gewichtsverlust               | /  | /                               | /                               | /                               |
| +GI-Blutung                    | 1  | /                               | /                               | /                               |
| Duodenale Biopsie + Aspiration | /  | /                               | /                               | /                               |
| Schweres Sodbrennen            | /  | /                               | /                               | /                               |
| Dysphagie                      | /  | /                               | /                               | 1                               |
| Anämie                         | 1  | /                               | /                               | /                               |
| Untersuchung vor der Reflux OP | /  | /                               | 1                               | /                               |

Abkürzungen: ÖGD: Ösophagoduodenoskopie, m: männlich, w: weiblich, MW +/- SD: Mittelwert +/- Standardabweichung, PPI: Protonenpumpeninhibitor, ASIC: acid-sensing ion channel, GI: gastrointestinale

Die Auswertung der Daten zeigt, dass die Paraffinschnitte der beiden Patient\*innen, welche trotz endoskopisch normalem Ösophagus, eine positive Serotoninfärbung zeigten, entweder eine gastrointestinale Blutung oder eine Anämie hatten. Die weiteren acht Patient\*innen, von denen Proben aus endoskopisch veränderten Ösophagi genommen wurden, hatten hauptsächlich abdominelle Schmerzen und Reflux als Symptome. Mehr als die Hälfte der Patient\*innen mit positiver Serotoninfärbung nahm PPIs ein.

**Tab. 15:** Auswertung der Serotonin und ASIC4 positiven Schnitte

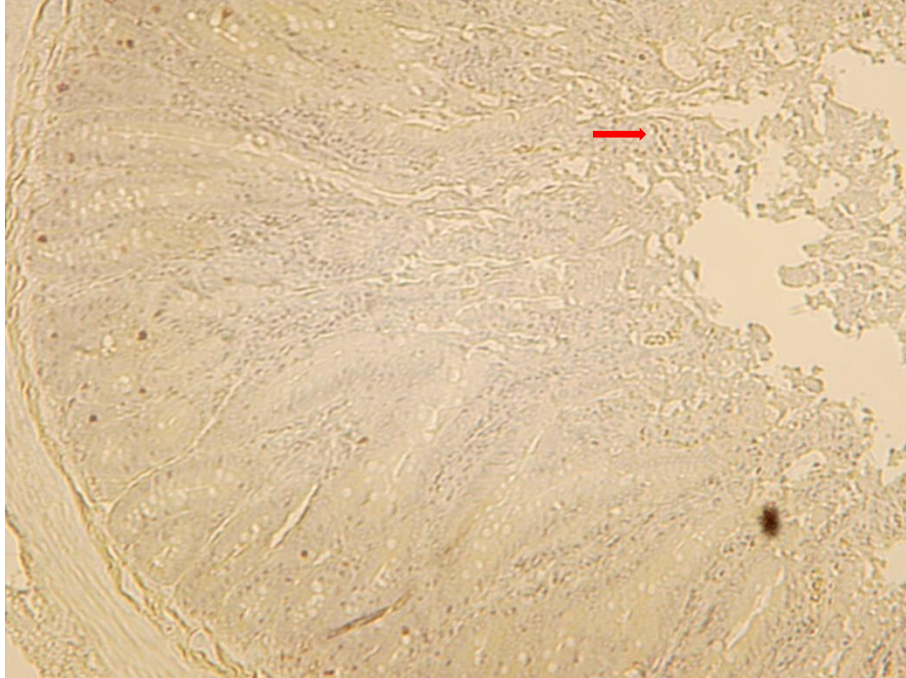
|                                | Ösophageale Mukosa endoskopisch normal (n=0) | Grad A Reflux Ösophagitis (n=2) | Grad B Reflux Ösophagitis (n=3) | Grad C Reflux Ösophagitis (n=1) |
|--------------------------------|--|---------------------------------|---------------------------------|---------------------------------|
| Geschlecht (m/w)               | /  | 1/1                             | 2/1                             | 1/0                             |
| Alter (MW +/- SD)              | /  | 46 (+7)                         | 47 (+8,3)                       | 45                              |
| PPI-Einnahme                   | /  | 2                               | 2                               | /                               |
| <b>ÖGD-Indikation</b>          |  |                                 |                                 |                                 |
| Abdominelle Schmerzen          | /  | 2                               | /                               | /                               |
| +Reflux                        | /  | /                               | 2                               | /                               |
| +Erbrechen                     | /  | 1                               | /                               | /                               |
| +Gewichtsverlust               | /  | /                               | /                               | /                               |
| +GI-Blutung                    | /  | /                               | /                               | /                               |
| Duodenale Biopsie + Aspiration | /  | /                               | /                               | /                               |
| Schweres Sodbrennen            | /  | /                               | /                               | /                               |
| Dysphagie                      | /  | /                               | /                               | 1                               |
| Anämie                         | 1  | /                               | /                               | /                               |
| Untersuchung vor der Reflux OP | /  | /                               | 1                               | /                               |

Abkürzungen: ÖGD: Ösophagoduodenoskopie, m: männlich, w: weiblich, MW +/- SD: Mittelwert +/- Standardabweichung, PPI: Protonenpumpeninhibitor, ASIC: acid-sensing ion channel, GI: gastrointestinale

Insgesamt gab es sechs Patient\*innen, welche in den Paraffinschnitten der Ösophagusproben positiv auf ASIC4 und Serotonin waren. Vier davon nahmen PPIs ein und hatten trotzdem Symptome (Abdominelle Schmerzen, Reflux, Erbrechen und Dysphagie).

## Immunhistochemische Anfärbung mit Serotonin

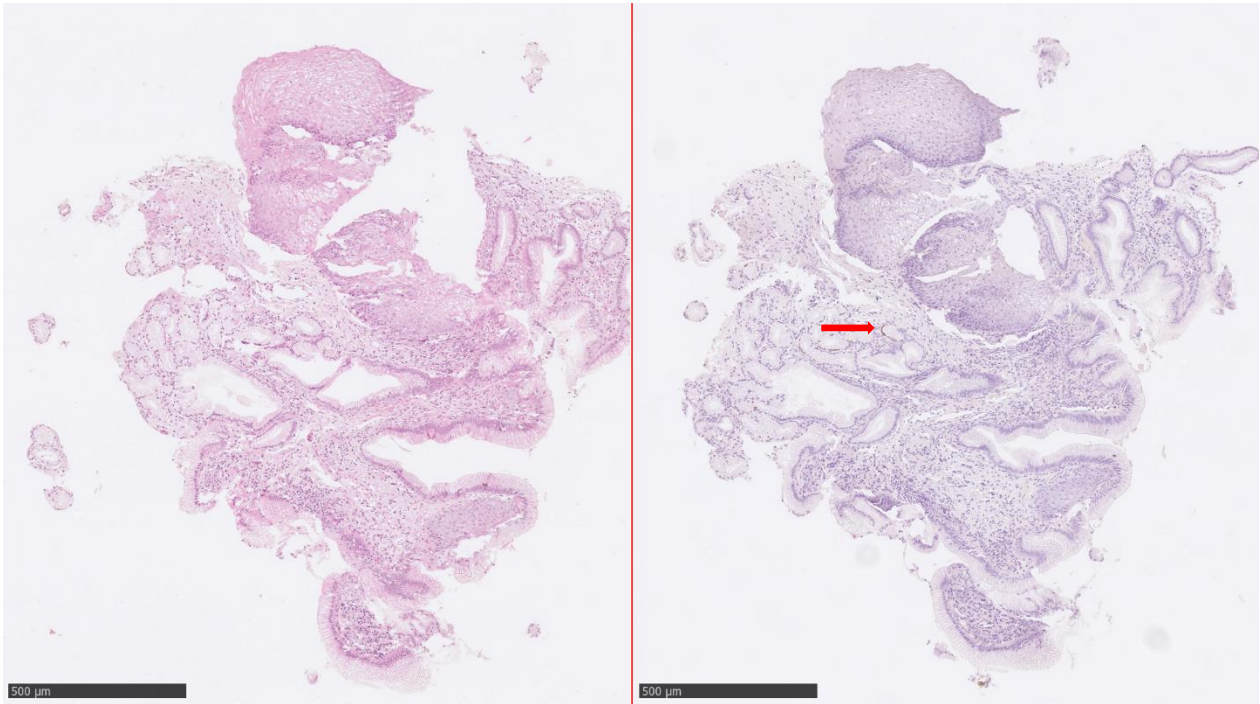
Zuerst wurde der Serotonin-Antikörper in Schnitten von Rattencolon getestet.



**Abb. 19:** Immunhistochemische Anfärbung von Rattencolon mit Serotonin-Antikörpern

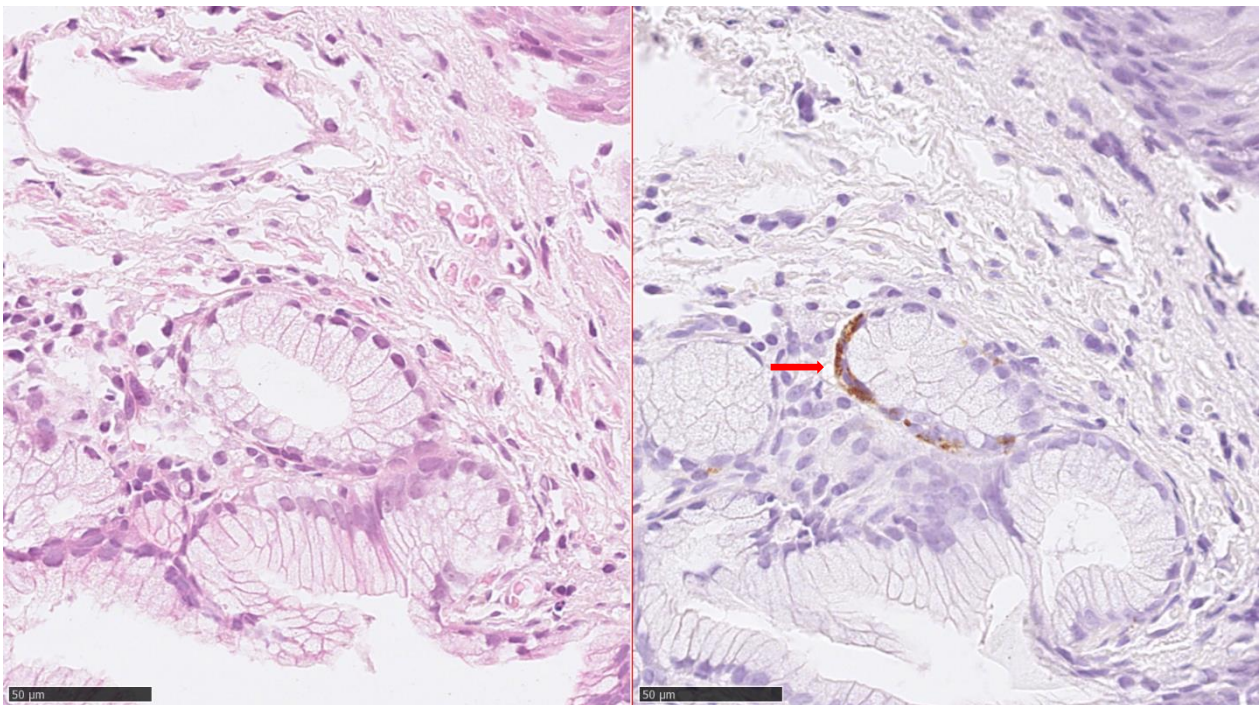
Probe#9. Der rote Pfeil zeigt beispielhaft auf die mit Serotonin-Antikörper angefärbten Zellen (Braunfärbung), 4-fache Vergrößerung.

Dieses Bild zeigt, dass die Anfärbung mit dem Serotonin-Antikörper erfolgreich war. Somit wurden mit diesem Antikörper auch die humanen Schnitte gefärbt. Hierfür wurden humane Ösophagusproben verwendet. Die erfolgreiche Anfärbung dieser Paraffinschnitte ist in den Abbildungen 19-21 zu sehen.



**Abb. 20:** Immunhistochemische Anfärbung von humanen Ösophagusproben mit Serotonin-Antikörpern

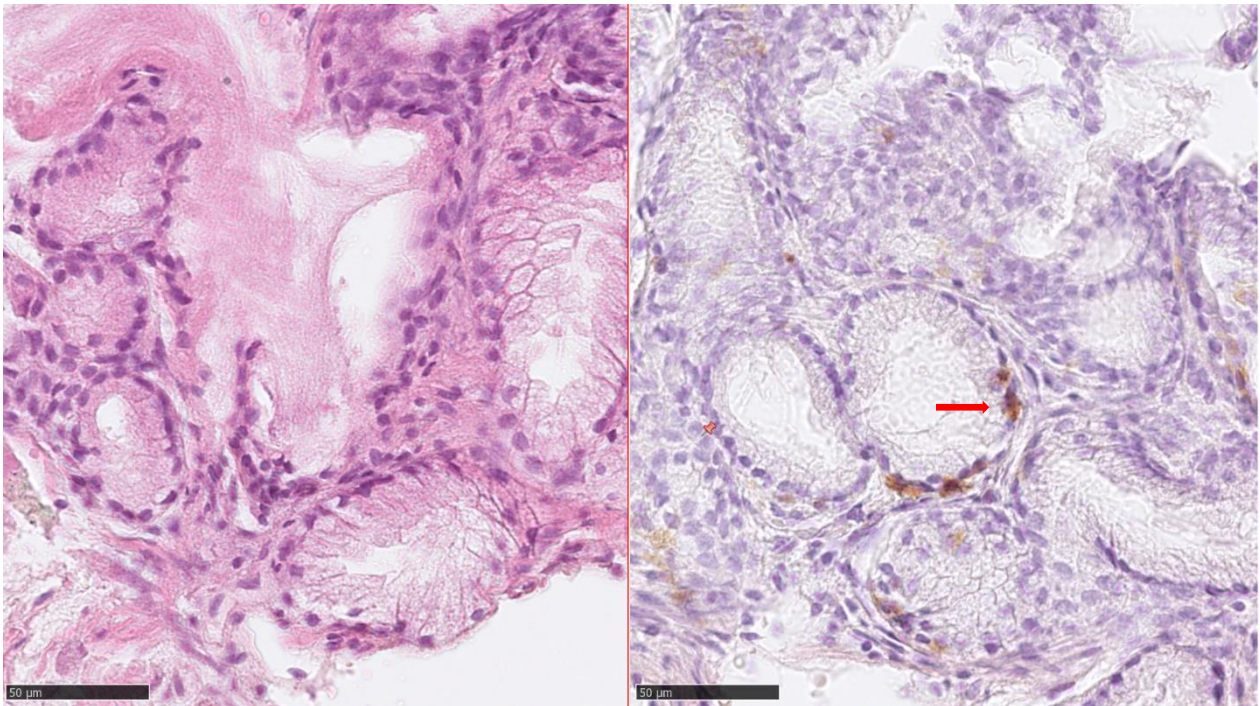
Probe#1. Überblicksbild: Linkes Bild H.E.-Färbung, rechtes Bild Anfärbung mit Serotonin-Antikörpern. Roter Pfeil zeigt auf den vergrößerten Bildausschnitt von Abbildung 21, 5-fache Vergrößerung.



**Abb. 21:** Immunhistochemische Anfärbung von humanen Ösophagusproben mit Serotonin-Antikörpern

Probe #1. Linkes Bild H.E.-Färbung, rechtes Bild Anfärbung mit Serotonin-Antikörpern. Roter Pfeil zeigt auf die Identifizierung von Serotonin in Ösophaguszellen (Braunfärbung). Der Zelltypus konnte nicht eindeutig identifiziert werden. Details zur Bestimmung der Zelltypen befinden sich auf Seite 89, 40-fache Vergrößerung.

Die hier gezeigten Proben stammen von einer 55-jährigen weiblichen Patientin, bei welcher aufgrund von abdominellen Schmerzen und gastrointestinalen Blutungen die Indikation für eine ÖGD gestellt wurde. Hierbei zeigte sich ein endoskopisch normaler Ösophagus. Die Patientin nahm PPIs ein.



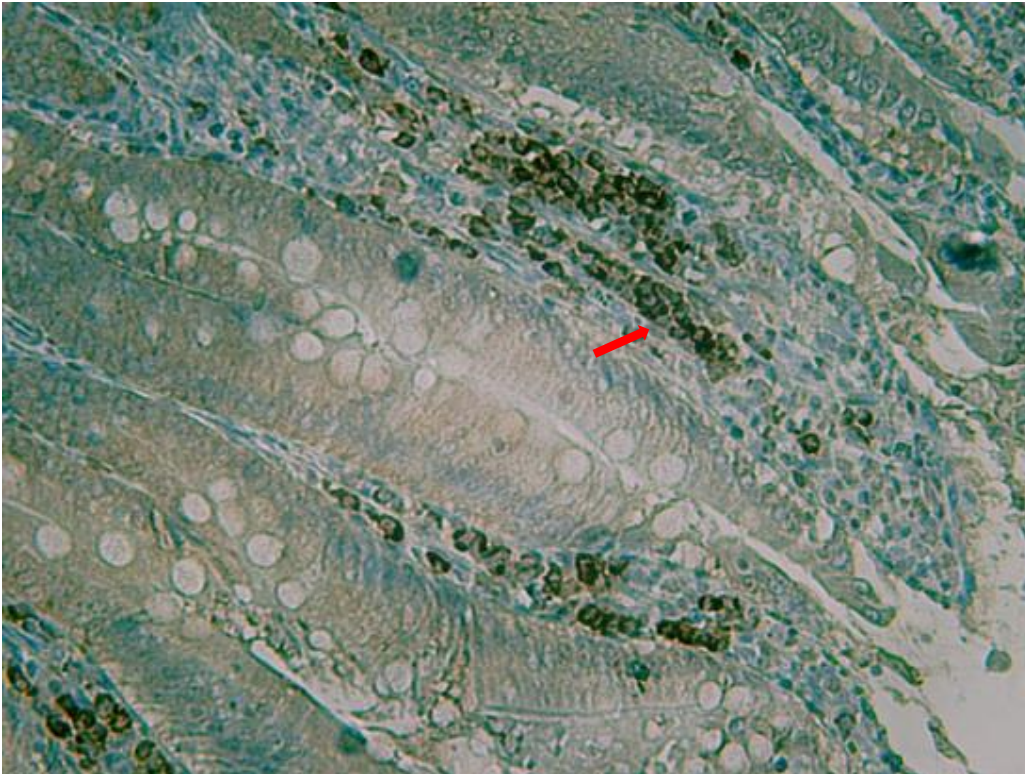
**Abb. 22:** Immunhistochemische Anfärbung von humanen Ösophagusproben mit Serotonin-Antikörpern

Probe #19. Linkes Bild H.E.-Färbung, rechtes Bild Anfärbung mit Serotonin-Antikörpern. Roter Pfeil zeigt auf die Identifizierung von Serotonin in Ösophaguszellen (Braunfärbung). Der Zelltypus konnte nicht eindeutig identifiziert werden. Details zur Bestimmung der Zelltypen befinden sich auf Seite 89, 40-fache Vergrößerung.

Diese Probe stammt von einer 39-jährigen weiblichen Patientin, bei welcher aufgrund von abdominellen Schmerzen die Indikation für eine ÖGD gestellt wurde. Hierbei zeigte sich endoskopisch eine Grad A Refluxösophagitis. Die Patientin nahm PPIs ein.

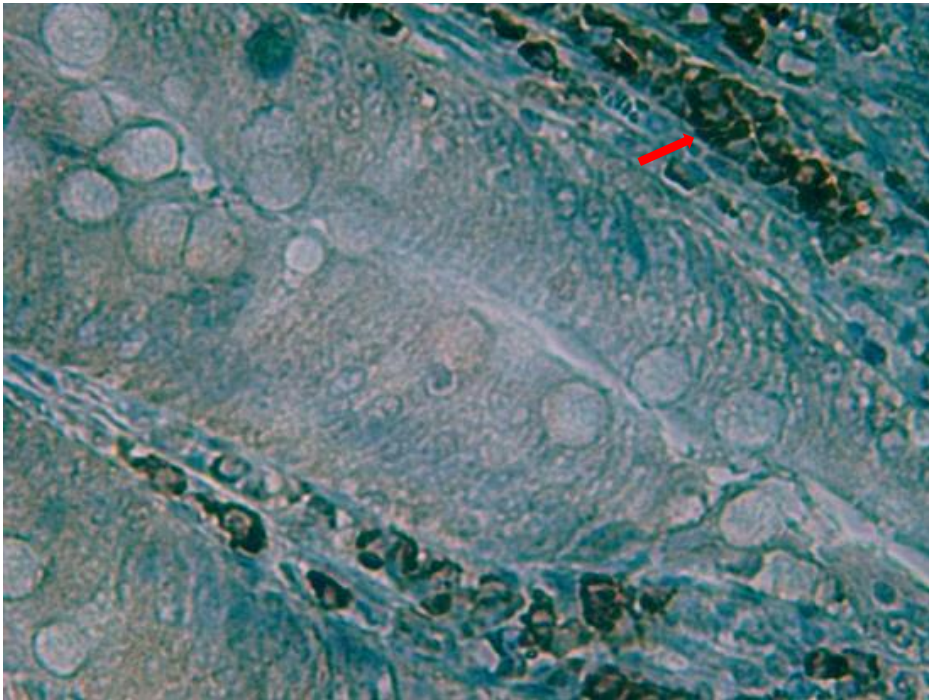
### Immunhistochemische Anfärbung mit ASIC4

Im Folgenden sind die immunhistochemischen Anfärbungen mittels ASIC4-Antikörpern dargestellt. Die Abbildungen 23 und 24 zeigen die probatorische Anwendung der ASIC4-Antikörper in Schnitten vom Rattencolon. Die Abbildungen 25 und 26 zeigen die Anfärbung mittels ASIC4-Antikörpern in humanen Ösophagusproben.



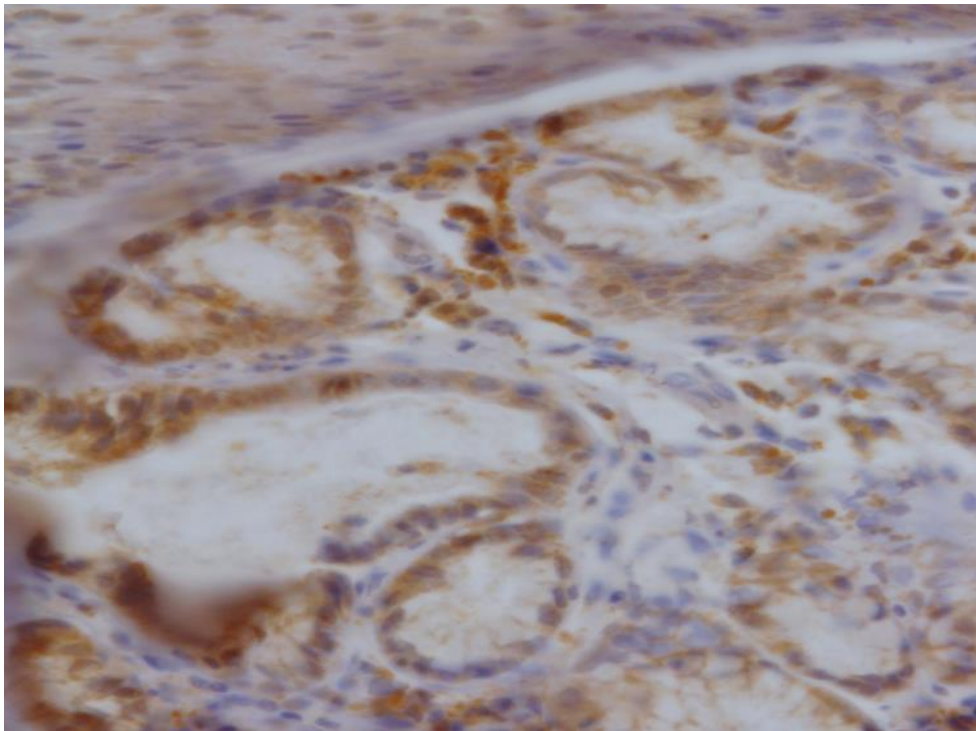
**Abb. 23:** Immunhistochemische Anfärbung mit ASIC4-Antikörpern vom Rattencolon-schnitten

Probe #6. Roter Pfeil zeigt auf die Identifizierung von ASIC4 in Zellen des Rattencolon (Dunkelbraunfärbung), 4-fache Vergrößerung.



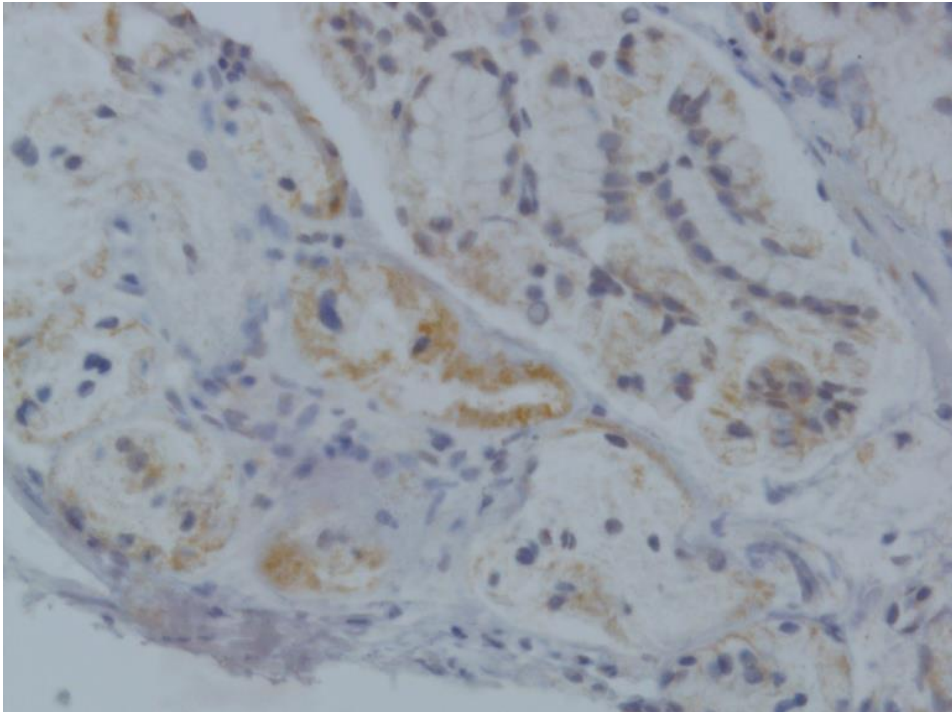
**Abb. 24:** Immunhistochemische Anfärbung mit ASIC4-Antikörpern von Rattencolon-schnitten

Probe #6. Der rote Pfeil zeigt auf einen vergrößerten Ausschnitt der in Abbildung 23 angefärbten ASIC4-positiven-Zellen, 10-fache Vergrößerung.



**Abb. 25:** Immunhistochemische Anfärbung von humanen Ösophagusproben mit ASIC4-Antikörpern

Probe #19, Verdünnung des Antikörpers 1:500. Die mit ASIC4-Antikörper angefärbten Zellen zeigen sich bräunlich. Der Zelltypus konnte nicht eindeutig identifiziert werden. Details zur Bestimmung der Zelltypen befinden sich auf Seite 89, 40-fache Vergrößerung.



**Abb. 26:** Immunhistochemische Anfärbung von humanen Ösophagusproben mit ASIC4-Antikörpern

Probe #19, Verdünnung des Antikörpers 1:1500. Die mit ASIC4-Antikörper angefärbten Zellen zeigen sich bräunlich. Der Zelltypus konnte nicht eindeutig identifiziert werden. Details zur Bestimmung der Zelltypen befinden sich auf Seite 89, 40-fache Vergrößerung.

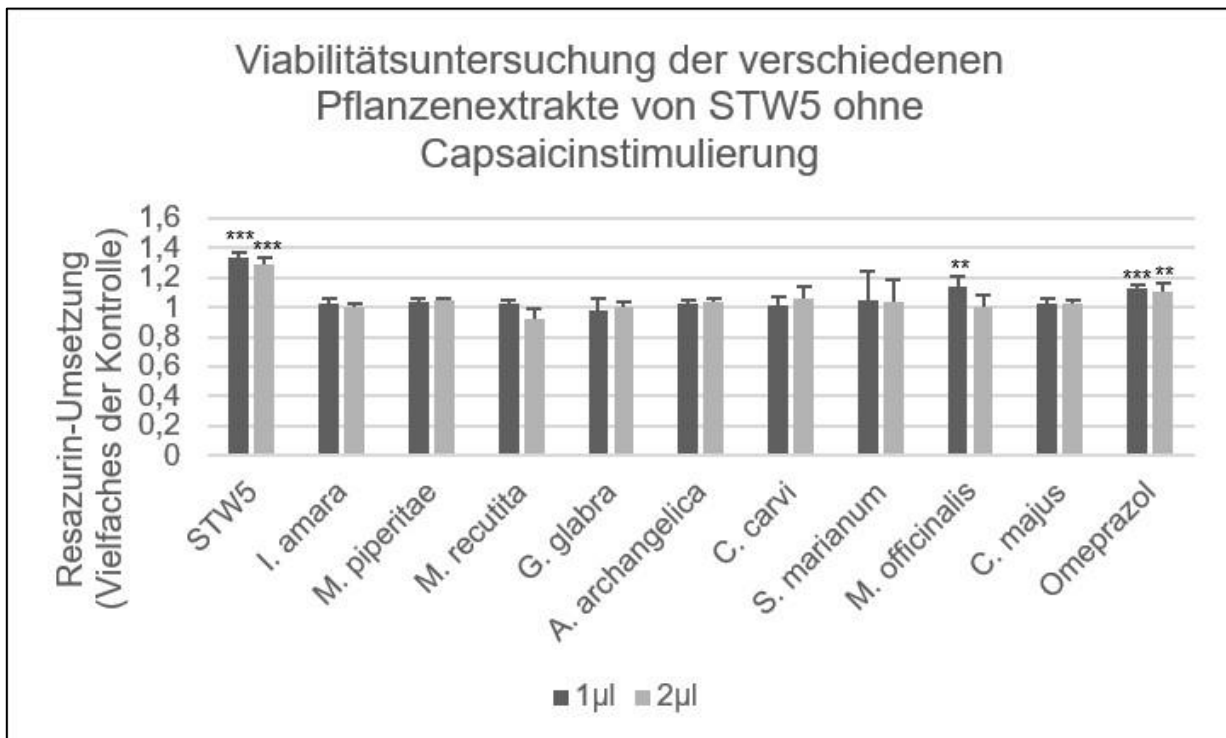
Somit konnte durch immunhistochemische Anfärbung von ASIC4 und Serotonin, dessen Existenz im ösophagealen Gewebe nachgewiesen werden. Welche Zellen speziell angefärbt wurden, also Serotonin freisetzen bzw. ASIC4 exprimieren, konnte nicht endgültig geklärt werden. Folgende Oberflächenmarker wurden getestet: S100, CD38+, CD3+, CD20+, CD68+, MUM1. Jedoch gibt der Nachweis von ASIC 4 und Serotonin im Ösophagus bereits Anlass für weitere Diskussionen.



### 3.3 Auswirkung von STW 5, dessen Einzelextrakte und Omeprazol auf *Human Intestinal Smooth Muscle Cells* (HISMC)

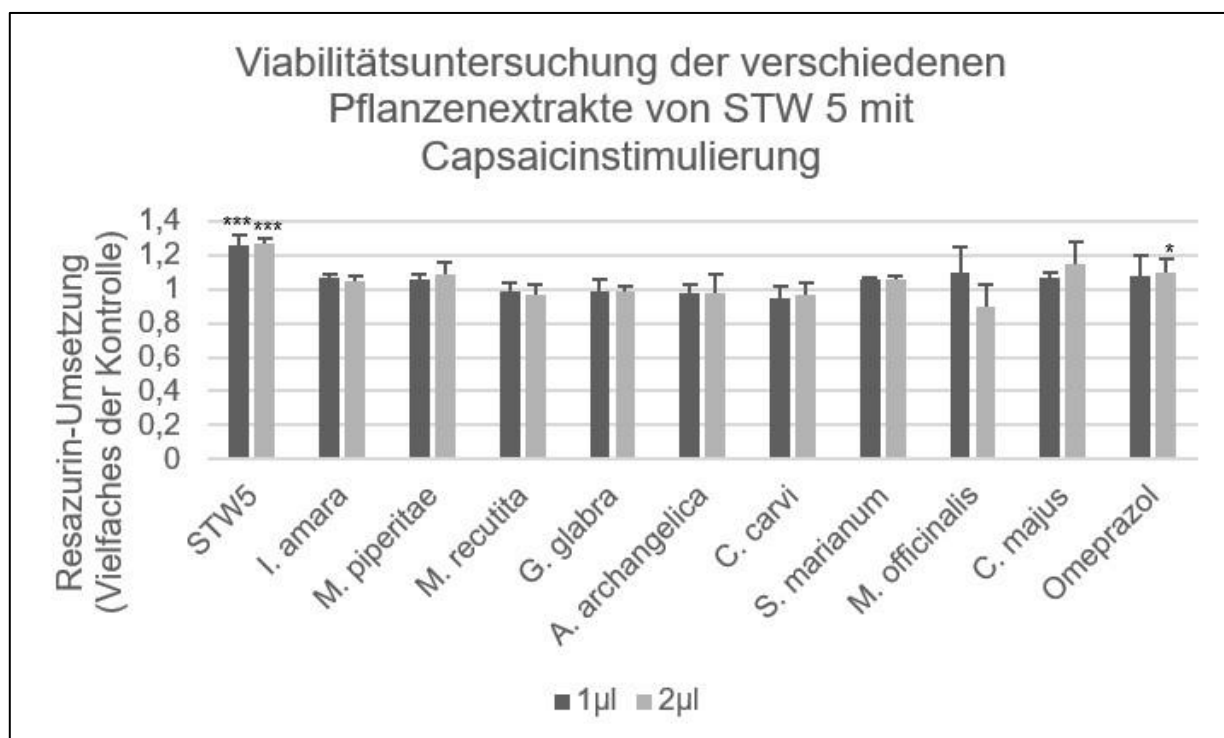
#### 3.3.1 Viabilitäts-Assay

Im Folgenden wird die prozentuale Zellproliferation (In Abbildungen 27-30 dargestellt als Vielfaches der Kontrolle) der HISMC im Vergleich zur unstimulierten Kontrollgruppe in Form von Diagrammen dargestellt.



**Abb. 27:** Die Überlebensfähigkeit (Viabilität) von HISMC bei Stimulation mit STW 5, den Einzelextrakten und Omeprazol

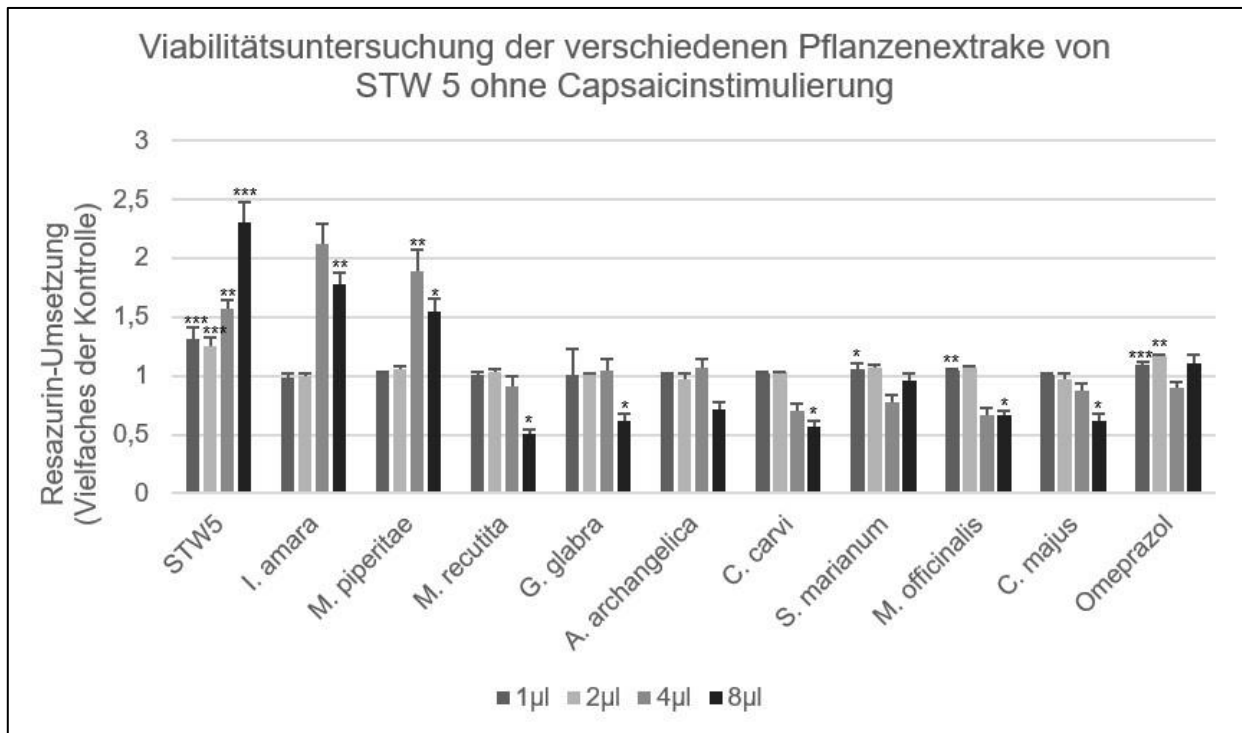
Dargestellt wird die gemessene Resazurin-Umsetzung im Vergleich zur unstimulierten Kontrollgruppe. Es wurden pro Well 10.000 Zellen mit 1 % FKS in 100 µl ausgesät und mit jeweils 1 µl/ 2 µl STW 5 stimuliert, ohne zusätzliche Capsaicin-Stimulierung. Dargestellt sind die Mittelwerte+SEM. \* $p < 0,05$ ; \*\* $p < 0,01$ ; \*\*\* $p < 0,001$ .



**Abb. 28:** Die Überlebensfähigkeit (Viabilität) von HISMC bei Stimulation mit STW 5, den Einzelextrakten und Omeprazol

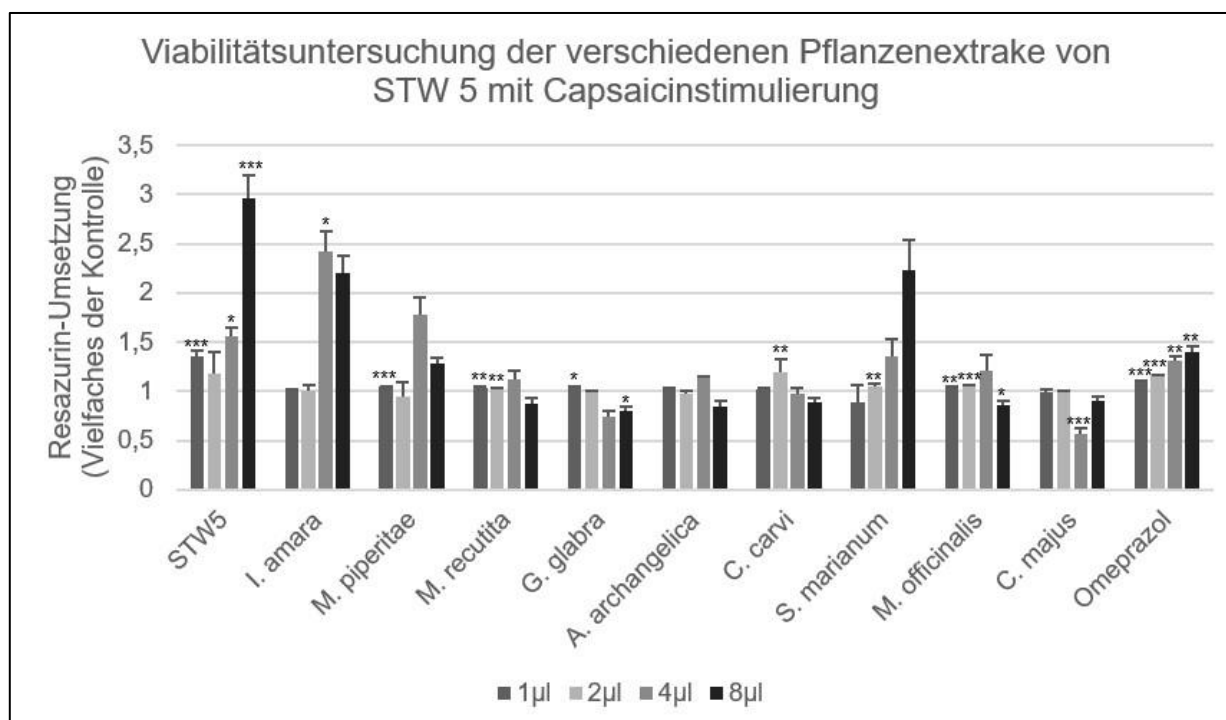
Gezeigt wird die gemessene Resazurin-Umsetzung im Vergleich zur unstimulierten Kontrollgruppe. Es wurden pro Well 10.000 Zellen mit 1 % FKS in 100 µl ausgesät und mit jeweils 1 µl/ 2 µl STW 5 stimuliert + Capsaicin-Stimulierung mit 0,5 µl pro Well. Dargestellt sind die Mittelwerte+SEM. \* $p < 0,05$ ; \*\* $p < 0,01$ ; \*\*\* $p < 0,001$ .

Die Viabilitätsuntersuchung mit 1 % FKS und 1 µl bzw. 2 µl STW 5-Stimulierung zeigt, dass trotz des niedrigen FKS-Gehalts die Zellen durch die STW 5-Stimulierung ihre Resazurin-Umsetzung statistisch signifikant steigern konnten ( $p < 0,001$ ). Dies ist auch der Fall bei der zusätzlichen Stimulierung mit 0,5 µl Capsaicin.



**Abb. 29:** Die Überlebensfähigkeit (Viabilität) von HISMC bei Stimulation mit STW 5, den Einzelextrakten und Omeprazol

Dargestellt wird die gemessene Resazurin-Umsetzung im Vergleich zur unstimulierten Kontrollgruppe. Es wurden pro Well 10.000 Zellen mit 10 % FKS in 100 µl ausgesät und mit jeweils 1 µl/ 2 µl/ 4 µl/ 8 µl stimuliert ohne Capsaicin-Stimulierung. Dargestellt sind die Mittelwerte+SEM. \* $p < 0,05$ ; \*\* $p < 0,01$ ; \*\*\* $p < 0,001$ .



**Abb. 30:** Die Überlebensfähigkeit (Viabilität) von HISMC bei Stimulation mit STW 5, den Einzelextrakten und Omeprazol

Gezeigt wird die gemessene Resazurin-Umsetzung im Vergleich zur unstimulierten Kontrollgruppe. Es wurden pro Well 10.000 Zellen mit 10 % FKS in 100 µl ausgesät und mit jeweils 1 µl/ 2 µl/ 4 µl/ 8 µl STW 5 stimuliert + Capsaicin-Stimulierung mit 0,5 µl pro Well. Dargestellt sind die Mittelwerte+SEM. \* $p < 0,05$ ; \*\* $p < 0,01$ ; \*\*\* $p < 0,001$ .

Die Viabilitätsuntersuchung mit 10 % FKS und 1 µl/ 2 µl/ 4 µl/ 8 µl STW 5 zeigt, dass STW 5 sowohl in den niedrigeren Konzentrationen (1 µl und 2 µl) als auch in den höheren Konzentrationen (4 µl und 8 µl) die Resazurin-Umsetzung in den HISMC statistisch signifikant steigert. Die höchste Steigerung war bei der Stimulierung mit 8 µl STW 5 und Capsaicin 0,5 µl zu finden und erhöhte die Resazurin-Umsetzung fast um ein dreifaches ( $p < 0,001$ ). Somit lässt sich festhalten, dass STW 5 und die neun Extrakte, sowie Omeprazol nicht zelltoxisch sind. Außerdem konnte gezeigt werden, dass Capsaicin nicht zelltoxisch ist.

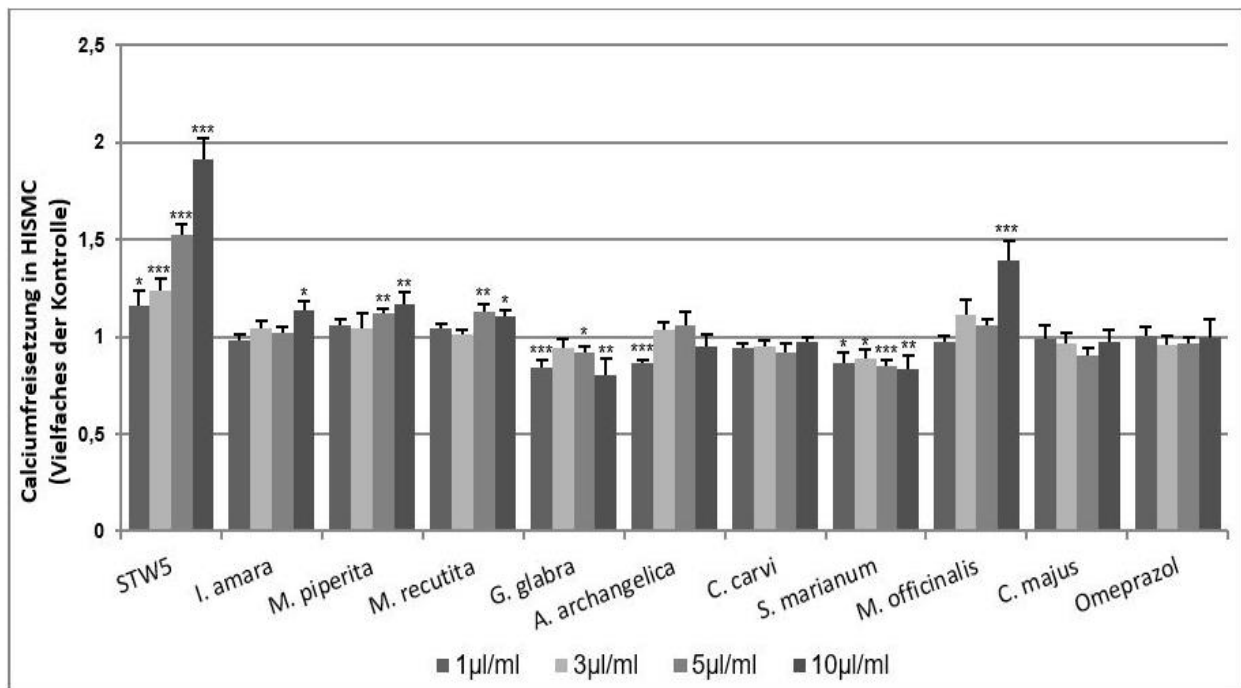
Ersichtlich wird auch, dass STW 5 in fast allen Konzentrationen die Viabilität der HISMC statistisch signifikant erhöht. Einige Einzelextrakte (*Matricaria recutita* (L.), *Glycyrrhiza glabra* (L.), *Carum carvi* (L.), *Melissa officinalis* (L.), *Chelidonium majus* (L.)) bewirkten in der höchsten Konzentration (8 µl, außer *Chelidonium majus* (L.) in Kombination mit

Capsaicin schon bei 4  $\mu\text{l}$ ) eine statistisch schwach signifikante Erniedrigung der Zellviabilität ( $p < 0,05$ ).

### 3.3.2 Calcium-Assay

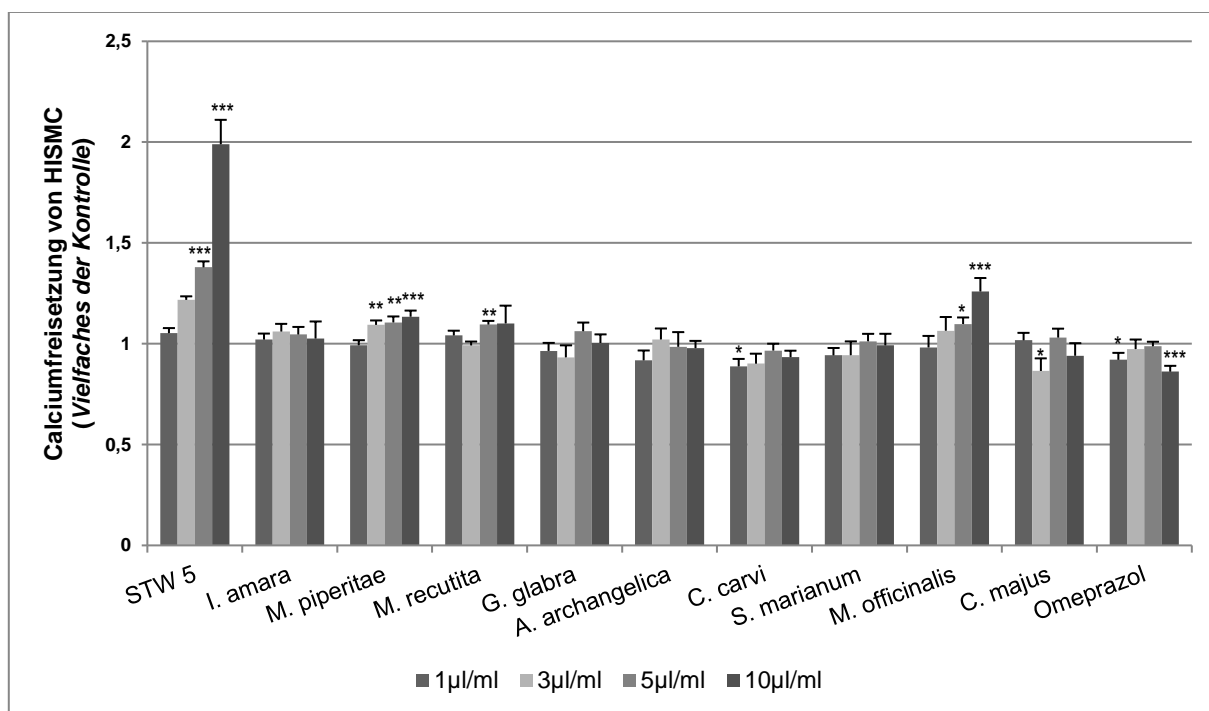
Es wurde untersucht, ob STW 5 und die Einzelnextrakte die Calciumfreisetzung *in vitro* in HISMC unter nicht-inflammatorischen und inflammatorischen Bedingungen, beeinflussen können. Eine Versuchszellzahl von 20.000 Zellen/well für die HISMC erwies sich aufgrund der Intensität des gemessenen Signals als die beste für die Versuche (Daten wurden nicht gezeigt). Das 10 % FBS-haltige Nährmedium wurde eingesetzt, da eine leichte FBS-Erhöhung zu keinem schnelleren Wachstum führte (Daten wurden nicht gezeigt). Für die Endkonzentrationen der Stimulierungslösung Capsaicin (80  $\mu\text{M}$ ) wurde letztendlich 4  $\mu\text{l}$ /well verwendet, weil sich hier die Stimulierung der Zellen am deutlichsten zeigte (Daten wurden nicht gezeigt).

Die Ergebnisse sind in Abbildung 31 und 32 dargestellt.



**Abb. 31:** Calciumfreisetzung von HISMC in Prozent im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle

HISMC wurden mit STW 5, den Einzelnextrakten von STW 5 oder Omeprazol stimuliert. STW 5 und *Melissa officinalis* (L.) rufen eine Calciumfreisetzung hervor. Jeder Datenpunkt repräsentiert drei eigenständige Experimente. Dargestellt sind die Mittelwerte+SEM. \* $p < 0,05$ ; \*\* $p < 0,01$ ; \*\*\* $p < 0,001$ .



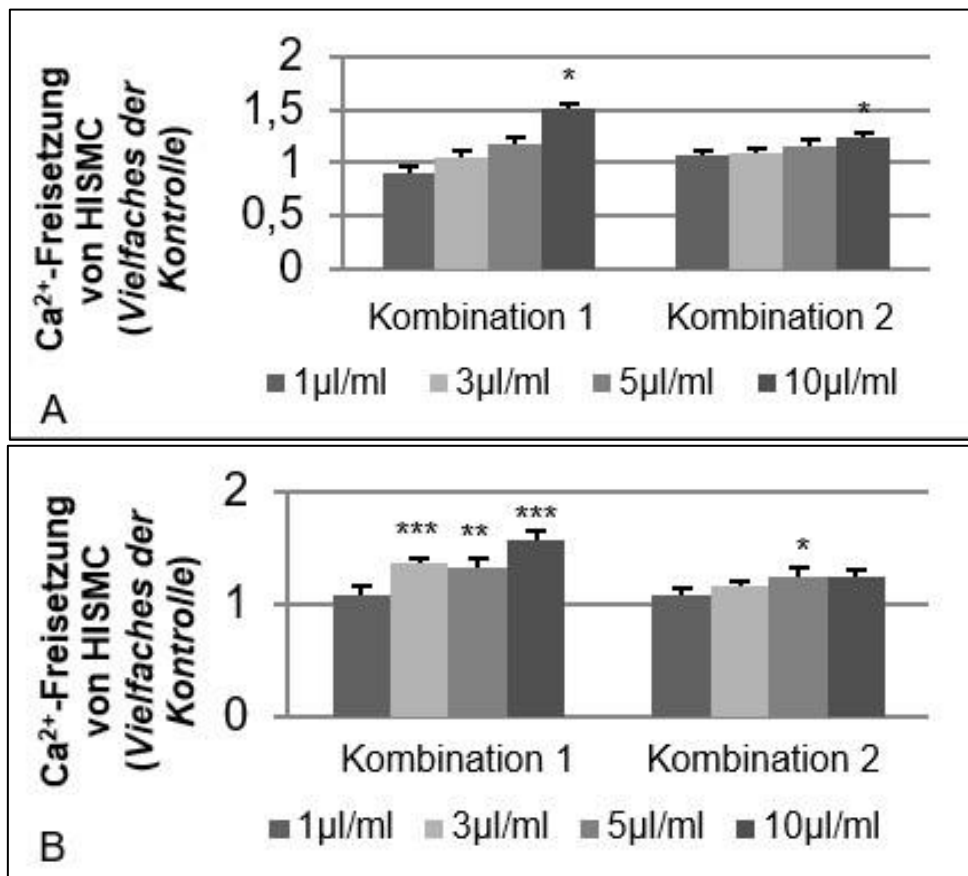
**Abb. 32:** Calciumfreisetzung von HISMC in Prozent im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle

Die Zellen wurden gleichzeitig mit Capsaicin (80 µM) und den verschiedenen Extrakten stimuliert. Jeder Datenpunkt repräsentiert drei eigenständige Experimente. Dargestellt sind die Mittelwerte+SEM. \* $p < 0,05$ ; \*\* $p < 0,01$ ; \*\*\* $p < 0,001$ .

Es konnte gezeigt werden, dass STW 5 selbst schon eine Calciumfreisetzung in den HISMC bewirkt. Bei der Stimulation ohne Capsaicin war diese 1,91-fach und mit Capsaicin sogar 1,98-fach. Der einzige Einzelextrakt, welcher eine deutliche Calciumfreisetzung induziert, war *Melissa officinalis* (L.) (Abbildung 31 und 32), obwohl dies in einem kleineren Ausmaß geschah als bei STW 5 und nur in der höchsten Konzentration, sowohl unter nicht-entzündlichen (1,39-fach) als auch unter entzündlichen (1,25-fach) Bedingungen. Alle anderen Konzentrationen zeigten keine oder statistisch nur geringe signifikanten Unterschiede.

Außerdem konnte festgestellt werden, dass für die Konzentrationen 1-5 µl/ml der Effekt von *Melissa officinalis* (L.) noch geringer ist als der Effekt von *Menthae piperitae* (L.) und *Matricaria recutita* (L.). Es konnte eine niedrige, jedoch statistisch signifikante Steigerung der Calciumfreisetzung bei *Menthae piperitae* (L.) und *Matricaria recutita* (L.) beobachtet werden. Das Gegenteil zeigte sich bei *Glycyrrhiza glabra* (L.), *Angelica archangelica* (L.) und *Sylibum marianum* (L.) (Abbildung 31 und 32). Aus diesen Gründen wurden

die Dreierkombinationen von *Menthae piperitae* (L.), *Matricaria recutita* (L.) und *Melissa officinalis* (L.) (Kombination 1) und die Kombination von *Glycyrrhiza glabra* (L.), *Angelica archangelica* (L.) und *Sylibum marianum* (L.) *gaertn* (Kombination 2) unter nicht-inflammatorischen (Abbildung 33A) und unter inflammatorischen Bedingungen (Abbildung 33B) getestet. Kombination 1 erhöhte die Calciumfreisetzung, jedoch nicht so stark wie STW 5 alleine. Verglichen mit *Melissa officinalis* (L.) alleine, war jedoch die Calciumfreisetzung der Kombination 1 leicht höher und unter inflammatorischen Bedingungen konzentrationsabhängig. Die Auswirkungen von Kombination 2 auf die Calciumfreisetzung in HISMC zeigten sich weniger stabil.

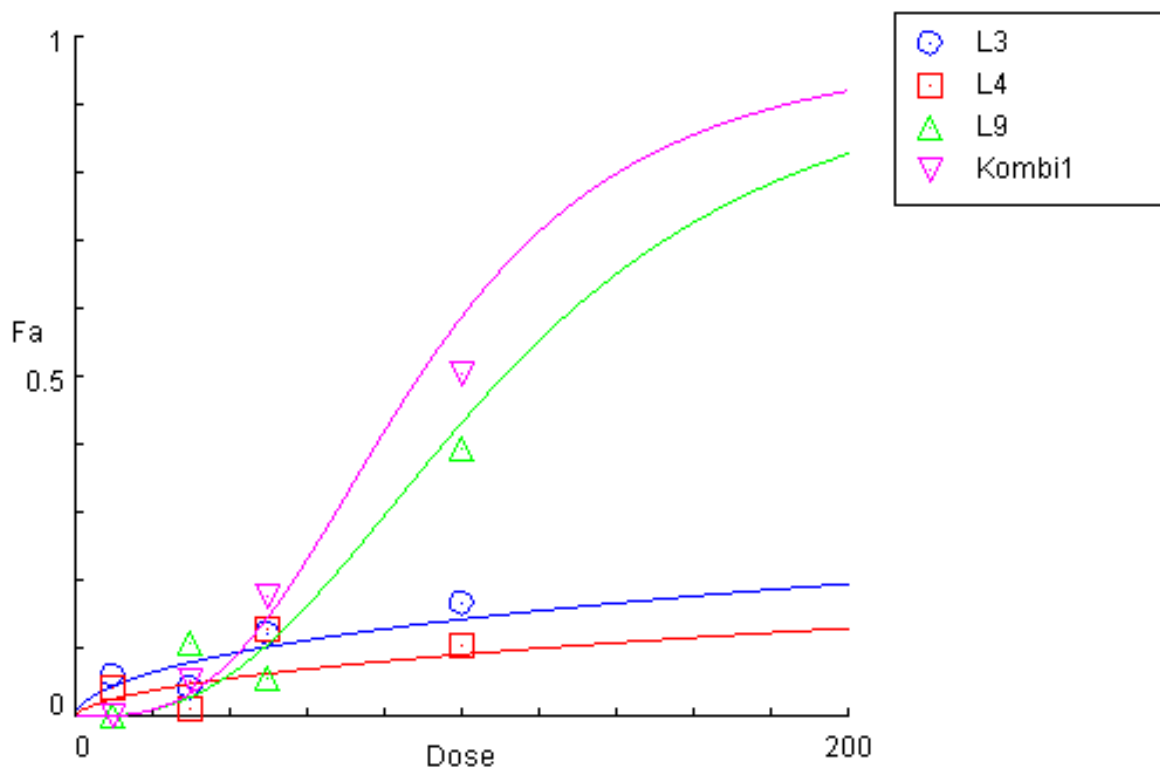


**Abb. 33:** Calciumfreisetzung von HISMC

A Die Zellen wurden mit Kombination 1 (*Menthae piperitae* (L.), *Matricaria recutita* (L.), *Melissa officinalis* (L.)) oder Kombination 2 (*Glycyrrhiza glabra* (L.), *Angelica archangelica* (L.), *Sylibum marianum* (L.) *gaertn*) allein stimuliert B mit Hinzufügen von Capsaicin (80 μM).

### 3.3.3 Synergie Quantifizierung

Im Folgenden werden die Daten der Synergie Quantifizierung graphisch dargestellt. Die Daten basieren auf Versuchen zur Calciumfreisetzung von HISMC durch Stimulation mit der Kombination 1 (*Menthae piperitae* (L.), *Matricaria recutita* (L.), *Melissa officinalis* (L.)) und der Kombination 2 (*Glycyrrhiza glabra* (L.), *Angelica archangelica* (L.), *Sylibum marianum* (L.) *gaertn*) unter nicht-inflammatorischen und inflammatorischen Bedingungen.

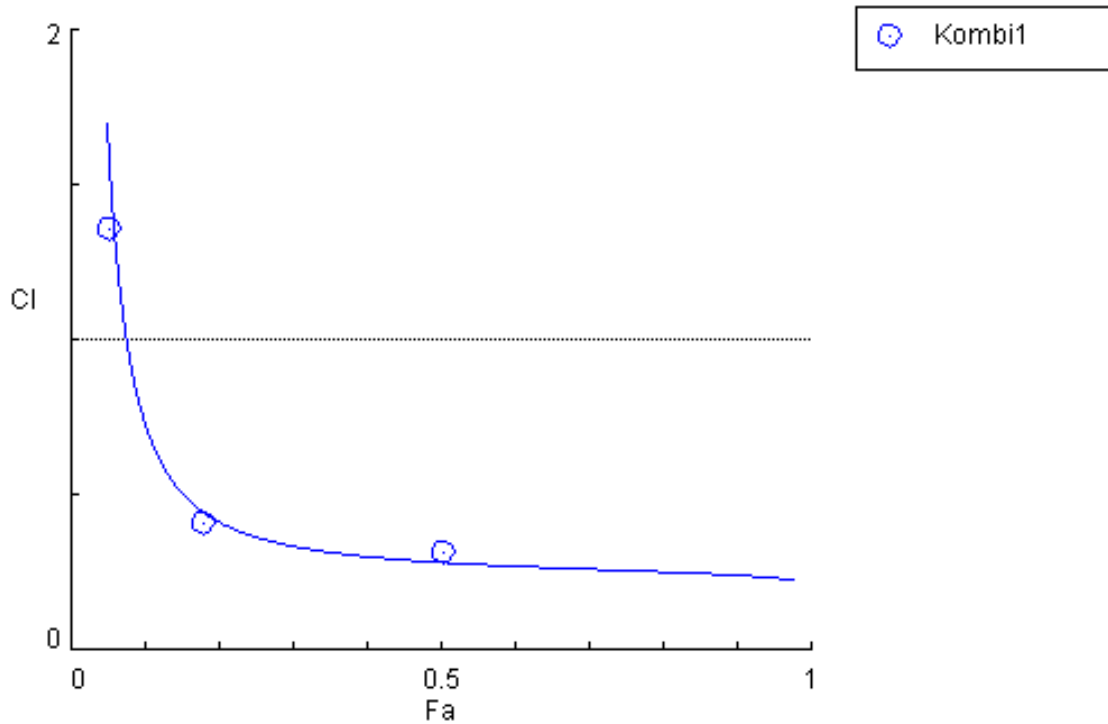


**Abb. 34:** Dosis-Effekt-Kurve der Calciumfreisetzung durch Stimulation mit Kombination 1 ohne Capsaicinstimulierung

L3: *Menthae piperitae* (L.), L4: *Matricaria recutita* (L.), L9: *Melissa officinalis* (L.), Kombi1: Kombination aus L3, L4, L9, Dose: Dosis.

Die Abbildung 34 zeigt, dass bei steigender Dosis die Calciumfreisetzung (Fa) durch *Melissa officinalis* (L.) deutlich mehr ansteigt als der Effekt von *Menthae piperitae* (L.) und *Matricaria recutita* (L.). Die Kombination der drei Pflanzen zeigt sogar einen höheren Effekt als *Melissa officinalis* (L.) allein.

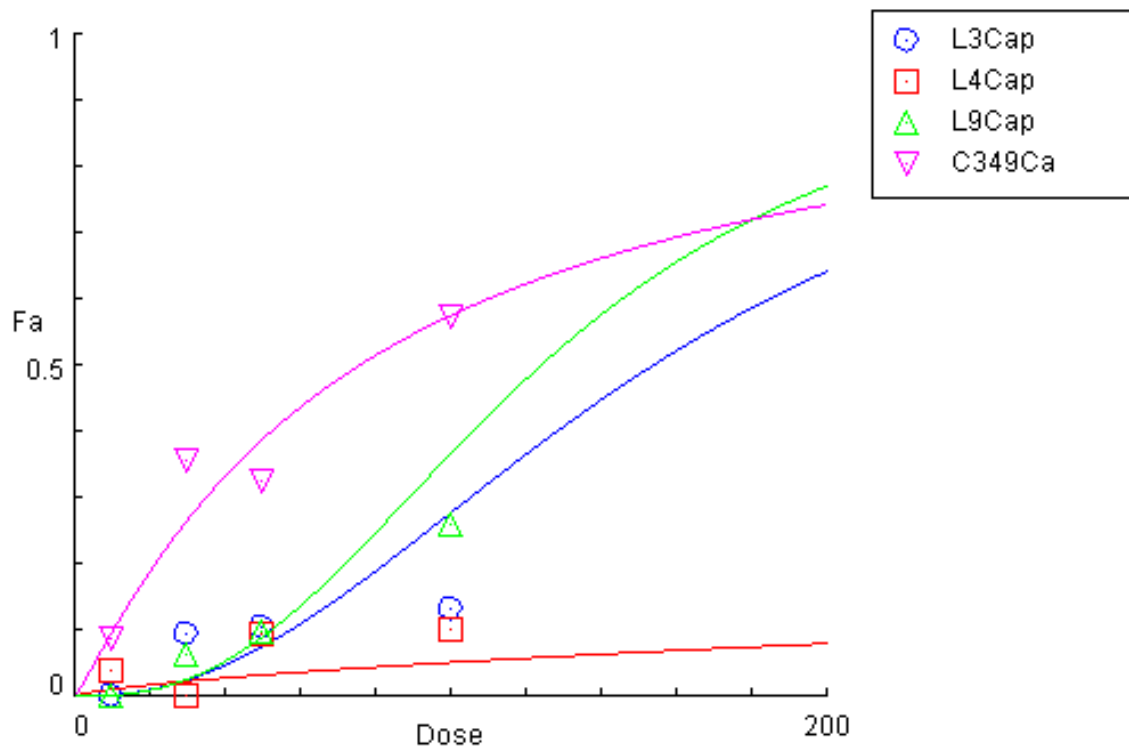




**Abb. 35:** Der Fa-CI-Plot der Calciumfreisetzung für die Stimulation mit der Kombination 1 ohne Capsaicinstimulierung

CI: Combinationsindex, Fa: fraction affected, Kombi 1: Kombination aus *Menthae piperitae* (L.), *Matricaria recutita* (L.) und *Melissa officinalis* (L.).

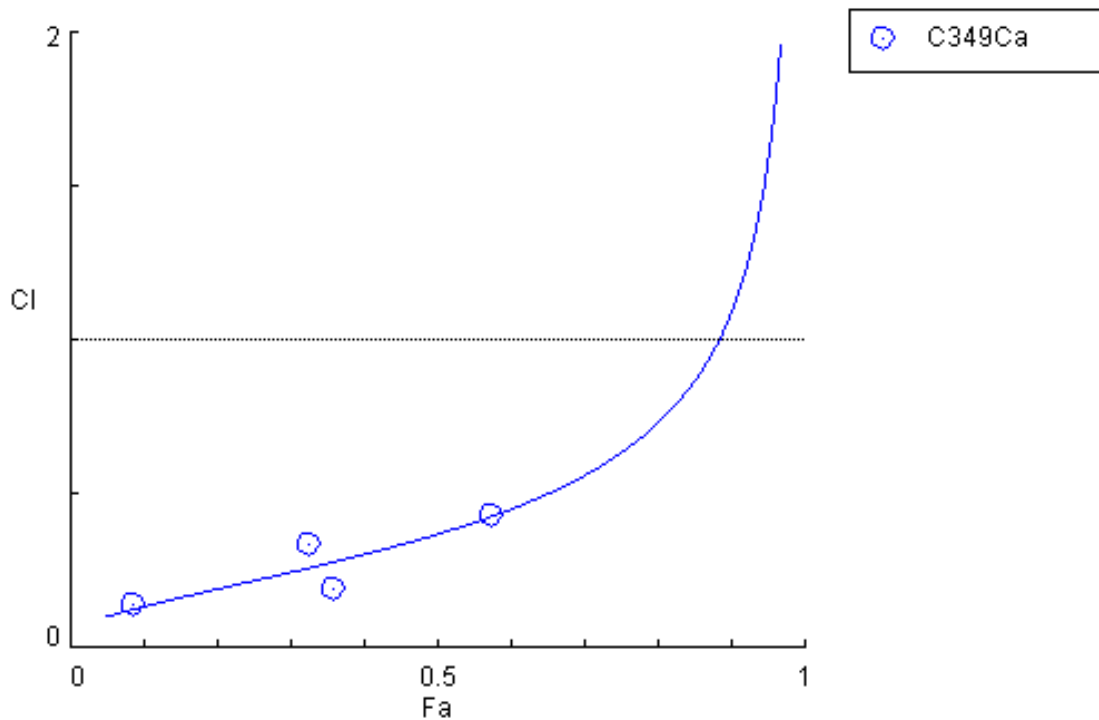
Ab einer Effektstärke von 0,1 zeigt die Stimulierung der HISMC mit der Kombination 1 durchweg synergistische Effekte (da  $CI < 1$ ) in Bezug auf die Calciumfreisetzung.



**Abb. 36:** Dosis-Effekt-Kurve der Calciumfreisetzung durch Stimulierung mit Kombination 1 mit Capsaicinstimulierung

L3Cap: *Menthae piperitae* (L.) und Capsaicin, L4Cap: *Matricaria recutita* (L.) und Capsaicin, L9Cap: *Melissa officinalis* (L.) und Capsaicin, C349Ca: Kombination aus L3, L4, L9 und Capsaicin, Dose: Dosis.

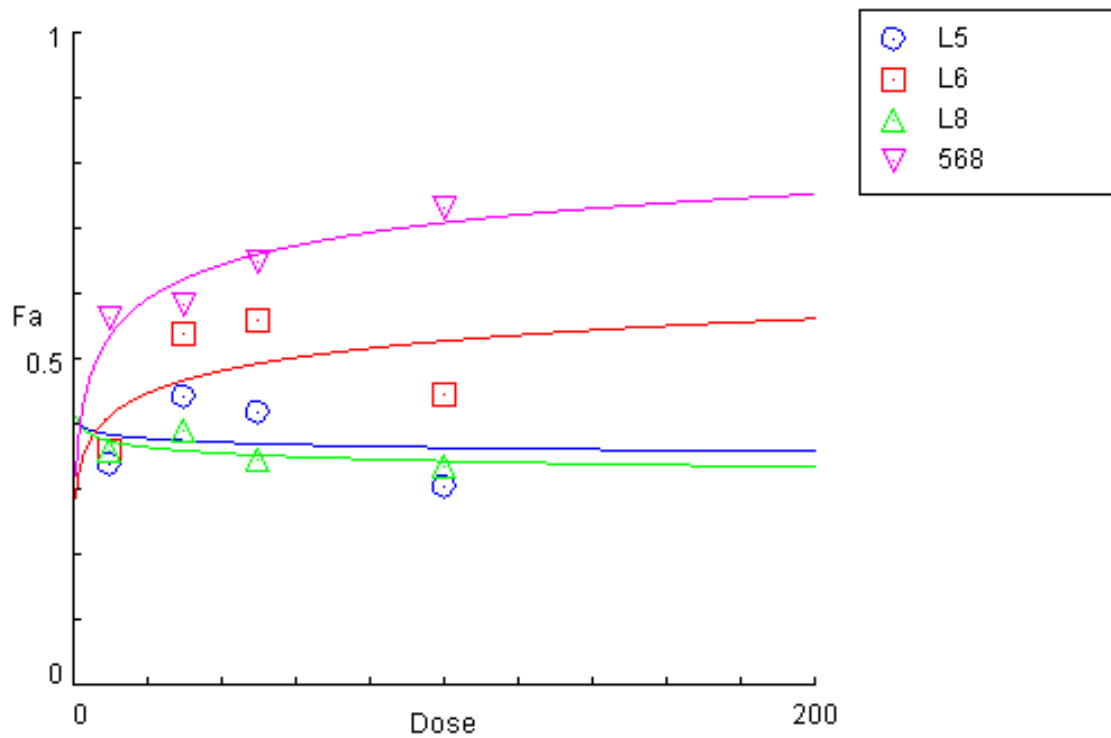
Die Abbildung 36 zeigt, dass bei steigender Dosis der Effekt (Calcium-Freisetzung) von *Melissa officinalis* (L.) mehr ansteigt als der Effekt von *Mentha piperitae* (L.) und *Matricaria recutita* (L.). Unter inflammatorischen Bedingungen ist der Effekt von *Mentha piperita* (L.) größer als unter nicht-inflammatorischen Bedingungen. Die Kombination der drei Pflanzen zeigt jedoch erneut einen höheren Effekt als *Melissa officinalis* (L.) allein.



**Abb. 37:** Der Fa-CI-Plot der Calciumfreisetzung für die Stimulation mit der Kombination 1 mit Capsaicinstimulierung

CI: Combinationsindex, Fa: fraction affected, C349Ca: Kombination aus *Menthae piperita* (L.), *Matricaria recutita* (L.) und *Melissa officinalis* (L.) und Capsaicin.

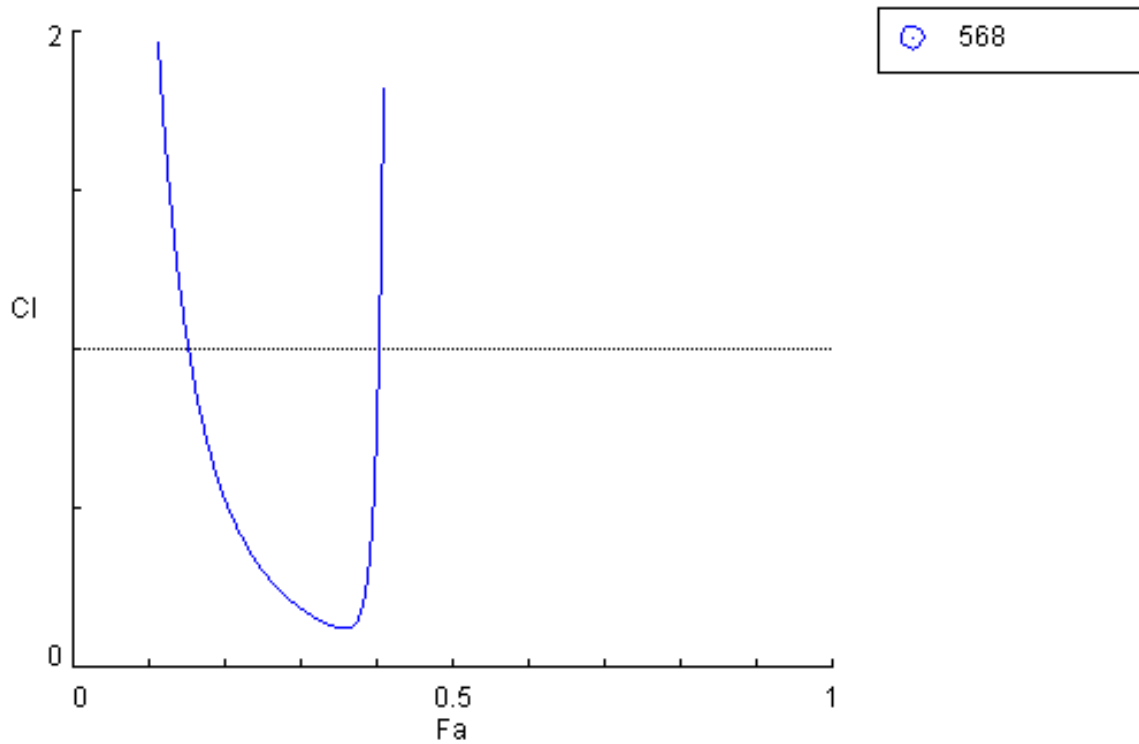
Bis zu einer Effektstärke von 0,7/0,8 zeigt die Calciumfreisetzung durch die Stimulierung der HISMC mit der Kombination 1 durchweg synergistische Effekte der drei Heilpflanzen (da  $CI < 1$ ). Die Stimulierung erfolgte unter inflammatorischen Bedingungen.



**Abb. 38:** Dosis-Effekt-Kurve der Calciumfreisetzung durch Stimulierung mit Kombination 2 ohne Capsaicinstimulierung

L5: *Glycyrrhiza glabra* (L.), L6: *Angelica archangelica* (L.), L8: *Sylibum marianum* (L.) gaertn, 568: Kombiantion aus L5, L6, L8, Dose: Dosis.

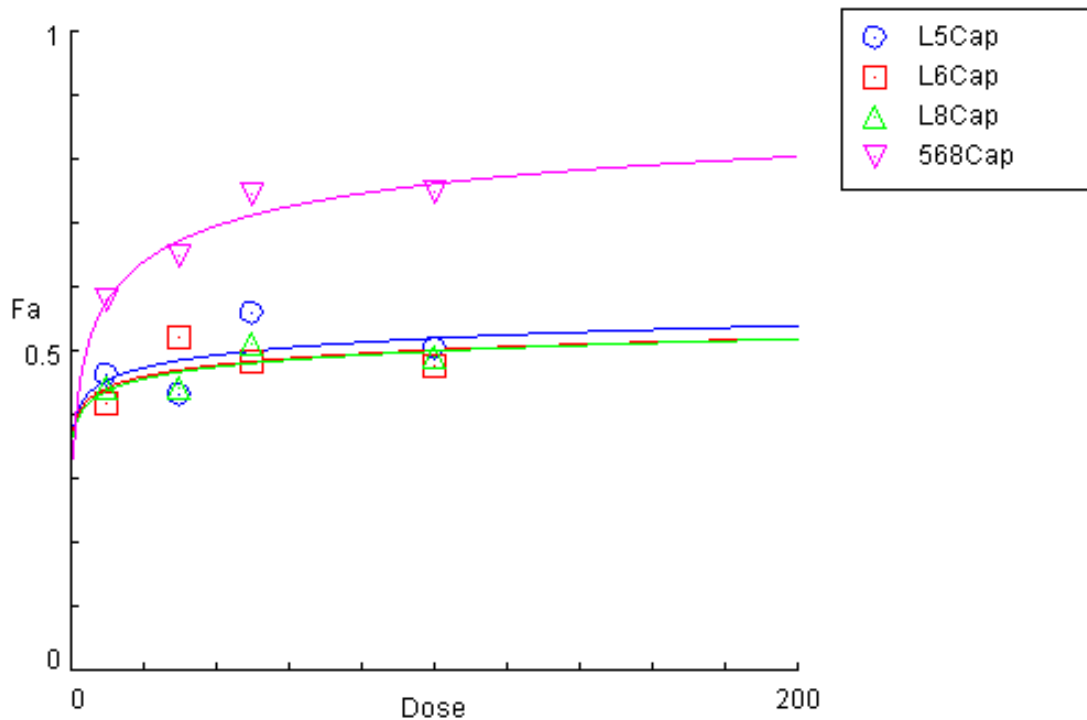
Die Abbildung 38 zeigt, dass bei steigender Dosis der Effekt (Calcium-Freisetzung) durch *Angelica archangelica* L. ansteigt. Die Kombination 2 zeigt bei steigender Dosis eine noch höhere Calcium-Freisetzung in den HISMC als *Angelica archangelica* L. allein.



**Abb. 39:** Der Fa-CI-Plot der Calciumfreisetzung für die Stimulation mit der Kombination 2 ohne Capsaicinstimulierung

CI: Combinationsindex, Fa: fraction affected, 568: Kombination aus *Glycyrrhiza glabra* (L.), *Angelica archangelica* (L.) und *Sylibum marianum* (L.) gaertn.

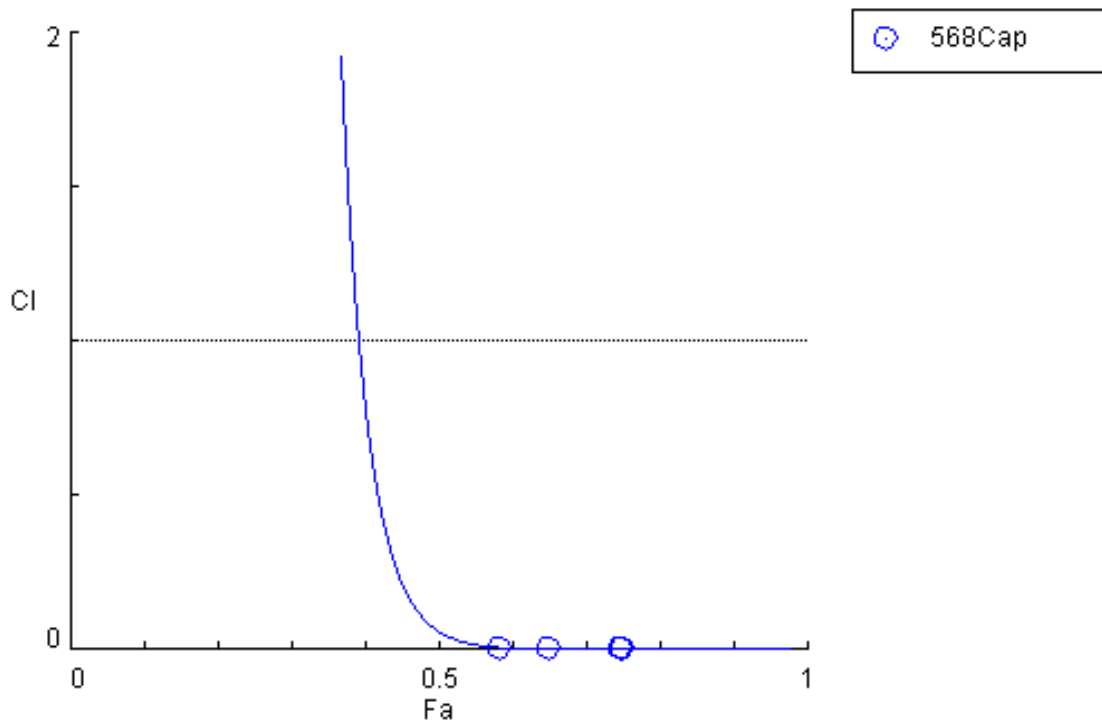
Unter nicht-inflammatorischen Bedingungen zeigt die Stimulation der HISMC mit der Kombination 2 nur in einem bestimmten Bereich (zwischen Fa 0,2-0,4) eine synergistische Wirkung ( $CI < 1$ ).



**Abb. 40:** Dosis-Effekt-Kurve der Calciumfreisetzung durch Stimulierung mit Kombination 2 mit Capsaicinstimulierung

L5Cap: *Glycyrrhiza glabra* (L.), L6Cap: *Angelica archangelica* (L.), L8Cap: *Sylibum marianum* (L.) *gaertn*, 568Cap: Kombiantion aus L5, L6, L8 und Capsaicin, Dose: Dosis.

Die Abbildung 40 zeigt, dass unter inflammatorischen Bedingungen bei steigender Dosis der Effekt der drei Heilpflanzen nach kurzem Anstieg bei einer Effektstärke von 0,5 stagniert. Der Effekt der Kombination von *Glycyrrhiza glabra* (L.), *Angelica archangelica* (L.) und *Sylibum marianum* (L.) *gaertn* steigt zunächst mit steigender Dosis an und stagniert dann auch, jedoch bei einer Effektstärke von ca. 0,75. Insgesamt zeigt die Kombination der drei Heilpflanzen einen größeren Effekt als jede Heilpflanze allein.



**Abb. 41:** Der Fa-CI-Plot der Calciumfreisetzung für die Stimulation mit der Kombination 2 mit Capsaicinstimulierung

CI: Combinationsindex, Fa: fraction affected, 568Cap: Kombination aus *Glycyrrhiza glabra* (L.), *Angelica archangelica* (L.), *Sylibum marianum* (L.) gaertn und Capsaicin.

Die Abbildung 41 veranschaulicht, dass die Kombination 2 unter Entzündungsbedingungen nur in einem sehr beschränkten Bereich (Fa 0,42-0,55) synergistische Effekte zeigt.

#### 4. Diskussion

Seit mehr als 100 Jahren existiert das Konzept, dass das Symptom Sodbrennen und eine mögliche Refluxösophagitis durch den Rückfluss von Magensäure hervorgerufen werden. Bei diesem Konzept beschädigt HCL den Ösophagus, indem es die *tight junction* Proteine des Epithels und die Zellen selbst beschädigt. Dies führt zu *dilated intercellular spaces* (DIS), wodurch die parazelluläre Permeabilität erhöht wird. Das Resultat aus DIS und dem Untergang der Epithelzellen ist, dass HCL Zugang zu sensorischen Neuronen in tieferen Schichten der Mukosa bekommt und dort an chemosensitiven Nozizeptoren Schmerz (Sodbrennen) erzeugen kann (Barlow und Orlando, 2005). Einige dieser Neurone exprimieren ASIC3 und TRPV1, Nozisenoren, die durch Säure und andere Entzündungsbotenstoffe aktiviert werden und so das Sodbrennen hervorrufen können (Huo und Souza, 2013). Gegen dieses Konzept sprechen Versuche von Miwa et al. (2013), welche zeigen, dass NERD Patient\*innen mit DIS (+) und negativer Immunanfärbung für neuronales Gewebe (PGP 9.5 (-) Marker für viszerale sensible Neurone) am therapierefraktärsten bei der PPI-Therapie waren. Ein Drittel der Patient\*innen mit einer GERD, die eine PPI-Therapie erhalten, zeigen persistierende Symptome (Souza, 2010). Hier kann eine Vermehrung der sensiblen Nervenendigungen und eine dadurch bedingte Hypersensibilität nicht für die schwache Wirkung von PPIs bei einigen Patient\*innen verantwortlich gemacht werden (Miwa et al., 2013).

Ein zusätzlicher Erklärungsansatz könnte die Entstehung von Refluxsymptomen durch Freisetzung von pro-entzündlichen Zytokinen sein. Bereits bei der Pathogenese der GERD spielen immunvermittelte Mechanismen eine wichtige Rolle (Abdel-Aziz et al., 2015b). Ösophagus-Zellen setzen eine Reihe von pro-entzündlichen Zytokinen frei, welche Rezeptoren und Signalkaskaden (CINC1-3 (IL-8), TREM1 und GPR84) aktivieren und für die Regulation des Entzündungsprozesses relevant zu sein scheinen (Abdel-Aziz et al., 2015b). In einer Studie von Fitzgerald et al. (2002) wiesen Biopsien von Refluxösophagitis- und NERD- Patient\*innen erhöhte Level des pro-entzündlichen Zytokins Interleukin-8 (IL-8) auf. Somit erhöhen Zellen ihre IL-8-Produktion, wenn sie mit Säure in Kontakt kommen (Fitzgerald et al., 2002). IL-8 wiederum erhöht die ösophageale Schleimhautpermeabilität, indem es DIS *in vitro* und *in vivo* produziert und die Expression von ASIC3 und TRPV1 (Huo und Souza, 2013). Somit könnte Sodbrennen auch ein Symptom



des Zytokin-induzierten Mukosaschadens sein. Hou und Souza et al. (2013) konstatierten bereits, dass es neben der Reduktion von Säure und Pepsin in Zukunft andere Therapieansätze für die Reduktion von Sodbrennen geben könnte und sollte. Wie genau Nozizeptoren, Säurekanäle und zytokinvermittelte Entzündung zusammenhängen und wie genau diese therapeutisch genutzt werden können sei jedoch unklar (Huo und Souza, 2013).

### **Expression von ASICs, 5-HTR-Subtypen und SERT in Rattenösophagi**

In dieser Arbeit wurde der Zusammenhang zwischen der Expression von säuresensiblen Kanälen (ASICs) und 5-HTR sowie SERT in Rattenösophagi untersucht. Dafür wurde das subchronische Rattenmodell zur Induktion der Ösophagitis (Omura et al., 1999) eingesetzt und mittels *Gen-Microarray*-Analysen die genetische Regulierung von ASICs und 5-Hydroxytryptaminrezeptorsubtypen in der entzündeten Speiseröhre und unter Behandlung untersucht. Mittels Western Blot Analysen wurden die regulierten Kanäle auf die letztendliche Proteinexpression in den Ösophagi untersucht und wie sich das Vielstoffgemisch STW 5 (0,5 oder 2 ml/kg) im Vergleich zum Protonenpumpeninhibitor Omeprazol auf diese Kanäle auswirkt. Es wurde ein PPI genutzt, da dieser als Standard-Medikament bei der GERD-Therapie verwendet wird (Kahrilas et al., 2008). Außerdem konnte gezeigt werden, dass PPIs säureunabhängige anti-entzündliche Effekte haben (Huo et al., 2014).

#### **Acid Sensing Ion Channels (ASICs)**

Die Western Blot Analyse zeigt, dass ASIC1 und ASIC2 in der Sham- Gruppe hochreguliert werden und die Kanäle in der Ösophagitisgruppe nicht reguliert oder stark herabreguliert werden. Bei ASIC1 (170 kD) ist die STW 5 (0,5 ml/kg) -Gruppe (+0,71<sup>\*\*\*</sup>) und bei ASIC2 die STW 5 2 ml/kg (+0,84<sup>\*\*\*</sup>) - und die Omeprazol-Gruppe (+0,836<sup>\*\*\*</sup>) statistisch signifikant hochreguliert. Somit werden ASIC1 und ASIC2 im nicht entzündeten Zustand exprimiert bzw. bei Entzündung herabreguliert und durch STW 5 erneut hochreguliert. Bei ASIC3 (60 kD) sind die beiden STW 5-Gruppen (0,5 ml/kg und 2 ml/kg) im Vergleich zur Ösophagitis- und zur Sham-Gruppe statistisch signifikant (-0,41<sup>\*\*\*</sup>) herabreguliert. Das zeigt, dass STW 5 die Expression von ASIC3 beeinflusst.

Verglichen mit den Daten der Genanalyse, kann bei den ASIC4-Proteinanalysen die gleiche Tendenz beobachtet werden: die erhöhte Expression des Kanals in der Ösophagitis-Gruppe fällt in den Behandlungsgruppen STW 5 (0,5 ml/kg) (60 kD: -4,1<sup>\*\*</sup>; 75 kD: -2,5<sup>\*\*</sup>),

STW 5 (2 ml/kg) (60 kD: -5,2\*\*\*; 75 kD: -6,1\*\*), Omeprazol 30 mg/kg (60 kD: -8,7 \*\*; 75 kD: -4,6\*\*) statistisch signifikant niedriger aus. Somit wird ASIC4 bei Entzündung exprimiert und durch Therapie mit STW 5 oder Omeprazol statistisch signifikant herabreguliert. ASIC4 gehört zu der *acid-sensing-ion-channel*-Familie, obwohl bis jetzt noch wenig zu seiner Funktion bekannt ist (Donier et al., 2008). Wie ASIC 1 und ASIC 2 wird ASIC4 in vielen ZNS-Regionen exprimiert (Lin et al., 2015). Es konnte gezeigt werden, dass ASIC4 an Protonen induziertem Kationenstrom durch Modulation von ASIC1a und ASIC3 beteiligt ist, was eine physiologische Rolle von ASIC4 bei der Regulierung von ASIC-Strömen bei Schmerzen vermuten lässt (Donier et al., 2008). Obwohl bis jetzt sehr wenig über diesen Kanal bekannt ist, sprechen unsere Daten dafür, dass ASIC4 eine Rolle bei der Genese der Ösophagitis einnimmt, da dieser durch Entzündung auf genetischer Ebene statistisch signifikant (+3,83\*\*\*) erhöht ist und in den Therapiegruppen (STW 5 (-4,79\*\*\*) oder Omeprazol (-4,00\*\*\*)) statistisch signifikant erniedrigt ist. Dies gilt sowohl auf genetischer Ebene als auch auf Proteinebene und kann ein Erklärungsansatz für die symptomlindernde Wirkung dieser Medikamente/Pflanzenzubereitung sein.

ASIC5 wird zwar bei den Genexpressionsdaten als Kanal aufgeführt, jedoch ist seine genaue Funktion bis jetzt unbekannt (NCIB Gene, July 2008). Unsere Daten konnten keine statistisch signifikante Genregulierung des Kanals zeigen und weitere Untersuchungen der Proteinebene wurden nicht durchgeführt.

### **5-HTR-Subtypen und SERT**

Bei den 5-HT-Rezeptoren bestätigen die Western Blot Analysen die Genanalyse vor allem bei 5-HTR2B: die Ösophagitis-Gruppe war in beiden Analysen (bei der Genanalyse sogar statistisch signifikant (+6,64\*\*\*)) erhöht und auf genetischer Ebene in den Behandlungsgruppen statistisch signifikant (STW 5 2 ml/kg: -7,92\*\*\*; Omeprazol: -3,68\*\*\*) erniedrigt. Bei den Western Blots wurden lediglich die Sham-Gruppe und die STW 5 0,5 ml/kg-Gruppe statistisch signifikant (jeweils  $p < 0,001$ ) herabreguliert. Das zeigt, dass 5-HTR2B in entzündetem Gewebe hochreguliert und durch Behandlung mit STW 5 und Omeprazol herabreguliert werden kann.

5-HTR4 konnte sowohl in humanem als auch in tierischem Ösophagusgewebe nachgewiesen werden. Außerdem wird vermutet, dass die Aktivierung des 5-HTR4 glatte Muskulatur relaxiert (Tugay et al., 2003). Die glatte Muskulatur des Ösophagus spielt eine wichtige Rolle für die Ösophagusmotilität, weshalb vermutet wird, dass die Serotonin-Signalkaskade an der Regulation der ösophagealen Motilität bei Reflux induziertem Mukosachaden beteiligt ist (Yang et al., 2012). In einem Rattenexperiment konnte außerdem gezeigt werden, dass die Reduktion der 5-HTR4 Expression die Effekte von Serotonin abschwächt und dies folglich zu Schädigung der Ösophagusschleimhaut und Ösophagitis führt (Yang et al., 2012). Da in unserem Experiment 5-HTR4 in der Ösophagitis-Gruppe auf genetischer Ebene statistisch signifikant (-3,5\*) erniedrigt ist und auf Proteinebene in der Ösophagitis-Gruppe nicht nachweisbar war, unterstützten unsere Daten die These, dass 5-HTR4 an der Pathogenese von GERD beteiligt ist. Außerdem konnte durch unsere Western Blot Analyse gezeigt werden, dass STW 5 (0,5 ml/kg) 5-HTR4 statistisch signifikant (+0,54\*\*) hochreguliert. Sodass dies vermuten lässt, dass STW 5 über eine Hochregulierung von 5-HTR4 einen protektiven Effekt auf den Ösophagus hat.

Beim Vergleich der Genexpressions- und Western Blot-Daten von 5-HTR1A, 5-HTR1B, 5-HTR1D und 5-HTR5A konnten Auffälligkeiten bei der Regulation von 5-HTR1A in der Omeprazol 30 mg/kg-Gruppe gefunden werden. Hier konnte eine Erhöhung auf genetischer Ebene (+2,6\*) und auf Proteinebene (+1,19\*\*\*) gezeigt werden. Diese Ergebnisse zeigen, dass Omeprazol die Expression des Kanals 5-HTR1A beeinflusst. 5-HTR1B wurde auf Proteinebene in der Sham- und in allen Behandlungsgruppen im Vergleich zur Entzündungsgruppe statistisch signifikant ( $p < 0,001$ ) hochreguliert. Auf genetischer Ebene zeigte sich diese Regulation nicht. Das lässt jedoch vermuten, dass der Kanal durch die Behandlung mit Omeprazol oder STW 5 nicht beeinflusst wird.

Die genetischen Daten von 5-HTR7 zeigen, dass die Expression bei Entzündung statistisch signifikant erhöht wird (+9,38\*\*\*) und in den Behandlungsgruppen erniedrigt ist (STW 5 (2 ml/kg) -15,45\*\*\*; Omeprazol 30 mg/kg -6,83\*\*\*). Es ist auch zu sehen, dass die gesteigerte Expression in der Ösophagitis-Gruppe durch die Behandlung mit Omeprazol nicht kompensiert werden konnte. Es kann also spekuliert werden, dass Serotonin unter Therapie mit einem PPI (Omeprazol) an diesen Rezeptor in Abwesenheit von Säure binden kann und dadurch Schmerz erzeugt wird. STW 5 könnte jedoch in einem solchen

Szenario eine bessere Symptomlinderung erzielen, da es den durch Entzündung hochregulierten 5-HTR7 gänzlich herabreguliert. Es konnte gezeigt werden, dass 5-HTR7 im humanen GIT (Colon) exprimiert wird (Yaakob et al., 2015) und das nicht nur in enterischen Neuronen, sondern auch in Immunzellen des lymphatischen Gewebes entlang des GIT (Iceta et al., 2009), wo 5-HTR7 wahrscheinlich eine wichtige Rolle bei der Entzündungssignalkaskade spielt (Urbina et al., 2014).

### **Zusammenhang ASICs und 5-HTR**

Bereits 1981 wurde vermutet, dass ASICs eine Schlüsselrolle bei der Nozizeption spielen (Krishtal und Pidoplichko, 1981). ASICs werden über die gesamten Schmerzleitungsbahnen exprimiert, sowohl in peripheren, als auch in zentralen Neuronen (Deval und Lingueglia, 2015). Klinische Daten unterstützen die These, dass ASICs bei Schmerzen in der Haut beteiligt sind (Steen et al., 1995; Baron und Lingueglia, 2015) und NSAR können direkt ASIC1a (Fluorbiprofen, Ibuprofen) und ASIC3 (Salicyl Säure, Aspirin, Diclofenac) inhibieren (Voilley, 2004). Es ist auch bekannt, dass Serotonin pronozizeptiv (Millan, 2002) und nicht nur ein Ligand für 5-HTR-Subtypen ist, sondern auch ein Entzündungsmediator, welcher auch ASICs aktivieren kann (Wemmie et al., 2013). Somit könnte eine Schmerzempfindung erzeugt werden, indem Serotonin in peripherem Nervengewebe ASICs aktiviert. Diese Aktivierung wäre unabhängig vom Säurereflux.

In unseren Daten zeigten sich ASIC2, 5-HTR1B und 5-HTR2A in den Behandlungsgruppen hochreguliert, sodass hier eine Bindung von Serotonin und eine Schmerzinduktion möglich wären. Gegen diese Theorie sprechen unsere Gendaten zu ASIC4, 5-HTR2A, 5-HTR2B und 5-HTR7, welche bei Einnahme von Omeprazol und STW 5 weitestgehend wenig exprimiert werden und somit Serotonin nicht an diese Kanäle binden könnte, um den Säureschmerz trotz Abwesenheit von Säure auszulösen. Bei ASIC4 zeigte sich diese Tendenz auch auf Proteinebene.

Wir können somit sehen, dass ASICs (vor allem ASIC4) in entzündeten Rattenösophagi hochreguliert und durch die Einnahme von Omeprazol oder Iberogast classic® herabreguliert wird. Eine Regulierung von ASICs und 5-HTR-Subtypen in der ösophagealen Mukosa kann eine Rolle bei der schmerzlindernden Wirkung bei PPI- und STW 5-Response spielen. Beide Rezeptortypen werden durch Entzündung und Medikamente reguliert

und scheinen ein Kommunikationsnetzwerk zu bilden, welches in die Schmerzverarbeitung in der Speiseröhre involviert zu sein scheint.

### **Humane Ösophagusproben**

Der immunhistochemische Nachweis von ASIC4 in endoskopisch unveränderten humanen Ösophagusproben legt die Vermutung nahe, dass ASIC4 ein Kanal ist, der generell im Ösophagus exprimiert wird und deshalb auch im endoskopisch normalen Ösophagus zu finden ist. Die Aufschlüsselung der klinischen Daten der ASIC4 positiven Proben (siehe Tabelle 13) führt zu folgender Interpretation. Bei den endoskopisch unauffälligen Proben hatten acht von neun Patient\*innen abdominelle Schmerzen, Reflux oder andere Symptome, die den GI-Trakt betreffen. Bei den endoskopisch veränderten Ösophagi, waren allen 15 Probenentnahmen vorherige Symptome wie abdominelle Schmerzen, Reflux und Dysphagie vorangegangen. Hier spricht nichts gegen eine Verbindung von abdominellem Schmerz, Refluxschmerz und der Präsenz von ASIC4.

Nach jetzigem Wissensstand konnte erstmalig immunhistochemisch nachgewiesen werden, dass Serotonin im endoskopisch unveränderten als auch im endoskopisch veränderten humanen Ösophagus von bis dato unbekanntem Zellen gespeichert bzw. freigesetzt wird. Im physiologischen GIT vermittelt Serotonin durch submuköse und enterische Neurone verschiedene motorische und sensorische Funktionen, welche über verschiedene 5-HT-Rezeptoren aktiviert werden. Durch Serotonin ausgelöste Reaktionen sind: Übelkeit, Erbrechen, Beeinflussung der intestinalen Sekretion und Peristaltik (Gershon, 1999). Die hier genannten, durch Serotonin hervorgerufenen Symptome, können auch bei der in dieser Arbeit untersuchten Patient\*innengruppe gefunden werden. Da Serotonin auch in endoskopisch veränderten Rattenösophagi gefunden wurde, liegt die Vermutung nahe, dass das Hormon bei Entzündungsprozessen und der Schmerzweiterleitung in der Speiseröhre beteiligt ist (Wu et al., 2016). Dies unterstützt die Hypothese von Wu et al. (2016), dass Serotonin vermutlich zur Entstehung der GERD beiträgt.

Die Auswertung der Serotonin-Daten (Tabelle 14) zeigt, dass die beiden Patient\*innen, welche trotz endoskopisch unverändertem Ösophagus, positiv in der Serotoninfärbung waren entweder eine gastrointestinale Blutung oder eine Anämie hatten. Die weiteren acht

Patient\*innen, welche endoskopisch veränderte Ösophagi aufwiesen, hatten hauptsächlich abdominale Schmerzen und Reflux als Indikationssymptome für die ÖGD. Hier lässt sich ein Zusammenhang von Serotonin mit den Symptomen der GERD vermuten.

Bei der Patient\*innengruppe welche gleichzeitig ASIC4 und Serotonin positiv war (Tabelle 15), kann zunächst festgehalten werden, dass es überhaupt Patient\*innen gab, welche gleichzeitig ASIC4 exprimieren und eine positive Serotonin-Färbung aufweisen. Vier von sechs Patient\*innen hatten trotz PPI-Einnahme Symptome. Ob jedoch Serotonin bei Patient\*innen mit Symptomen trotz PPI-Einnahme und folglich Abwesenheit von Säure an ASIC-Kanäle bindet und dadurch für die Symptome verantwortlich ist, lässt sich anhand unserer Daten nicht feststellen. Weiterhin bleibt interessant, welche Zellen im Ösophagus ASIC4 exprimieren und Serotonin speichern bzw. freisetzen. Das würde weitere Anhaltspunkte liefern, wie genau das Kommunikationsnetzwerk im MDT aussieht und welche Zellen welche Aufgaben übernehmen und welche Kanäle sie dafür auf welche Reize hin exprimieren.

### **Auswirkung von STW 5 und Einzelkomponenten auf die Calciumfreisetzung von HISMC**

Es ist bekannt, dass STW 5 im Magendarmtrakt eine regionsspezifische Wirkungsweise zeigt. Im Magen konnte eine Inhibition vom  $\text{Ca}^{2+}$ -Einstrom durch *store-operated channels* (SOC) im Magenfundus beobachtet und eine Stimulation von  $\text{Ca}^{2+}$ -Einstrom durch L-Typ-Calciumkanäle im Antrum festgestellt werden (Schemann et al., 2006). Im unteren Ösophagussphinkter konnte eine anspannende Wirkung, ausgelöst durch die Wirkung von STW 5 an L-Typ-Calciumkanälen *in vitro* identifiziert werden (Schemann et al., 2008).

In unseren Daten bewirkte das Vielstoffgemisch STW 5 die höchste Calciumfreisetzung in HISMC (+1,91\*\*\*; mit Capsaicin-Stimulierung +1,98\*\*\*). Das bestätigt die bestehende Datenlage zur Wirkung von STW 5 auf die Motilität im GIT. In einigen Bereichen des MDT hat STW 5 eine tonisierende Wirkung und könnte dadurch den Rückfluss von Magensäure in den Ösophagus verhindern. Bei den Einzelnextrakten war *Melissa officinalis* (L.) der Pflanzenextrakt, welcher, wie STW 5, eine deutliche Calciumfreisetzung induzierte. Daten von Abdel-Aziz et al. (2017) (siehe Abbildung 6) zeigen, dass *Melissa officinalis* (L.) und

*Chelidonium majus* (L.) einen starken Effekt auf die (Antrum) Kontraktilität haben. Im Histogramm Teil B (siehe Abbildung 6) sind die Eigenschaften der Einzelextrakte von STW 5 in Bezug auf die Darmmotilität zusammengefasst. Hier spielen *Chelidonium majus* (L.) und auch *Melissa officinalis* (L.) eine untergeordnete Rolle. Laut der Studie von Abdel-Aziz et al. (2017) haben *Iberis amara* (L.) und *Carum carvi* (L.) einen stärkeren tonisierenden Effekt auf die Darmmuskulatur, was jedoch bei unseren Daten lediglich für *Iberis amara* (L.) (10 µl/ml, ohne Capsaicinstimulierung) mit einer 1,13-fachen Steigerung ( $p < 0,05$ ) wiederzufinden war.

Durch die Stimulierung der HISMC durch eine Kombination von drei Einzelextrakten konnte gezeigt werden, dass *Melissa officinalis* (L.) in Kombination mit *Menthae piperitae* (L.) und *Matricaria recutita* (L.) (Kombination 1) die Calciumfreisetzung von HISMC besonders unter Entzündungsbedingungen erhöht. Das weist auf eine entzündungshemmende Funktion der Kombination von *Melissa officinalis* (L.), *Menthae piperitae* (L.) und *Matricaria recutita* (L.) hin. Die Calciumfreisetzung durch diese drei Einzelextrakte scheint bereits einen großen Anteil an der Gesamtcalciumfreisetzung bei STW 5 zu haben. Durch die Synergie Quantifizierung konnte außerdem gezeigt werden, dass es sich bei der Stimulierung der HISMC mit der Kombination 1 unter nicht-inflammatorischen Bedingungen (ab einer Effektstärke von 0,1) um synergistische Effekte ( $CI < 1$ ) bei der Calciumfreisetzung in HISMC handelt (siehe Abbildung 35). Unter Entzündungsbedingungen zeigte die Calciumfreisetzung durch die Stimulierung der HISMC mit der Kombination 1 bis zu einer Effektstärke von 0,7/0,8 synergistische Effekte ( $CI < 1$ ) (siehe Abbildung 37).

Somit unterstützen die Daten zu STW 5 und den Einzelextrakten den Ansatz des Multi-target-Effekts von STW 5, indem gezeigt werden konnte, dass STW 5 allein und auch die Kombination von *Melissa officinalis* (L.), *Menthae piperitae* (L.) und *Matricaria recutita* (L.) eine statistisch signifikante ( $p < 0,001$ ) Steigerung der Calciumfreisetzung in HISMCs hervorrufen konnte. Omeprazol hingegen zeigte keinen statistisch signifikanten Einfluss auf die Calciumfreisetzung in HISMC.

### **Methodische Limitationen**

Es wurden nicht alle möglichen Kombinationen der neun Pflanzenextrakte für die Calciumfreisetzung in HISMC getestet. Es besteht die Möglichkeit, dass Vierer-, Fünfer- oder höhere Kombinationen zu anderen Ergebnissen führen. Außerdem wurden keine unterschiedlichen Dosisverhältnisse der Einzelkomponenten von STW 5 getestet, da STW 5 eine festgelegte Kombination ist.

Es wurden keine Western Blot Analysen zu ASIC5 durchgeführt. Es wurden nicht alle in den Western Blot Analysen untersuchten Kanäle und Rezeptoren auch immunhistochemisch an humanen Ösophagusschnitten überprüft. Es wurden verschiedene Oberflächenmarker (s. Seite 67) getestet, um herauszufinden, welche Zellen im humanen Ösophagus ASIC4 und Serotonin exprimieren bzw. freisetzen und welche Zellen sich im Rattencolon anfärben ließen. Dies war jedoch bis jetzt ohne Erfolg. Ob die Expression der ASIC4 in nachweisbarem Zusammenhang mit den GERD-Symptomen trotz PPI-Einnahme steht, bedarf weiterer Untersuchungen. Um genauere Zusammenhänge zwischen Symptomen, PPI-Einnahme und Expression von ASIC4 bzw. Ausschüttung von Serotonin im Ösophagus festzustellen wird ein größeres Patient\*innenkollektiv benötigt.



## 5. Zusammenfassung

Ein Drittel der Patient\*innen mit gastroösophagealer Refluxkrankheit unter Protonenpumpenhemmer-Therapie weisen persistierende Symptome auf. In dieser Arbeit wurden in vitro und ex vivo Untersuchungen an Ratten- und menschlichem Gewebe durchgeführt, um die Beteiligung der Darm-Hirn-Achse an diesem Phänomen zu untersuchen, insbesondere das Kommunikationsnetzwerk säuresensibler Kanäle mit dem Serotoninsystem und die Rolle von Calciumflüssen in humanen intestinalen glatten Muskelzellen. Untersuchungen wurden an Ratten- und an humanen Ösophagi sowie an humanen intestinalen glatten Muskelzellen durchgeführt, unbehandelt oder behandelt mit dem Protonenpumpenhemmer Omeprazol bzw. dem pflanzlichen Präparat STW 5.

Die säuresensiblen Kanäle ASIC1 und ASIC2 waren unter physiologischen Bedingungen im untersuchten Rattenmodell aktiv, aber in der entzündeten Mukosa erniedrigt und blieben unbeeinflusst durch Protonenpumpenhemmer oder STW 5. ASIC3 und ASIC4 zeigten unterschiedliche Reaktionen auf STW 5 und Omeprazol. STW 5 reduzierte die Gen- und Proteinexpression von ASIC3 und führte zu weniger (Ratten-) Mukosaschäden. ASIC4 wurde im entzündeten Rattenösophagus nachgewiesen und durch STW 5 und Omeprazol auf Gen- (4,79-fach<sup>\*\*\*</sup>) wie auch auf Proteinebene (60 kD: -5,2-fach<sup>\*\*\*</sup>; 75 kD: 6,1-fach<sup>\*\*</sup>) statistisch signifikant erniedrigt. Hiermit gelang erstmalig der Nachweis einer gemeinsamen Regulierung von ASIC3 und ASIC4 unter physiologischen und entzündlichen Bedingungen. Die Rolle von ASIC4 in der Ösophagusschleimhaut bleibt jedoch bis dato unklar.

Die Genexpression des Serotoninrezeptors-2B war in der entzündeten Mukosa erhöht (+6,64-fach<sup>\*\*\*</sup>) und wurde durch STW 5 (-7,92-fach<sup>\*\*\*</sup>) und Omeprazol (-3,68-fach<sup>\*\*\*</sup>) reduziert, während 5-HTR4 in der Ösophagitis-Gruppe erniedrigt (-3,5-fach<sup>\*</sup>) und in den Behandlungsgruppen nicht nachweisbar war. Eine STW 5-Behandlung erhöhte die Expression von 5-HTR4 in der Mukosa (+0,54-fach<sup>\*\*</sup>), was auf einen motilitätsfördernden und damit protektiven Effekt auf den Ösophagus hinweisen könnte. 5-HTR1B wurde während der Entzündung geringfügig exprimiert, war jedoch in der Sham- sowie in allen Behandlungsgruppen statistisch signifikant erhöht. Die Genexpression von 5-HTR7 war in der entzündeten Mukosa statistisch signifikant (+9,38-fach<sup>\*\*\*</sup>) erhöht und in den Behandlungsgruppen statistisch signifikant erniedrigt (STW 5: 2 ml/kg -15,45-fach<sup>\*\*\*</sup>, Omeprazol:

6,83-fach<sup>\*\*\*</sup>), jedoch durch Omeprazol nicht so stark wie durch STW 5. Auf Proteinebene zeigte sich die gleiche Tendenz, jedoch ohne statistische Signifikanz. Dies eröffnet die Hypothese, dass Serotonin unter einer Protonenpumpenhemmer-Therapie an diesen Rezeptor in Abwesenheit von Säure bindet und dadurch weiter Schmerz erzeugt wird. STW 5 könnte hier eine bessere Symptomlinderung erzielen, da es den durch Entzündung erhöhten 5-HTR7 gänzlich herabreguliert. Somit könnte der 5-HTR7 eine Rolle bei Refluxschmerzen in Abwesenheit von Säure spielen und sollte weiter untersucht werden. Serotonin ist ein Ligand für ASICs. Basierend auf unseren Ergebnissen lässt sich spekulieren, dass Serotonin durch Bindung an ASIC3 und 4 in peripherem Nervengewebe Schmerzempfindungen unabhängig vom Säurereflux erzeugt.

ASIC4 konnte im humanen, nicht entzündeten Ösophagusgewebe sowie in Ösophagusproben von Patient\*innen mit abdominellen Schmerz und Refluxschmerz nachgewiesen werden. Auch wenn ASIC4 in diesen Proben nicht untersucht wurde, widersprechen die Ergebnisse der Hypothese einer Verbindung zwischen der Präsenz von ASIC4 und der Schmerzempfindung nicht.

Nach aktuellem Wissensstand konnte erstmalig immunhistochemisch nachgewiesen werden, dass Serotonin im veränderten und unveränderten Ösophagus von bis dato unbekanntem Zellen gespeichert bzw. freigesetzt wird. Hier sollte weiter untersucht werden, welche Zellen im Ösophagus ASIC4 exprimieren und Serotonin speichern bzw. freisetzen.

STW 5 und der Einzelextrakt *Melissa officinalis* (L.) erzielten eine deutliche Calciumfreisetzung in den humanen intestinalen glatten Muskelzellen, wobei die Kombination von *Melissa officinalis* (L.), *Menthae piperitae* (L.) und *Matricaria recutita* (L.) einen synergistischen Effekt (Combinationsindex<1) zeigte.

## 6. Abbildungsverzeichnis

|  |    |
|--|----|
| <b>Abb. 1:</b> Das Spektrum der GERD.....  | 13 |
| <b>Abb. 2:</b> Prävalenz der wöchentlichen gastroösophagealen Reflux-Symptome weltweit   | 14 |
| <b>Abb. 3:</b> Managementalgorithmus zur Abklärung und Therapie typischer Refluxbeschwerden.....   | 22 |
| <b>Abb. 4:</b> Struktur der <i>acid-sensing ionic channels</i> .....   | 25 |
| <b>Abb. 5:</b> Überblick über Ionenkanal Untereinheiten und Rezeptoren.....  | 28 |
| <b>Abb. 6:</b> Beitrag von Einzelnextrakten von STW 5 zur Multitargetaktivität bei verschiedenen Pathomechanismen bei (A) funktioneller Dyspepsie und (B) Reizdarmsyndrom.....   | 37 |
| <b>Abb. 7:</b> Isobole für keine Interaktion, Synergismus und Antagonismus.....  | 40 |
| <b>Abb. 8:</b> Versuchsaufbau des subchronischen Rattenmodells .....   | 55 |
| <b>Abb. 9:</b> Darstellung des subchronischen Rattenmodells zur Induktion der Ösophagitis  | 57 |
| <b>Abb. 10:</b> ASIC3-Expression in Rattenösophagi in der Sham-Gruppe.....   | 71 |
| <b>Abb. 11:</b> ASIC4-Expression in Rattenösophagi in der Entzündungs-Gruppe.....  | 71 |
| <b>Abb. 12:</b> ASIC4-Expression in Rattenösophagi in der Sham-Gruppe und nach der Behandlung mit STW 5 .....  | 72 |
| <b>Abb. 13:</b> Die Expression von ASICs in Rattenösophagi in verschiedenen Versuchsgruppen (I= Entzündung (Ösophagitis), S= Sham, STW 5 (0,5 ml/kg), STW 5 (2 ml/kg), O= Omeprazol 30 mg/kg).....                     | 72 |
| <b>Abb. 14:</b> 5-HTR1B-Expression in Rattenösophagi nach der Behandlung mit STW 5....   | 73 |
| <b>Abb. 15:</b> 5-HTR2B- Expression in Rattenösophagi nach der Behandlung mit STW 5...   | 74 |
| <b>Abb. 16:</b> Die Expression von 5-HT-Rezeptoren in Rattenösophagi in verschiedenen Versuchsgruppen (I= Entzündung (Ösophagitis), S= Sham, STW 5 (0,5 ml/kg), STW 5 (2 ml/kg), O= Omeprazol 30 mg/kg).....           | 74 |
| <b>Abb. 17:</b> Die Expression von 5-HT-Rezeptoren und SERT in Rattenösophagi in verschiedenen Versuchsgruppen (I= Entzündung (Ösophagitis), S= Sham, STW 5 (0,5 ml/kg), STW 5 (2 ml/kg), O= Omeprazol 30 mg/kg) ..... | 75 |
| <b>Abb. 18:</b> Die Expression von 5-HT-Rezeptoren und SERT in Rattenösophagi in verschiedenen Versuchsgruppen (I= Entzündung (Ösophagitis), S= Sham, STW 5 (0,5 ml/kg), STW 5 (2 ml/kg), O= Omeprazol 30 mg/kg) ..... | 76 |

|   |    |
|---|----|
| <b>Abb. 19:</b> Immunhistochemische Anfärbung von Rattencolon mit Serotonin-Antikörpern .....                                     | 83 |
| <b>Abb. 20:</b> Immunhistochemische Anfärbung von humanen Ösophagusproben mit Serotonin-Antikörpern .....                         | 84 |
| <b>Abb. 21:</b> Immunhistochemische Anfärbung von humanen Ösophagusproben mit Serotonin-Antikörpern .....                         | 84 |
| <b>Abb. 22:</b> Immunhistochemische Anfärbung von humanen Ösophagusproben mit Serotonin-Antikörpern .....                         | 85 |
| <b>Abb. 23:</b> Immunhistochemische Anfärbung mit ASIC4-Antikörpern vom Rattencolonschnitten.....                                 | 86 |
| <b>Abb. 24:</b> Immunhistochemische Anfärbung mit ASIC4-Antikörpern von Rattencolonschnitten.....                                 | 87 |
| <b>Abb. 25:</b> Immunhistochemische Anfärbung von humanen Ösophagusproben mit ASIC4-Antikörpern.....                              | 87 |
| <b>Abb. 26:</b> Immunhistochemische Anfärbung von humanen Ösophagusproben mit ASIC4-Antikörpern.....                              | 88 |
| <b>Abb. 27:</b> Die Überlebensfähigkeit (Viabilität) von HISMC bei Stimulation mit STW 5, den Einzelextrakten und Omeprazol ..... | 89 |
| <b>Abb. 28:</b> Die Überlebensfähigkeit (Viabilität) von HISMC bei Stimulation mit STW 5, den Einzelextrakten und Omeprazol ..... | 90 |
| <b>Abb. 29:</b> Die Überlebensfähigkeit (Viabilität) von HISMC bei Stimulation mit STW 5, den Einzelextrakten und Omeprazol ..... | 91 |
| <b>Abb. 30:</b> Die Überlebensfähigkeit (Viabilität) von HISMC bei Stimulation mit STW 5, den Einzelextrakten und Omeprazol ..... | 92 |
| <b>Abb. 31:</b> Calciumfreisetzung von HISMC in Prozent im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle.....                             | 93 |
| <b>Abb. 32:</b> Calciumfreisetzung von HISMC in Prozent im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle.....                             | 94 |
| <b>Abb. 33:</b> Calciumfreisetzung von HISMC .....  | 95 |
| <b>Abb. 34:</b> Dosis-Effekt-Kurve der Calciumfreisetzung durch Stimulierung mit Kombination 1 ohne Capsaicinstimulierung .....   | 96 |

|  |     |
|--|-----|
| <b>Abb. 35:</b> Der Fa-CI-Plot der Calciumfreisetzung für die Stimulation mit der Kombination 1 ohne Capsaicinstimulierung ..... | 97  |
| <b>Abb. 36:</b> Dosis-Effekt-Kurve der Calciumfreisetzung durch Stimulierung mit Kombination 1 mit Capsaicinstimulierung .....   | 98  |
| <b>Abb. 37:</b> Der Fa-CI-Plot der Calciumfreisetzung für die Stimulation mit der Kombination 1 mit Capsaicinstimulierung .....  | 99  |
| <b>Abb. 38:</b> Dosis-Effekt-Kurve der Calciumfreisetzung durch Stimulierung mit Kombination 2 ohne Capsaicinstimulierung .....  | 100 |
| <b>Abb. 39:</b> Der Fa-CI-Plot der Calciumfreisetzung für die Stimulation mit der Kombination 2 ohne Capsaicinstimulierung ..... | 101 |
| <b>Abb. 40:</b> Dosis-Effekt-Kurve der Calciumfreisetzung durch Stimulierung mit Kombination 2 mit Capsaicinstimulierung .....   | 102 |
| <b>Abb. 41:</b> Der Fa-CI-Plot der Calciumfreisetzung für die Stimulation mit der Kombination 2 mit Capsaicinstimulierung .....  | 103 |

## 7. Tabellenverzeichnis

|   |    |
|---|----|
| <b>Tab. 1:</b> Assoziation von Risikofaktoren für GERD und deren Komplikationen .....                 | 15 |
| <b>Tab. 2:</b> Die IC55 und IC75-Werte von Dreierkombinationen und die Kombinationsindices (CI) ..... | 43 |
| <b>Tab. 3:</b> STW 5 und seine Einzelkomponenten.....   | 46 |
| <b>Tab. 4:</b> Chemikalien.....   | 47 |
| <b>Tab. 5:</b> Antikörper zur Durchführung der Western Blots .....                                    | 53 |
| <b>Tab. 6:</b> Antikörper für die Anfärbung der Paraffinschnitte .....                                | 54 |
| <b>Tab. 7:</b> Genexpressionsdaten der ASICs im ösophagealen Rattengewebe .....                       | 69 |
| <b>Tab. 8:</b> Genexpressionsdaten von 5-HTRs und SERT im ösophagealen Rattengewebe .....             | 70 |
| <b>Tab. 9:</b> Demographische Patient*innen Daten der ÖGD .....                                       | 77 |
| <b>Tab. 10:</b> ÖGD-Indikationen.....   | 77 |
| <b>Tab. 11:</b> Zusätzliche Befunde der ÖGD.....  | 78 |
| <b>Tab. 12:</b> Immunhistochemie der Ösophaguspräparate.....  | 78 |
| <b>Tab. 13:</b> Auswertung der ASIC4 immunhistochemisch positiven Schnitte.....                       | 80 |
| <b>Tab. 14:</b> Auswertung der Serotonin immunhistochemisch positiven Schnitte.....                   | 81 |
| <b>Tab. 15:</b> Auswertung der Serotonin und ASIC4 positiven Schnitte.....                            | 82 |

## 8. Literaturverzeichnis

Abdel-Aziz H, Kelber O, Lorkowski G, Storr M. Evaluating the Multitarget Effects of Combinations through Multistep Clustering of Pharmacological Data. *Planta med* 2017; 83: 1130–1140

Abdel-Aziz H, Kelber O, Vinson B, Okpanyi SN, Khayyal MT. STW 5 in a model of 5-HT<sub>3</sub> receptor mediated ileal contraction in vitro. *Z Gastroenterol* 2007; 08: 79

Abdel-Aziz H, Schneider M, Neuhuber W, Meguid Kassem A, Khailah S, Müller J, Gamal Eldeen H, Khairy A, Khayyal MT, Shcherbakova A, Efferth T, Ulrich-Merzenich G. Supplemental Data. *Mol Med* 2015a; 21: 1–10

Abdel-Aziz H, Schneider M, Neuhuber W, Meguid Kassem A, Khailah S, Müller J, Gamal Eldeen H, Khairy A, T Khayyal M, Shcherbakova A, Efferth T, Ulrich-Merzenich G. GPR84 and TREM-1 Signaling Contribute to the Pathogenesis of Reflux Esophagitis. *Mol Med* 2015b; 21: 1011–1024

Abdel-Aziz H, Zaki HF, Neuhuber W, Kelber O, Weiser D, Khayyal MT. Effect of an Herbal Preparation, STW 5, in an Acute Model of Reflux Oesophagitis in Rats. *J Pharmacol Sci* 2010; 113: 134–142

Akiba Y, Mizumori M, Kuo M, Ham M, Guth PH, Engel E, Kaunitz JD. CO<sub>2</sub> chemosensing in rat oesophagus. *Gut* 2008; 57: 1654–1664

Allegri M, Clark MR, Andrés J de, Jensen TS. Acute and chronic pain: where we are and where we have to go. *Minerva Anesthesiol* 2012; 78: 222–235

Allescher HD. Functional dyspepsia-a multicausal disease and its therapy. *Phytomedicine* 2006; 5: 2–11

Allescher H-D, Burgell R, Malfertheiner P, Mearin F. Multi-target Treatment for Irritable Bowel Syndrome with STW 5: Pharmacological Modes of Action. *J Gastrointestin Liver Dis* 2020; 29: 227–233

Allescher H-D, Wagner H. STW 5/Iberogast: Multi-Target-Wirkung bei funktioneller Dyspepsie und Reizdarmsyndrom. *Wien Med Wochenschr* 2007; 157: 301–307

Ammon HPT, Kelber O, Okpanyi SN. Spasmolytic and tonic effect of Iberogast (STW 5) in intestinal smooth muscle. *Phytomedicine* 2006; 13: 67–74

Andresen V, Keller J, Pehl C, Schemann M, Preiss J, Layer P. Irritable bowel syndrome- the main recommendations. *Dtsch Ärztebl Int* 2011; 108: 751–760

Atta MG, Seigneux S de, Lucas GM. Clinical Pharmacology in HIV Therapy. *Clin J Am Soc Nephro* 2019; 14: 435–444

Barlow WJ, Orlando RC. The pathogenesis of heartburn in nonerosive reflux disease: A unifying hypothesis. *Gastroenterology* 2005; 128: 771–778

Baron A, Lingueglia E. Pharmacology of acid-sensing ion channels - Physiological and therapeutical perspectives. *Neuropharmacology* 2015; 94: 19–35

Bayliss WM, Starling EH. The movements and innervation of the small intestine. *J Physiol* 1899; 24: 99–134

Berenbaum MC. What is synergy? *Pharmacological reviews* 1989; 41: 93–141

Berg CJ, Kaunitz JD. Gut chemosensing. *F1000Research* 2016; 5: 1–7

Berstad A, Hatlebakk JG. The predictive value of symptoms in gastro-oesophageal reflux disease. *Scand J Gastroenterol* 1995; 211: 1–4



Bertaccini G. Tissue 5-hydroxytryptamine and urinary 5-hydroxyindoleacetic acid after partial or total removal of the gastro-intestinal tract in the rat. *J Physiol* 1960; 153: 239–249

Bohórquez DV, Liddle RA. The gut connectome: making sense of what you eat. *J Clin Investig* 2015; 125: 888–890

Bredenoord AJ, Pandolfino JE, Smout AJ. Gastro-oesophageal reflux disease. *Lancet* 2013; 381: 1933–1942

Brierley SM, Kelber O. Use of natural products in gastrointestinal therapies. *Curr Opin Pharmacol* 2011; 11: 604–611

Caos A, Breiter J, Perdomo C, Barth J. Long-term prevention of erosive or ulcerative gastro-oesophageal reflux disease relapse with rabeprazole 10 or 20 mg vs. placebo: results of a 5-year study in the United States. *Aliment Pharmacol Ther* 2005; 22: 193–202

Castell DO, Murray JA, Tutuian R, Orlando RC, Arnold R. Review article: the pathophysiology of gastro-oesophageal reflux disease–oesophageal manifestations. *Aliment Pharmacol Ther* 2004; 20: 14–25

Chou T-C. Theoretical basis, experimental design, and computerized simulation of synergism and antagonism in drug combination studies. *Pharmacol Rev* 2006; 58: 621–681

Chou T-C. Frequently asked questions in drug combinations and the mass-action law-based answers. *Synergy* 2014; 1: 3–21

Chou T-C, Talalay P. Generalized equations for the analysis of inhibitions of Michaelis-Menten and higher-order kinetic systems with two or more mutually exclusive and nonexclusive inhibitors. *Eur J Biochem* 1981; 115: 207–216

Chou T-C, Talalay P. Quantitative analysis of dose-effect relationships: the combined effects of multiple drugs or enzyme inhibitors. *Adv Enzyme Regul* 1984; 22: 27–55

Delaunay A, Gasull X, Salinas M, Noël J, Friend Valérie, Lingueglia E, Deval E. Human ASIC3 channel dynamically adapts its activity to sense the extracellular pH in both acidic and alkaline directions. *Proc Natl Acad Sci* 2012; 109: 13124–13129

Dent J, Brun J, Fendrick AM, Fennerty MB, Janssens J, Kahrilas PJ, Lauritsen K, Reynolds JC, Shaw M, Talley NJ. An evidence-based appraisal of reflux disease management - the Genval Workshop Report. *Gut* 1999; 44: 1-16

Deval E, Lingueglia E. Acid-Sensing Ion Channels and nociception in the peripheral and central nervous systems. *Neuropharmacology* 2015; 94: 49–57

Donier E, Rugiero F, Jacob C, Wood JN. Regulation of ASIC activity by ASIC4--new insights into ASIC channel function revealed by a yeast two-hybrid assay. *Eur J Neurosci* 2008; 28: 74–86

Dray A. Inflammatory mediators of pain. *Br J Anaesth* 1995; 75: 125–131

Drossman DA. Functional Gastrointestinal Disorders: History, Pathophysiology, Clinical Features and Rome IV. *Gastroenterology* 2016; 150: 1262–1279

Dulai JS, Smith ESJ, Rahman T. Acid-sensing ion channel 3: An analgesic target. *Channels* 2021; 15: 94–127

Edgren G, Adami H-O, Weiderpass E, Nyren O. A global assessment of the oesophageal adenocarcinoma epidemic. *Gut* 2013; 62: 1406–1414

El-Serag HB, Sweet S, Winchester CC, Dent J. Update on the epidemiology of gastro-oesophageal reflux disease: a systematic review. *Gut* 2014; 63: 871–880

Enck P, Aziz Q, Barbara G, Farmer AD, Fukudo S, Mayer EA, Niesler B, Quigley EMM, Rajilić-Stojanović M, Schemann M, Schwille-Kiuntke J, Simren M, Zipfel S, Spiller RC. Irritable bowel syndrome. *Nat Rev Dis Primers* 2016; 2: 1–60

Eusebi LH, Ratnakumaran R, Yuan Y, Solaymani-Dodaran M, Bazzoli F, Ford AC. Global prevalence of, and risk factors for, gastro-oesophageal reflux symptoms: a meta-analysis. *Gut* 2017; 67: 430–440

Fass R, Achem SR. Noncardiac chest pain: epidemiology, natural course and pathogenesis. *J Neurogastroenterol Motil* 2011; 17: 110–123

Fass R, Ofman JJ. Gastroesophageal Reflux Disease—Should We Adopt A New Conceptual Framework? *Am J Gastroenterol* 2002; 8: 1901–1909

Fitzgerald RC, Onwuegbusi BA, Bajaj-Elliott M, Saeed IT, Burnham WR, Farthing MJG. Diversity in the oesophageal phenotypic response to gastro-oesophageal reflux: immunological determinants. *Gut* 2002; 50: 451–459

Förster C. Tight junctions and the modulation of barrier function in disease. *Histochem Cell Biol* 2008; 130: 55–70

Gebauer A, Merger M, Kilbinger H. Modulation by 5-HT<sub>3</sub> and 5-HT<sub>4</sub> receptors of the release of 5-hydroxytryptamine from the guinea-pig small intestine. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* 1993; 347: 137–140

Germann I, Hagelauer D, Kelber O, Vinson B, Laufer S, Weiser D, Heinle H. Antioxidative properties of the gastrointestinal phytopharmaceutical remedy STW 5 (Iberogast®). *Phytomedicine* 2006; 13: 45–50

Gershon MD. Review article: roles played by 5-hydroxytryptamine in the physiology of the bowel. *Aliment Pharmacol Ther* 1999; 13: 15–30

Gershon MD. Review article: serotonin receptors and transporters - roles in normal and abnormal gastrointestinal motility. *Aliment Pharmacol Ther* 2004; 20: 3–14

Gershon MD, Altman RF. An analysis of the uptake of 5-hydroxytryptamine by the myenteric plexus of the small intestine of the guinea pig. *J Pharmacol Exp Ther* 1971; 179: 29–41

Gershon MD, Robinson RG, Ross LL. Serotonin accumulation in the guinea-pig myenteric plexus: ion dependence, structure-activity relationship and the effect of drugs. *J Pharmacol Exp Ther* 1976; 198: 548–561

Gershon MD, Tamir H. Release of endogenous 5-hydroxytryptamine from resting and stimulated enteric neurons. *Neuroscience* 1981; 6: 2277–2286

Gharahkhani P, Tung J, Hinds D, Mishra A, Vaughan TL, Whiteman DC, MacGregor S. Chronic gastroesophageal reflux disease shares genetic background with esophageal adenocarcinoma and Barrett's esophagus. *Hum Mol Genet* 2016; 25: 828–835

Giorgi F de, Palmiero M, Esposito I, Mosca F, Cuomo R. Pathophysiology of gastro-oesophageal reflux disease. *Acta Otorhinolaryngol Ital* 2006; 26: 241–246

Gouni-Berthold I, Seul C, Ko Y, Hescheler J, Sachinidis A. Gangliosides GM1 and GM2 induce vascular smooth muscle cell proliferation via extracellular signal-regulated kinase 1/2 pathway. *Hypertension* 2001; 38: 1030–1037

Gründer S, Pusch M. Biophysical properties of acid-sensing ion channels (ASICs). *Neuropharmacology* 2015; 94: 9–18

Heinle H, Hagelauer D, Pascht U, Kelber O, Weiser D. Intestinal spasmolytic effects of STW 5 (Iberogast) and its components. *Phytomedicine* 2006; 13: 75–79

Hesselager M, Timmermann DB, Ahring PK. pH Dependency and desensitization kinetics of heterologously expressed combinations of acid-sensing ion channel subunits. *J Biol Chem* 2004; 279: 11006–11015

Holzer P. Local effector functions of capsaicin-sensitive sensory nerve endings: involvement of tachykinins, calcitonin gene-related peptide and other neuropeptides. *Neuroscience* 1988; 24: 739–768

Holzer P. Acid sensing in the gastrointestinal tract. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2007; 292: 699–705

Holzer P. Acid-sensitive ion channels and receptors. *Handb Exp Pharmacol* 2009; 194: 283–332

Holzer P. Acid sensing by visceral afferent neurones. *Acta Physiol* 2011; 201: 63–75

Holzer P. Acid-sensing ion channels in gastrointestinal function. *Neuropharmacology* 2015; 94: 72–79

Hoser S, Kelber O, Abdel-Aziz H, Weiser D, Nieber K. Kooperativität von Bestandteilen des Phytopharmakons STW 5 auf entzündliche Prozesse am Darm. *Z Gastroenterol* 2014; 52: 200

Huang R-Y, Pei L, Liu Q, Chen S, Dou H, Shu G, Yuan Z-X, Lin J, Peng G, Zhang W, Fu H. Isobologram Analysis: A Comprehensive Review of Methodology and Current Research. *Front Pharmacol* 2019; 10: 1–12

Huo X, Souza RF. Acid burn or cytokine sizzle in the pathogenesis of heartburn? *J Gastroenterol Hepatol* 2013; 28: 385–387

Huo X, Zhang X, Yu C, Zhang Q, Cheng E, Wang DH, Pham TH, Spechler SJ, Souza RF. In oesophageal squamous cells exposed to acidic bile salt medium, omeprazole inhibits

IL-8 expression through effects on nuclear factor- $\kappa$ B and activator protein-1. *Gut* 2014; 63: 1042–1052

Iceta R, Mesonero JE, Aramayona JJ, Alcalde AI. Expression of 5-HT<sub>1A</sub> and 5-HT<sub>7</sub> receptors in Caco-2 cells and their role in the regulation of serotonin transporter activity. *J Physiol Pharmacol* 2009; 60: 157–164

Imming P, Sinning C, Meyer A. Drugs, their targets and the nature and number of drug targets. *Nat Rev Drug Discov* 2006; 5: 821–834

Ismail-Beigi F, Horton PF, Pope CE. Histological consequences of gastroesophageal reflux in man. *Gastroenterology* 1970; 58: 163–174

Joel E. Richter. Gastroesophageal reflux disease. *Best Pract Res Clin Gastroenterol* 2007; 21: 609–631

Johnsson F, Hatlebakk JG, Klintenberg AC, Román J, Toth E, Stubberöd A, Falk A, Edin R. One-week esomeprazole treatment: an effective confirmatory test in patients with suspected gastroesophageal reflux disease. *Scand J Gastroenterol* 2003; 38: 354–359

Junghard O, Carlsson R, Lind T. Sufficient control of heartburn in endoscopy-negative gastro-oesophageal reflux disease trials. *Scand J Gastroenterol* 2003; 38: 1197–1199

Kahrilas PJ, Shaheen NJ, Vaezi MF, Hiltz SW, Black E, Modlin IM, Johnson SP, Allen J, Brill JV. American Gastroenterological Association Medical Position Statement on the management of gastroesophageal reflux disease. *Gastroenterology* 2008; 135: 1383–1391

Katz PO, Gerson LB, Vela MF. Guidelines for the diagnosis and management of gastroesophageal reflux disease. *Am J Gastroenterol* 2013; 108: 308–328

Khayyal MT, Abdel-Aziz H, Wadie W, Vinson B, Kelber O. Effect of STW 5 in an experimental model of esophagitis. *Z Gastroenterol* 2007; 45: 1–2

Khayyal MT, El-Ghazaly MA, Kenawy SA, Seif-El-Nasr M, Mahran LG, Kafafi YA, Okpanyi SN. Antiulcerogenic effect of some gastrointestinally acting plant extracts and their combination. *Arzneimittelforschung* 2001; 51: 545–553

Kim D. Serotonin: a mediator of the brain–gut connection. *Am J Gastroenterol* 2000; 95: 2698–2709

Koop H, Fuchs KH, Labenz J, Lynen Jansen P, Messmann H, Miehlke S, Schepp W, Wenzl TG. S2k-Leitlinie: Gastroösophageale Refluxkrankheit unter Federführung der Deutschen Gesellschaft für Gastroenterologie, Verdauungs- und Stoffwechselkrankheiten (DGVS):AWMF Register Nr. 021-013. *Z Gastroenterol* 2014; 52: 1299–1346

Krishtal O. The ASICs. *Trends Neurosci* 2003; 26: 477–483

Krishtal O, Pidoplichko VI. A receptor for protons in the nerve cell membrane. *Neuroscience* 1980; 5: 2325–2327

Krishtal O, Pidoplichko VI. A "receptor" for protons in small neurons of trigeminal ganglia: possible role in nociception. *Neuroscience letters* 1981; 24: 243–246

Kroll U, Cordes C. Pharmaceutical prerequisites for a multi-target therapy. *Phytomedicine* 2006; 13: 12–19

Kushnir-Sukhov NM, Brown JM, Wu Y, Kirshenbaum A, Metcalfe DD. Human mast cells are capable of serotonin synthesis and release. *J Allergy Clin Immunol* 2007; 119: 498–499

Kushnir-Sukhov NM, Gilfillan AM, Coleman JW, Brown JM, Bruening S, Toth M, Metcalfe DD. 5-hydroxytryptamine induces mast cell adhesion and migration. *J Immunol* 2006; 177: 6422–6432

Lacy BE, Weiser K, Chertoff J, Fass R, Pandolfino JE, Richter JE, Rothstein RI, Spangler C, Vaezi MF. The diagnosis of gastroesophageal reflux disease. *Am J Med* 2010; 123: 583–592

Lagergren J, Bergström R, Adami H-O, Nyren O. Association between Medications That Relax the Lower Esophageal Sphincter and Risk for Esophageal Adenocarcinoma. *Ann Intern Med* 2000; 133: 165–175

Lagergren J, Bergström R, Lindgren A, Nyrén O. Symptomatic Gastroesophageal Reflux as a Risk Factor for Esophageal Adenocarcinoma. *N Engl J Med* 1999; 340: 825–831

Layer P, Andresen V, Allescher H, Bischoff SC, Claßen M, Elsenbruch S, Freitag M, Frieling T, Gebhard M, Goebel-Stengel M, Häuser W, Holtmann G, Keller J, Kreis ME, Kruis W, Langhorst J, Jansen PL, Madisch A, Mönnikes H, Müller-Lissner S, Niesler B, Pehl C, Pohl D, Raithel M, Röhrig-Herzog G, Schemann M, Schmiedel S, Schulle-Kiuntke J, Storr M, Preiß JC, Andus T, Buderus S, Ehlert U, Engel M, Enninger A, Fischbach W, Gillissen A, Gschossmann J, Gundling F, Haag S, Helwig U, Hollerbach S, Karaus M, Katschinski M, Krammer H, Kuhlbusch-Zicklam R, Matthes H, Menge D, Miehlke S, Posovszky MC, Schaefer R, Schmidt-Choudhury A, Schwandner O, Schweinlin A, Seidl H, Stengel A, Tesarz J, van der Voort I, Voderholzer W, Boyen G von, Schönfeld J von, Wedel T. Update S3-Leitlinie Reizdarmsyndrom: Definition, Pathophysiologie, Diagnostik und Therapie. Gemeinsame Leitlinie der Deutschen Gesellschaft für Gastroenterologie, Verdauungs- und Stoffwechselkrankheiten (DGVS) und der Deutschen Gesellschaft für Neurogastroenterologie und Motilität (DGNM). *Z Gastroenterol* 2021; 59: 1323–1415

Leone A de, Tonini M, Dominici P, Grossi E, Pace F. The proton pump inhibitor test for gastroesophageal reflux disease: optimal cut-off value and duration. *Dig Liver Dis* 2010; 42: 785–790



Li H-F, Liu J-F, Zhang K, Feng Y. Expression of serotonin receptors in human lower esophageal sphincter. *Exp Ther Med* 2015; 9: 49–54

Lin S-H, Sun W-H, Chen C-C. Genetic exploration of the role of acid-sensing ion channels. *Neuropharmacology* 2015; 94: 99–118

Linden DR, White SL, Brooks EM, Mawe GM. Novel promoter and alternate transcription start site of the human serotonin reuptake transporter in intestinal mucosa. *Neurogastroenterol Motil* 2009; 21: 534-541

Lingueglia E, Weille JR de, Bassilana F, Heurteaux C, Sakai H, Waldmann R, Lazdunski M. A modulatory subunit of acid sensing ion channels in brain and dorsal root ganglion cells. *J Biol Chem* 1997; 272: 29778–29783

Loewe S. The problem of synergism and antagonism of combined drugs. *Arzneimittelforschung* 1953; 3: 285–290

Lundell LR, Dent J, Bennett JR, Blum AL, Armstrong D, Galimiche JP, Johnson F, Hongo M, Richter JE, Spechler SJ, Tytgat GNJ, Wallin L. Endoscopic assessment of oesophagitis: clinical and functional correlates and further validation of the Los Angeles classification. *Gut* 1999; 45: 172–180

Madisch A, Vinson BR, Abdel-Aziz H, Kelber O, Nieber K, Kraft K, Storr M. Modulation der gastrointestinalen Motilität jenseits von Metoclopramid und Domperidon. *Wien Med Wochenschr* 2017; 167: 160–168

Mamet J, Baron A, Lazdunski M, Voilley N. ProInflammatory Mediator, Stimulators of Sensory Neuron Excitability via the Expression of Acid-Sensing Ion Channels. *J Neurosci* 2002; 22: 10662–10670

Michael S, Kelber O, Hauschildt S, Spanel-Borowski K, Nieber K. Inhibition of inflammation-induced alterations in rat small intestine by the herbal preparations STW 5 and STW 6. *Phytomedicine* 2009; 16: 161–171

Millan MJ. Descending control of pain. *Prog Neurobiol* 2002; 66: 355–474

Miner P, JR, Katz PO, Chen Y, Sostek M. Gastric acid control with esomeprazole, lansoprazole, omeprazole, pantoprazole, and rabeprazole: a five-way crossover study. *Am J Gastroenterol* 2003; 98: 2616–2620

Mittler S, Mueller MH, Kasperek MS, Kelber O, Weiser D, Kreis ME. Iberis Amara Desensitizes Colonic Afferent Nerve Fibers in the Mouse to 5-HT and Low-Threshold Distension but Not to Bradykinin and High-Threshold Distension. *Gastroenterology* 2011; 140: 537

Miwa H, Sasaki M, Furuta T, Koike T, Habu Y, Ito M, Fujiwara Y, Wada T, Nagahara A, Hongo M, Chiba T, Kinoshita Y. Efficacy of rabeprazole on heartburn symptom resolution in patients with non-erosive and erosive gastro-oesophageal reflux disease: a multicenter study from Japan. *Aliment Pharmacol Ther* 2007; 26: 69–77

Miwa H, Takubo K, Shimatani T, Furuta T, Oshima T, Tanaka J, Aida J, Ito M, Kurosawa S, Joh T, Wada T, Habu Y, Watanabe Y, Hongo M, Chiba T, Kinoshita Y. Histology of symptomatic gastroesophageal reflux disease: is it predictive of response to proton pump inhibitors? *J Gastroenterol Hepatol* 2013; 28: 479–487

Morgner-Miehlke A, Koop H, Blum AL, Hermans M-L, Miehlke S, Labenz J. Symptom-versus endoscopy-based diagnosis and treatment of gastroesophageal reflux disease (GERD). *Z Gastroenterol* 2006; 44: 399–410

NCIB Gene R. July 2008. ASIC5. Gen ID: 51802. Verfügbar unter <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/?term=Homo+sapiens+ASIC5> (Zugriffsdatum: 10.06.2021)

Omura N, Kashiwagi H, Chen G, Suzuki Y, Yano F, Aoki T. Establishment of surgically induced chronic acid reflux esophagitis in rats. *Scand J Gastroenterol* 1999; 34: 948–953

Oude Nijhuis RAB, Curvers WL, van der Ende M, Herregods TVK, Schuitemaker JM, Smout AJPM, Bredenoord AJ. Utility of Routine Esophageal Biopsies in Patients With Refractory Reflux Symptoms. *Am J Gastroenterol* 2021; 116: 816–820

Pandolfino JE, Kahrilas PJ. AGA technical review on the clinical use of esophageal manometry. *Gastroenterology* 2005; 128: 209–224

Pilichiewicz AN, Horowitz M, Russo A, Maddox AF, Jones KL, Schemann M, Holtmann G, Feinle-Bisset C. Effects of Iberogast on proximal gastric volume, antropyloroduodenal motility and gastric emptying in healthy men. *Am J Gastroenterol* 2007; 102: 1276–1283

Price MP, Lewin GR, McIlwrath SL, Cheng C, Xie J, Heppenstall PA, Stucky CL, Mannsfeldt AG, Brennan TJ, Drummond HA, Qiao J, Benson CJ, Tarr DE, Hrstka RF, Yang B, Williamson RA, Welsh MJ. The mammalian sodium channel BNC1 is required for normal touch sensation. *Nature* 2000; 407: 1007–1011

Raskov H, Burcharth J, Pommergaard H-C, Rosenberg J. Irritable bowel syndrome, the microbiota and the gut-brain axis. *Gut microbes* 2016; 7: 365–383

Ratsch H. Überwachung von Versuchstierhaltungen/Tierversuchen mit Beispielen [Inspection of laboratory animal breeding and husbandry/experiments on animals, examples]. *Dtsch Tierarztl Wochenschr* 2008;115(4):143-149

Raymond JR, Mukhin YV, Gelasco A, Turner J, Collinsworth G, Gettys TW, Grewal JS, Garnovskaya MN. Multiplicity of mechanisms of serotonin receptor signal transduction. *Pharmacol Ther* 2001; 92: 179–212

Reichling J, Saller R. *Iberis amara* L. (bitter candytuft) -profile of a medicinal plant. *Forsch Komplementarmed Klass Naturheilkd.* 2002; 9: 21–33

Rhee SH, Pothoulakis C, Mayer EA. Principles and clinical implications of the brain-gut-enteric microbiota axis. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol* 2009; 6: 306–314

Richter JE, Rubenstein JH. Presentation and Epidemiology of Gastroesophageal Reflux Disease. *Gastroenterology* 2018; 154: 267–276

Ronkainen J, Agréus L. Epidemiology of reflux symptoms and GORD. *Best Pract Res Clin Gastroenterol* 2013; 27: 325–337

Rösch W, Liebrechts T, Gundermann K-J, Vinson B, Holtmann G. Phytotherapy for functional dyspepsia: a review of the clinical evidence for the herbal preparation STW 5. *Phytomedicine* 2006; 13: 114–121

Saller R, Reichling J. Drugs with *Iberis amara* as a modern phytotherapy to treat chronic functional disorders of the gastrointestinal tract. *Forsch Komplementarmed Klass Naturheilkd.* 2002; 9: 5–6

Savarino E, Zentilin P, Tutuian R, Pohl D, Gemignani L, Malesci A, Savarino V. Impedance-pH reflux patterns can differentiate non-erosive reflux disease from functional heartburn patients. *J Gastroenterol* 2012; 47: 159–168

Scarpulla G, Camilleri S, Galante P, Manganaro M, Fox M. The impact of prolonged pH measurements on the diagnosis of gastroesophageal reflux disease: 4-day wireless pH studies. *Am J Gastroenterol* 2007; 102: 2642–2647

Schemann M. Control of gastrointestinal motility by the "gut brain"--the enteric nervous system. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 2005; 41: 4-6

Schemann M, Angay O, Wagner S, Krueger D, Zeller F, Kelber O. Wirkung von STW 5 auf die Motilität des unteren Oesophagussphinkters und des Kolons: neue Indikationen für Iberogast®. *Z Gastroenterol* 2008; 46: 354

Schemann M, Michel K, Zeller F, Hohenester B, Rühl A. Region-specific effects of STW 5 (Iberogast®) and its components in gastric fundus, corpus and antrum. *Phytomedicine* 2006; 13: 90–99

Schicho R, Schemann M, Pabst MA, Holzer P, Lippe ITH. Capsaicin-sensitive extrinsic afferents are involved in acid-induced activation of distinct myenteric neurons in the rat stomach. *Neurogastroenterol Motil* 2003; 15: 33–44

Sibaev A, Abdel-Aziz H, Kelber O, Weiser D, Göke B, Storr M. Antiinflammatorische Wirkung von STW 5 (Iberogast®) und seinen Einzelextrakten auf die durch Entzündungsvorgänge veränderte Motilität in vitro. *Z Gastroenterol* 2013; 51: 191

Sifrim D, Castell DO, Dent J, Kahrilas PJ. Gastro-oesophageal reflux monitoring: review and consensus report on detection and definitions of acid, non-acid, and gas reflux. *Gut* 2004; 53: 1024–1031

Simmen U, Kelber O, Okpanyi SN, Jaeggi R, Bueter B, Weiser D. Binding of STW 5 (Iberogast®) and its components to intestinal 5-HT, muscarinic M3, and opioid receptors. *Phytomedicine* 2006; 13: 51–55

Sjölund K, Sandén G, Håkanson R, Sundler F. Endocrine cells in human intestine: an immunocytochemical study. *Gastroenterology* 1983; 85: 1120–1130

Souza RF. Bringing GERD Management up to PAR-2. *Am J Gastroenterol* 2010; 105: 1944–1946

Souza RF, Huo X, Mittal V, Schuler CM, Carmack SW, Zhang HY, Zhang X, Yu C, Hormi-Carver K, Genta RM, Spechler SJ. Gastroesophageal reflux might cause esophagitis through a cytokine-mediated mechanism rather than caustic acid injury. *Gastroenterology* 2009; 137: 1776–1784

Steen KH, Reeh PW. Sustained graded pain and hyperalgesia from harmless experimental tissue acidosis in human skin. *Neurosci Lett* 1993; 154: 113–116

Steen KH, Reeh PW, Kreysel HW. Topical acetylsalicylic, salicylic acid and indomethacin suppress pain from experimental tissue acidosis in human skin. *Pain* 1995; 62: 339–347

Thoua NM, Khoo D, Kalantzis C, Emmanuel AV. Acid-related oesophageal sensitivity, not dysmotility, differentiates subgroups of patients with non-erosive reflux disease. *Aliment Pharmacol Ther* 2008; 27: 396–403

Tobey NA, Hosseini SS, Caymaz-Bor C, Wyatt HR, Orlando GS, Orlando RC. The role of pepsin in acid injury to esophageal epithelium. *Am J Gastroenterol* 2001; 96: 3062–3070

Tomasoni D, Vishram-Nielsen JKK, Pagnesi M, Adamo M, Lombardi CM, Gustafsson F, Metra M. Advanced heart failure: guideline-directed medical therapy, diuretics, inotropes, and palliative care. *ESC heart fail* 2022; 9: 1507–1523

Tugay M, Yildiz F, Utkan T, Müezzinoğlu B, Erden F, Gacar N, Ulak G. Esophagitis impairs esophageal smooth muscle reactivity in the rat model: an in vitro study. *Dig Dis Sci* 2003; 48: 2147–2152

Tutuian R. Adverse effects of drugs on the esophagus. *Best Pract Res Clin Gastroenterol* 2010; 24: 91–97

Tyce GM. Origin and metabolism of serotonin. *J Cardiovasc Pharmacol* 1990; 16: 1-7

Ulrich-Merzenich G, Kelber O, Koptina A, Freischmidt A, Heilmann J, Müller J, Zeitler H, Seidel MF, Ludwig M, Heinrich EU, Winterhoff H. Novel neurological and immunological targets for salicylate-based phytopharmaceuticals and for the anti-depressant imipramine. *Phytomedicine* 2012; 19: 930–939

Ulrich-Merzenich G, Welslau L, Aziz-Kalbhenn H, Kelber O, Shcherbakova A. Synergy quantifications to identify individual contributions of combination partners to the overall activity - The example of STW 5. *Phytomedicine* 2019; 60: 1–9

Ulrich-Merzenich G, Zeitler H, Panek D, Bokemeyer D, Vetter H. Vitamin C promotes human endothelial cell growth via the ERK-signaling pathway. *Eur J Nutr* 2007; 46: 87–94

Urbina M, Arroyo R, Lima L. 5-HT<sub>7</sub> receptors and tryptophan hydroxylase in lymphocytes of rats: mitogen activation, physical restraint or treatment with reserpine. *Neuroimmunomodulation* 2014; 21: 240–249

Vakil N, van Zanten SV, Kahrilas P, Dent J, Jones R. The Montreal definition and classification of gastroesophageal reflux disease: a global evidence-based consensus. *Am J Gastroenterol* 2006; 101: 1900-1920

van Nassauw L, Adriaensen D, Timmermans J-P. The bidirectional communication between neurons and mast cells within the gastrointestinal tract. *Auton Neurosci* 2007; 133: 91–103

Voilley N. Acid-sensing ion channels (ASICs): new targets for the analgesic effects of non-steroid anti-inflammatory drugs (NSAIDs). *Curr Drug Targets Inflamm Allergy* 2004; 3: 71–79

Voilley N, Weille JR de, Mamet J, Lazdunski M. Nonsteroid Anti-Inflammatory Drugs Inhibit Both the Activity and the Inflammation- Induced Expression of Acid-Sensing Ion Channels in Nociceptors. *J Neurosci* 2001; 21: 8026–8033

Wachter CH, Heinemann Á, Donnerer J, Pabst MA, Holzer P. Mediation by 5-hydroxytryptamine of the femoral vasoconstriction induced by acid challenge of the rat gastric mucosa. *J Physiol* 1998; 509.2: 541–550

Wadie W, Abdel-Aziz H, Zaki HF, Kelber O, Weiser D, Khayyal MT. STW 5 is effective in dextran sulfate sodium-induced colitis in rats. *Int J Colorect Dis* 2012; 27: 1445–1453

Wagner H, Ulrich-Merzenich G. Synergy research. *Phytomedicine* 2009; 16: 97–110

Wahlqvist P, Karlsson M, Johnson D, Carlsson J, Bolge SC, Wallander M-A. Relationship between symptom load of gastro-oesophageal reflux disease and health-related quality of life, work productivity, resource utilization and concomitant diseases: survey of a US cohort. *Aliment Pharmacol Ther* 2008; 27: 960–970

Waldmann R, Champigny G, Bassilana F, Heurteaux C, Lazdunski M. A proton-gated cation channel involved in acid-sensing. *Nature* 1997; 386: 173–177

Waldmann R, Lazdunski M. H(+)-gated cation channels: neuronal acid sensors in the NaC/DEG family of ion channels. *Curr Opin Neurobiol* 1998; 8: 418–424

Wang X, Li W-G, Yu Y, Xiao X, Cheng J, Zeng W-Z, Peng Z, Xi Zhu M, Xu T-L. Serotonin facilitates peripheral pain sensitivity in a manner that depends on the nonproton ligand sensing domain of ASIC3 channel. *J Neurosci* 2013; 33: 4265–4279

Wegener T, Wagner H. The active components and the pharmacological multi-target principle of STW 5 (Iberogast). *Phytomedicine* 2006; 13: 20–35

Wemmie JA, Askwith CC, Lamani E, Cassell MD, Freeman JH, JR, Welsh MJ. Acid-Sensing Ion Channel 1 Is Localized in Brain Regions with High Synaptic Density and Contributes to Fear Conditioning. *J Neurosci* 2003; 23: 5496–5502

Wemmie JA, Chen J, Askwith CC, Hruska-Hageman AM, Price MP, Nolan BC, Yoder PG, Lamani E, Hoshi T, Freeman JH, JR, Welsh MJ. The Acid-Activated Ion Channel ASIC Contributes to Synaptic Plasticity, Learning, and Memory. *Neuron* 2002; 34: 463–477



Wemmie JA, Price MP, Welsh MJ. Acid-sensing ion channels: advances, questions and therapeutic opportunities. *Trends Neurosci* 2006; 29: 578–586

Wemmie JA, Taugher RJ, Kreple CJ. Acid-sensing ion channels in pain and disease. *Nat Rev Neurosci* 2013; 14: 461–471

World Medical Association. World Medical Association Declaration of Helsinki: ethical principles for medical research involving human subjects. *JAMA* 2013; 310(20): 2191–2194

Wu L, Oshima T, Tomita T, Ohda Y, Fukui H, Watari J, Miwa H. Serotonin disrupts esophageal mucosal integrity. *J Gastroenterol* 2016; 51: 1040–1049

Yaakob NS, Chinkwo KA, Chetty N, Coupar IM, Irving HR. Distribution of 5-HT<sub>3</sub>, 5-HT<sub>4</sub>, and 5-HT<sub>7</sub> Receptors Along the Human Colon. *J Neurogastroenterol Motil* 2015; 21: 361–369

Yang L, Cai H, Tou J, Gu W, Shu X, Zhang T, Yang X, Shen Z, Jiang M. The role of the 5-hydroxytryptamine pathway in reflux-induced esophageal mucosal injury in rats. *World J Surg Oncol* 2012; 10: 219–226

Yu Y, Chen Z, Li W-G, Cao H, Feng E-G, Yu F, Liu H, Jiang H, Xu T-L. A nonproton ligand sensor in the acid-sensing ion channel. *Neuron* 2010; 68: 61–72

Zullo A, Fiorini G, Bassotti G, Bachetti F, Monica F, Macor D, Paoluzi OA, Scaccianoce G, Portincasa P, Francesco V de, Lorenzetti R, Saracino IM, Pavoni M, Vaira D. Upper Endoscopy in Patients with Extra-Oesophageal Reflux Symptoms: A Multicentre Study. *GE Port J Gastroenterol* 2020; 27: 312–317

## 9. Danksagung

Mein größter Dank und Wertschätzung gilt Frau **PD Dr. Gudrun Ulrich-Merzenich** für die fachliche und organisatorische Supervision meiner Arbeit, für die Chance meine Doktorarbeit in ihrer Arbeitsgruppe schreiben zu dürfen, für das Korrigieren der Schrift und ihre konstante Hilfe und Offenheit für Fragen. Außerdem gilt mein Dank **Frau Dr. rer. medic. Beate Stock-Schröer** und der Karl und Veronica Carstens Stiftung für die Kontaktherstellung mit Frau Ulrich-Merzenich und die administrative Unterstützung der Doktorarbeit.

Tibor Schaarschmidt danke ich für die Gesellschaft und Unterstützung während der Laborzeit. Franziska Pilz danke ich für das Lesen all der Wörter in dieser Arbeit.

Danken möchte ich auch Dr. Heba Abdel-Aziz, STEIGERWALD/Bayer Consumer Care sowie Anastasiia Shcherbakova für die Bereitstellung von Daten und die damit einhergehende Unterstützung und Zusammenarbeit. Mein Dank gilt auch Prof. Abdel Meguid Kassem von der Universität Kairo und Prof. Winfried Neuhuber, Universität Erlangen-Nürnberg für die Gewinnung, Bereitstellung und histopathologische Untersuchung der humanen Ösophagusproben.

Meine Familie war nicht nur während des Studiums eine große Stütze für mich, sondern auch beim Schreiben dieser Arbeit hatten sie immer ein offenes Ohr für meine Zweifel und Bedenken und haben mich stets motiviert und an mich geglaubt. Es fällt mir schwer in Worten zu beschreiben, wie dankbar ich für die Unterstützung und Liebe meiner Eltern und meiner Schwester Hanna in all den Jahren bin.

Ein großer Dank für emotionale Unterstützung, das Zuhören und gemeinsam Rätseln, was als nächstes zu tun ist und zum Teil Korrekturlesen geht raus an: Patrick, Martine, Rafi, Daniel, Eva, Christoph und Elias.

Zum Schluss danke ich mir selbst für mein Durchhaltevermögen, meine Disziplin und die Motivation für diese Arbeit.

## 10. Publikationen

### Publikation

Ulrich-Merzenich G, Welslau L, Abdel-Aziz H, Kelber O, Shcherbakova A. Synergy quantifications to identify individual contributions of combination partners to the overall activity - The example of STW 5. *Phytomedicine*. 2019; 60:153013. 10.1016/j.phy-med.2019.153013.

### Gedruckter Abstract (Vortrag)

Jahreskongress der Gesellschaft für Phytotherapie, September 2019, Münster

Welslau L, Shcherbakova A, Abdel-Aziz H, Esch C, Thiesler T, Fischer HP, Kristiansen G, Kassem A, Kelber O, Ulrich-Merzenich G. (2019). Beeinflussung von säuresensiblen Kanälen und Serotoninrezeptoren im Ösophagus durch STW 5 und Omeprazol. *Z Phytother*. 40. 10.1055/s-0039-1697285.

### Gedruckter Abstract (Poster)

Ulrich-Merzenich G, Welslau L, Kelber O, Shcherbakova A, Esch C, Thiesler T, Fischer HP, Kristiansen G, Kassem A, Abdel-Aziz H. Regulations of ASIC4, 5-HTR and SERT in the esophageal mucosa under STW 5 treatment support a corporate role in pain sensing. 2019. *Planta Med*. 85. Doi 10.1055/s-0039-3399706.

Ulrich-Merzenich G, Shcherbakova A, Welslau L, Kelber O, Rabini S, Abdel-Aziz H. Profiles of acid ion channels and 5-hydroxy-tryptamine receptors in a rat model of gastroesophageal reflux disease. *Neurogastroenterology and Motility* 2018, Vol. 30, Supp. 1. Abstract 195.

### Poster

Welslau L, Shcherbakova A, Abdel-Aziz H, Kelber O, Kassem A, Thiesler T, Esch C, Kristiansen G, Fischer HP, Ulrich-Merzenich G. Regulations of ASIC4, 5-HTR and SERT in the esophageal mucosa under STW5 treatment support a corporate role in pain sensing. March 2019, Conference: Young Researcher Meeting, University of Münster, Germany, 23. March 2019.