

Aus der Klinik und Poliklinik für Anästhesiologie
der Universität Würzburg
Direktor: Professor Dr. med. N. Roewer

Wirkung von Melatonin auf die Dünndarmperistaltik des Meerschweinchens *in vitro*

Inaugural-Dissertation

zur Erlangung der Doktorwürde der
Medizinischen Fakultät
der
Julius-Maximilian-Universität Würzburg

vorgelegt von
Christian Fahr
aus Freiburg

Würzburg, November 2016



Referent: Professor Dr. med. M.K. Herbert

Korreferent: Professor Dr. med. E. Wischmeyer

Dekan: Professor Dr. med. M. Frosch

Tag der mündlichen Prüfung : 06.03.2017

Der Promovend ist Arzt

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis in alphabetischer Reihenfolge

| | |
|---|-----------|
| 1 Einleitung | 1 |
| 1.1 Das intrinsische Nervensystem | 1 |
| 1.2 Das extrinsisches Nervensystem | 3 |
| 1.3 Neurotransmitter im Magen-Darm-Trakt | 3 |
| 1.3.1 Melatonin | 5 |
| 1.3.1.1 Melatoninrezeptoren | 10 |
| 1.3.1.2 Einfluss von Melatonin auf den Gastrointestinaltrakt | 11 |
| 1.4 Darmmotilitätsstörungen | 12 |
| 1.4.1 Wirkmechanismus von Fentanyl auf die Darmmotilität | 13 |
| 1.4.2 Wirkmechanismus von Propofol auf die Darmmotilität | 13 |
| 1.4.3 Wirkmechanismus von Midazolam auf die Darmmotilität | 13 |
| 1.5 Ziel der Arbeit | 14 |
| 2 Material und Methoden | 14 |
| 2.1. Versuchsaufbau und Versuchstiere | 14 |
| 2.1.1 Präparation am Meerschweinchendünndarm | 15 |
| 2.1.2 Versuchsanordnung | 16 |
| 2.2 Versuchsdurchführung | 20 |
| 2.3 Substanzen, Konzentrationen und Versuchsreihen | 21 |
| 2.3.1 Wirkung von Melatonin | 23 |
| 2.3.2 Wirkung von Melatoninrezeptoragonisten und –antagonisten | 23 |
| 2.3.3 Wechselwirkung von Melatonin mit Analgetika und Sedativa. | 23 |
| 2.3.3.1 Melatonin / Luzindol mit Midazolam | 23 |
| 2.3.3.2 Melatonin / Luzindol mit Fentanyl | 24 |
| 2.3.3.3 Luzindol Konzentrations-Wirkungsbeziehung mit Midazolam | 24 |
| 2.3.3.4 Propofol | 24 |
| 2.3.3.4.1 Melatonin Konzentrations-Wirkungsbeziehung mit Propofol | 24 |
| 2.3.3.4.2 Vorbehandlung mit Luzindol und nachfolgende Propofolapplikation | 25 |
| 2.3.3.4.3 Vorbehandlung mit dem partiellen Agonisten 2-Phenylmelatonin oder dem Agonisten 8-M-PDOT und nachfolgende Propofolapplikation | 25 |

| | |
|---|----|
| 2.3.3.5 Wirkung von Melatonin und Luzindol unter Hypoxiebedingungen | 26 |
| 2.4 Auswertung | 27 |
| 2.5 Statistische Auswertung | 30 |
| 2.6 Graphische Darstellung | 31 |
| 2.7 Übersicht der Experimente | 31 |
| 3 Ergebnisse der Versuche | |
| 3.1 Wirkung von Melatonin auf die Dünndarmperistaltik | 33 |
| 3.2 Wirkung von Melatoninrezeptoragonisten und -antagonisten auf die Dünndarmperistaltik | 33 |
| 3.2.1 Eigenwirkung des partiellen Agonisten 2-Phenylmelatonin | 33 |
| 3.2.2 Eigenwirkung des Agonisten 8-M-PDOT | 34 |
| 3.2.3 Eigenwirkung des Antagonisten Luzindol | 35 |
| 3.3 Wechselwirkung von Melatonin mit verschiedenen Medikamenten | 35 |
| 3.3.1 Midazolamzugabe nach Vorbehandlung mit Melatonin oder Luzindol | 36 |
| 3.3.2 Untersuchungen zur Dosis-Wirkungsbeziehung zwischen Luzindol und Midazolam | 36 |
| 3.3.3 Wirkung von Fentanyl nach Vorbehandlung mit Luzindol und Melatonin | 37 |
| 3.3.4 Untersuchungen mit Propofol | 38 |
| 3.3.4.1 Propofol nach Vorbehandlung mit Melatonin | 38 |
| 3.3.4.2 Propofol nach Vorbehandlung mit Luzindol | 39 |
| 3.3.4.3 Propofol nach Vorbehandlung mit dem partiellen Agonisten 2-Phenylmelatonin | 40 |
| 3.3.4.4 Propofol nach Vorbehandlung mit dem Agonisten 8-M-PDOT | 40 |
| 3.3.4.5 Kontrolle Propofol-Lösungsmittel nach Vorbehandlung mit Melatonin | 41 |
| 3.4 Wirkung von Melatonin und Luzindol unter Hypoxiebedingungen | 42 |
| 3.5 Validierung der Umgebungsbedingungen | 44 |
| 3.5.1 Hypoxie und Normoxie Organbadbedingungen | 44 |
| 3.5.2 Überprüfung der Vitalität des peripheren enterischen Nervensystems in langdauernden Versuchen | 45 |
| 4 Diskussion | 46 |

| | |
|-------------------------------|----|
| 5 Zusammenfassung | 55 |
| 6 Literaturverzeichnis | 57 |
| 7 Danksagung | |
| 8 Lebenslauf | |

Abkürzungsverzeichnis in alphabetischer Reihenfolge

| | |
|-----------------|--|
| 5-HT | 5-Hydroxytryptamin (Serotonin) |
| 8-M-PDOT | 8-Methoxy-2-propionamidotetralin (Melatonin Agonist) |
| 6-SMT | 6-Sulfatoxymelatonin |
| AC | Adenylatcyclase |
| ACh | Acetylcholin |
| ANOVA | Analysis of variance |
| ATP | Adenosintriphosphat |
| cAMP | cyclisches Adenosinmonophosphat |
| CGRP | Calcitonin Gene-Related Peptide |
| DAG | Diacylglycerol |
| ENS | Enterisches Nervensystem |
| GABA | Gamma-aminobutyric acid (Gammaaminobuttersäure) |
| GPCR | G-Protein-coupled receptor |
| GRP | Gastric-releasing Peptid |
| HIOMT | Hydroxyindol-O-Methyltransferase |
| HWZ | Halbwertszeit |
| ICC | Interstitielle Cajalzelle |
| IP-3 | Inositoltriphosphat |
| LES | Lower esophagel sphincter |
| LM | Lösungsmittel |

| | |
|------------------------------------|---|
| Luzindol | 2-Benzyl-N-acetyltryptamine (Melatonin Antagonist) |
| Melatonin | 5-Methoxy-N-acetyltryptamin |
| M3 | Muskarinrezeptor Typ3 |
| MMC | migrating motor complex (interdigestive motorische Aktivität) |
| MRR | Melatonin related receptor |
| MT/MEL | Melatonin Rezeptor (nach IUPHAR) |
| NKA/NKB | Neurokinin A/B |
| NO | Stickstoffmonoxid |
| NOS | Stickstoffmonoxidsynthase |
| Pa | Pascal |
| PACAP | Pituitary (Zirbeldrüsen) Adenylatcyclase aktivierendes Polypeptid |
| PDGFRα(+) | Platelet-derived growth factor receptor alpha-positive |
| PIP2 | Phosphatidyl-Inositol-Biphosphat |
| PKC | Proteinkinase C |
| PLC | Phospholipase C |
| PLC-β | Phospholipase C (Phosphoinositid spezifisch) |
| PM | Plexus myentericus |
| PPT | peristaltic pressure threshold (Schwellendruck) |
| PS | Plexus submucosus |
| QR2 | Quinone reductase 2 |
| ROR | Retinoid related orphan nuclear hormon receptor |

| | |
|------------|--|
| SEM | standard error of the mean (Standardfehler des Mittelwertes) |
| SP | Substanz P |
| SR | Sarkoplasmatische reticulum |
| VIP | Vasoaktives intestinales Peptit |
| TTX | Tetrodotoxin |

1 Einleitung

Die Hemmung der Magen-Darm-Motilität ist bei intensivmedizinischen Patienten ein häufiges Krankheitsbild. Diese Motilitätshemmung kann bis zum Ileus führen und damit eine potentiell lebensgefährliche Komplikation darstellen. Die Ursachen der Darmpassagestörungen sind multifaktoriell und umfassen unter anderem präexistente Erkrankungen des Patienten, motilitätshemmende Pharmaka und Mediatoren sowie beispielsweise abdominalchirurgische Interventionen. Störungen der zirkadianen Rhythmik haben vielfältige Auswirkungen auf das Wohlbefinden und auf physiologische Regelkreise und Funktionen im Körper. Inwieweit Änderungen der zirkadianen Rhythmik beim Intensivpatienten einen Einfluss auf die Darmtätigkeit haben, ist derzeit unzureichend verstanden. Daher wird in der vorliegenden Arbeit die Wirkung von Melatonin, dem Hormon, das den Wach-Schlaf-Rhythmus regelt, auf die Dünndarmmotilität untersucht.

1.1 Das intrinsische Nervensystem

Der Nahrungsbrei (Chymus) wird durch periodisch auftretende, wellenförmige Kontraktionen der glatten Muskulatur des Magen-Darm-Trakts nach aboral transportiert. Dies geschieht durch zirkuläre und longitudinale Kontraktionen. Die Steuerung dieser Peristaltik wird hauptsächlich vom autonomen enterischen Nervensystem (ENS) geregelt. Diese neben dem Rückenmark größte Nervenansammlung von etwa 100 Millionen Nervenzellen ist funktionell eigenständig, wird aber vom Sympathikus und Parasympathikus beeinflusst. Der Sympathikus wirkt dabei hemmend, der Parasympathikus stimulierend (Gabella 1972, 1987). Das ENS hat sein anatomisches Korrelat im Plexus myentericus (PM, synonym: Auerbach Plexus) und im Plexus submucosus (PS, synonym: Meissner Plexus). Der Plexus myentericus ist zwischen der zirkulären- und der longitudinalen Muskelschicht des Darms lokalisiert und für die Steuerung der Motorik zuständig. Der Plexus submucosus liegt zwischen Mukosa und Submukosa und regelt die sekretorische Darmfunktion.

Exzitatorische oder inhibitorische Signale werden über motorische Neurone des ENS sowie über Schrittmacherzellen, die interstitiellen Cajalzellen, an die glatte Muskulatur des Gastrointestinaltraktes weitergeleitet (Olsson et al. 2001). Neben der Cajalzellen werden in dem Review von Blair et al die platelet-derived growth factor receptor alpha-positiven PDGFR α (+)-Zellen als Schrittmacherzellen beschrieben (Blair et al. 2015). Diese fungieren zusammen mit den Cajalzellen als Schrittmacher, die eine gerichtete Kontraktion ermöglichen.

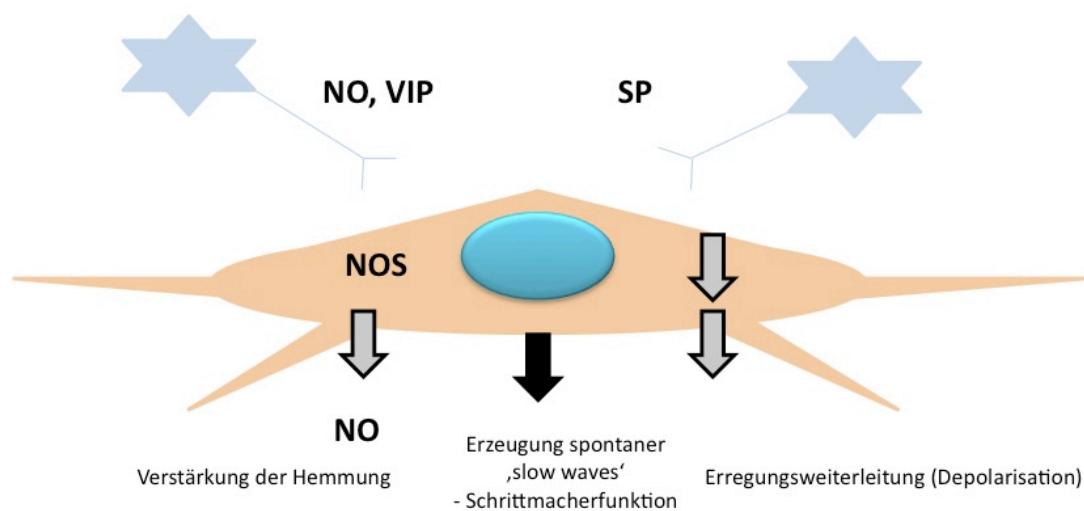


Abbildung 1: Schematische Darstellung einer interstitiellen Cajalzelle (ICC) (modifiziert nach Olsson et al. 2001).

Die Folge ist eine Kontraktion zirkulärer Muskelstränge oralwärts vor einem Chymusbolus und eine Relaxation der aboralen Muskelstränge, was eine nach aboral gerichtete Peristaltik zur Folge hat.

Ausgelöst wird dieser Mechanismus durch die Stimulation endoluminaler Chemo- und Mechanorezeptoren und wird in seiner Gesamtheit als peristaltischer Reflex bezeichnet (Holte et al. 2000, Flemstrom et al. 2005).

1.2 Das extrinsisches Nervensystem

Das extrinsische System beeinflusst das oben beschriebene intrinsische System über den Vagusnerv, die Splanchnikusnerven sowie das Sakralmark. Die Übermittlung der Signale erfolgt durch Neurotransmitter.

1.3 Neurotransmitter im Magen-Darm-Trakt

Exzitatorische Neurotransmitter im Magen-Darm-Trakt sind die Tachykinine Substanz P und Neurokinin A und B (NKA, NKB) sowie Acetylcholin (ACh), Serotonin (5-HT) und das Gastrin-releasing Peptid (GRP). Inhibitorische Transmitter sind das vasoaktive intestinale Peptid (VIP), Gamma-Aminobuttersäure (GABA), Stickstoffmonoxid (NO), Calcitonin Gene-Related Peptide (CGRP), Dynorphin oder Adenosintriphosphat (ATP). Kontraktionen der glatten Darmmuskulatur werden über cholinerge Synapsen und Aktivierung muscarinerger Rezeptoren vermittelt. Muscarine Rezeptoren des Typ 3 (M3) führen zu einer Erhöhung der intrazellulären Kalziumkonzentration in der glatten Muskulatur und lösen so eine Kontraktion aus. M3 aktiviert hierbei zunächst die Phospholipase C (PLC), welche Phosphatidyl-Inositol-Biphosphat (PIP2) in Inositol-Triphosphat (IP3) und Diacylglycerol (DAG) hydrolysiert. IP3 setzt Kalzium aus den intrazellulären Speichern des sarkoplasmatischen Retikulums frei. DAG führt über die Proteinkinase C (PKC) zur Öffnung membranständiger Kalziumkanäle und konsekutivem Kalziumeinstrom.

Die Aktivierung des muscarinen Rezeptor Typ 2 führt zwar nicht direkt zur Auslösung einer Kontraktion, begünstigt diese jedoch durch Senkung des cAMP-Spiegels und wirkt folglich synergistisch (Ostrom et al.1997).

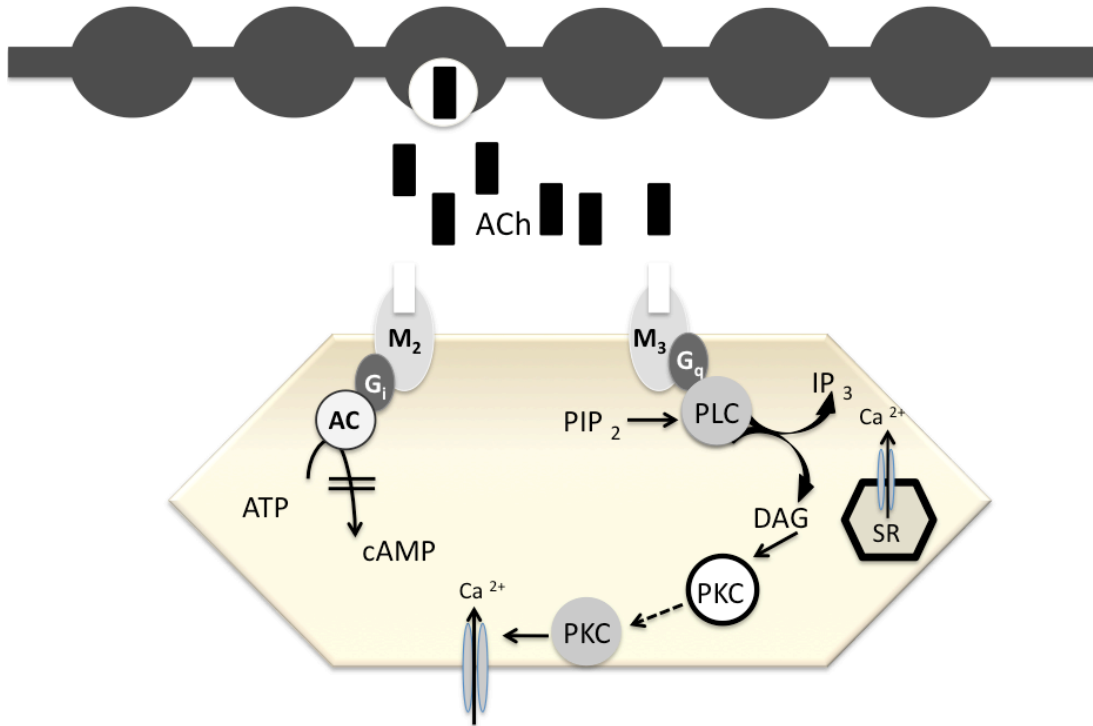


Abbildung 2: Kontraktion auslösende Signalkaskaden, (modifiziert nach Olsson et al. 2001).

Die drei Tachykininrezeptoren NK1, NK2 und NK3 aktivieren ebenfalls die PLC Kaskade (Iversen 1994). Substanz P, NKA und NKB haben eine hohe Affinität zu diesen Rezeptoren. Substanz P kann sowohl direkt auf den Muskel wirken, als auch indirekt die Ausschüttung von ACh oder 5-HT bewirken. Ausschließlich inhibierend wirken u.a. das vasoaktive intestinale Polypeptid (VIP) und Pituitary (Zirbeldrüsen) Adenylatcyclase aktivierendes Polypeptid (PACAP). Durch die Aktivierung der AC (Adenylatcyclase) steigt die intrazelluläre cAMP Konzentration, welche über eine Aktivierung der Proteinkinase A (PKA) und weitere Zwischenschritte zur Muskelrelaxation führt. 5-HT wirkt über eine Vielzahl von Rezeptoren sowohl kontrahierend als auch relaxierend auf den Gastrointestinaltrakt. Der exzitatorische 5-HT_{2a}Rezeptor findet sich auf den glatten Muskelzellen, der 5-HT₃ und der 5-HT₄Rezeptor gehäuft auf cholinergen Neuronen. Inhibitorische Signale werden über 5-HT₂-like und 5-HT₇ Rezeptoren vermittelt (Prins et al. 1999, Woollard et al. 1994, Briejer et al. 1995).

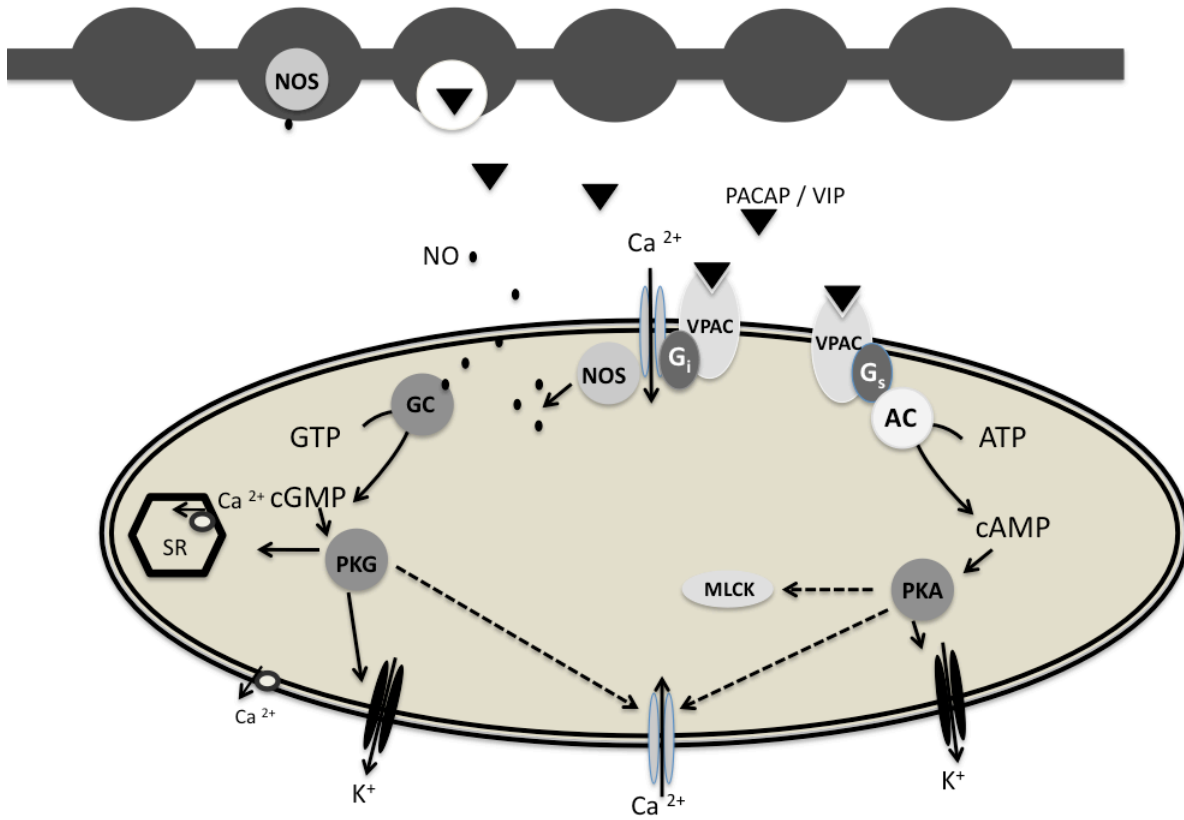


Abbildung 3: Signalkaskaden die zur Hemmung der Kontraktion führen (modifiziert nach Olsson et al. 2001).

1.3.1 Melatonin

Durch Acetylierung der primären Aminogruppe und Methylierung der 5-OH-Gruppe wird aus Serotonin das Neuropeptid Melatonin gebildet (Hardeland 2005).

Melatonin (N-acetyl-5-methoxytryptamin, $C_{13}H_{16}N_2O_2$, Abb.4) wurde 1958 durch Aaron Lerner erstmalig beschrieben (Lerner et al. 1960).

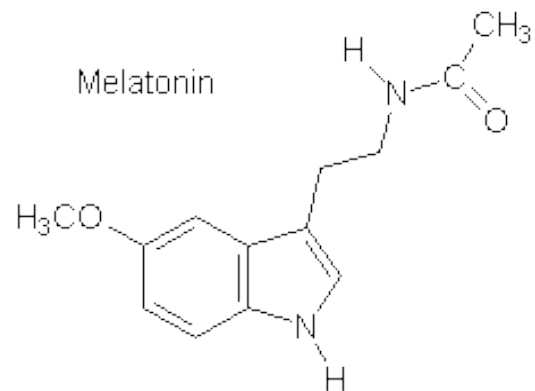


Abbildung 4: Strukturformel des Melatonins

Melatonin wird in der Zirbeldrüse (Pinealdrüse) sowie in den enterochromaffinen Zellen der Magen- und Darmschleimhaut gebildet.

Die Melatoninsynthese der Zirbeldrüse unterliegt einer zirkadianen photoperiodischen Regulation. Melatonin wird nur bei Dunkelheit synthetisiert bei Lichtexposition kommt es zu einer Hemmung der Melatoninsynthese. Kontrolliert wird die Synthese des Melatonins über den Nucleus suprachiasmaticus (SCN), dessen afferente sensorische Bahnen direkt aus der Retina stammen und dies über efferente Bahnen an die Zirbeldrüse weiterleitet (Konturek et al. 2007, vergleiche Abb. 5).

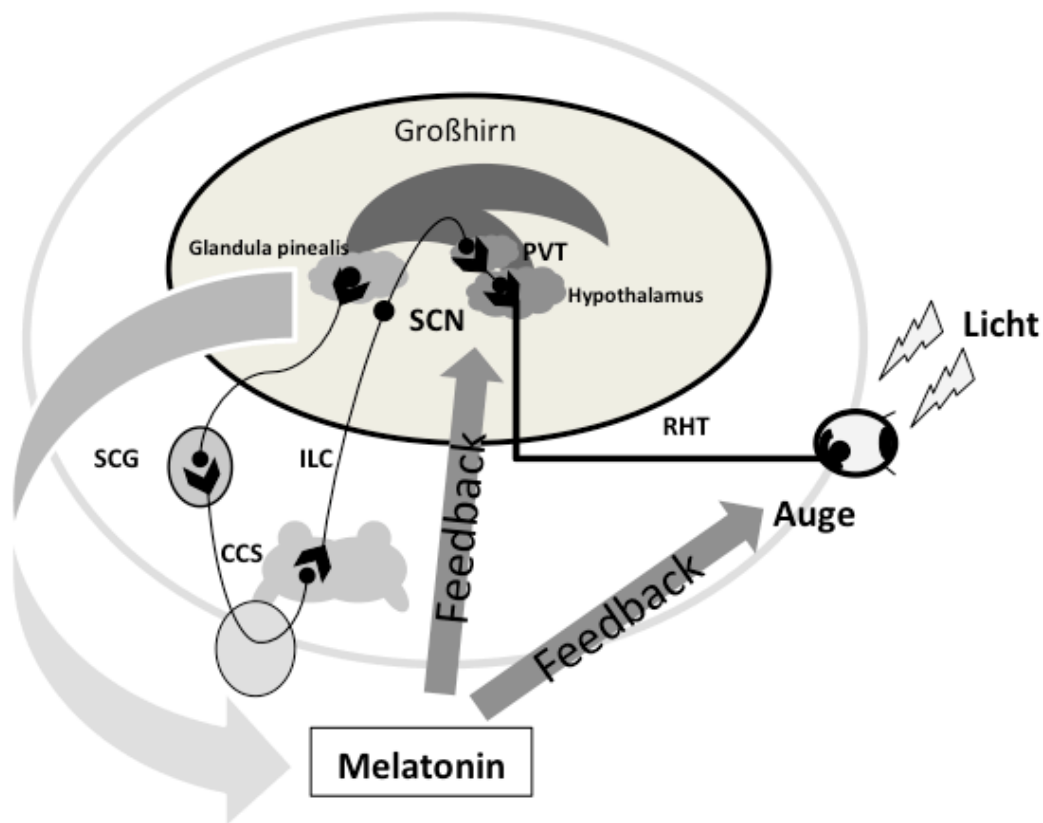


Abbildung 5: Schema zur Kontrolle der Melatoninsekretion aus der Zirbeldrüse (Glandula pinealis) (modifiziert nach Claustrat et al. 2005). Die Verarbeitung des Lichtsignals über den Tractus retino-hypothalamicus (RHT) erfolgt im Nucleus suprachiasmaticus (SCN). Dieser gilt als der primäre, endogene Schrittmacher circadianer Rhythmen. Die Signale des SCN gelangen über verschiedene Zwischenstationen (Nucleus paraventricularis (PVT), thorakales Rückenmark (ILC), Centrum ciliospinale (CCS), Ganglion cervicale superius (SCG)) zur Glandula pinealis, dem zentralnervösen Syntheseort von Melatonin.

Bei Lichtintensitäten von 2000-2500 Lux, wie sie z.B. morgens erreicht werden, kommt es zu einer maximalen Unterdrückung der Melatoninproduktion der Zirbeldrüse (Vakkuri et al. 1985). Tagsüber erfolgt nahezu keine Sekretion, die maximale Plasmakonzentration ist nur nachts messbar (vergleiche Abb. 6).

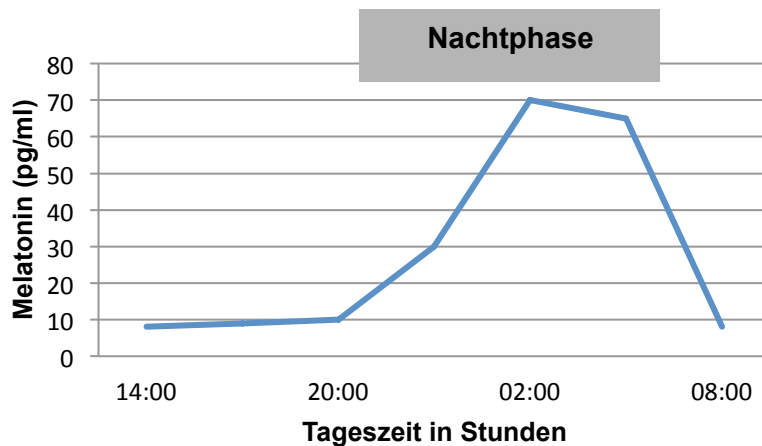


Abbildung 6: Tageszeitabhängiger Melatoninrhythmus beim Menschen (modifiziert nach Reiter 1991).

Die Pinealdrüse der Ratte produziert beispielsweise ca. 0,1-0,2 ng (0,43-0,86 pmol) Melatonin am Tag und bis zu 1-2ng (4,3-8,6 pmol) nachts. Der Plasmaspiegel beträgt ca. 10-20 pg/ml (43-86 pM) am Tag und 80-100 pg/ml (344-430 pM) nachts (Simonneaux et al. 2003). Funktionell ist die Melatoninsynthese der Zirbeldrüsen ein wichtiger Taktgeber für den individuellen Tag-Nacht-Rhythmus. Melatonin nimmt unter anderem Einfluss auf die nächtliche Absenkung der Körpertemperatur, die Regelung des Cortisolrhythmus und die Regulierung der Schlafphasen (Claustrat et al. 2005, Bourne et al. 2006 und 2008). Weiterhin spielt das Melatonin bei einer Vielzahl anderer Körperfunktionen eine Rolle, es ist ein effizienter Fänger freier Radikale, reguliert immunologische Vorgänge und wirkt antiproliferativ bei Tumorerkrankungen (Baydas et al. 2002, Reiter et al. 2000, Tan et al. 2000, Bubenik 2002). Der Katabolismus erfolgt zu mehr als 90% in der Leber. Cytochrom P450 1A1 und 1A2 hydroxylieren Melatonin zu 6-Hydroxymelatonin (Skene et al. 2001). 6-Hydroxymelatonin wird mit Sulfat oder Glucuronid konjugiert und über den Urin ausgeschieden. Weniger als 5 % des Melatonins gelangen ohne Metabolisierung direkt in den Urin (Claustrat et al. 2005, Lüdemann et al. 2001). Die Eliminationshalbwertszeit aus der Blutbahn beträgt ca. 20 Minuten (Gibbs et al. 1981). Melatonin ist sowohl lipophil als auch

hydrophil und damit in der Lage biologische Barrieren (wie z.B. die Serosa des Dünndarms) zu durchdringen.

Im Gastrointestinaltrakt wurde Melatonin erstmals 1974 durch Raikhlín und Kvetnoy entdeckt (Raikhlín et al. 1974, Jaworek et al. 2005). Die Synthese findet in den enterochromaffinen Zellen der Magen- und Darmmukosa statt. Zudem erfolgt eine Resorption aus melatoninhaltiger Nahrung (Dubbels 1995, Reiter 2001). Die Produktion im Magen-Darm-Trakt ist im Gegensatz zur Produktion in der Zirbeldrüse lichtunabhängig. Trigger der Melatoninproduktion ist die Nahrungsaufnahme (Huether 1994, Bubenik 1996 und 2000), so dass die Melatoninausschüttung aus dem Magen-Darm-Trakt in der Regel am Tage erfolgt. Bei pinealektomierten Patienten bleiben die am Tage gemessenen Melatoninspiegel weitestgehend unbeeinflusst, die nächtlichen Melatoninspiegel sinken dann ab (Vaughan 1986, Kennaway 1977). Weiter erfüllt der Magen-Darm-Trakt eine Speicherfunktion von Melatonin (Huether 1994). Führt man Melatonin parenteral zu, so kommt es zu signifikanten Konzentrationserhöhungen in den Lieberkühnschen Krypten des Magen-Darm-Trakts (Bubenik 1998 und 1980, Kopin 1961, Huether 1992 siehe auch Tab. 1).

Tabelle 1: Modifiziert nach Bubenik 2002

| Vergleich von Melatonin aus der Pinealdrüse und dem Magen-Darm-Trakt bei Säugern | | |
|--|---------------|--|
| Produktionsort | Pineal Drüse | Enterochromaffine Zellen des Magen-Darm-Trakts |
| Sekretionsrhythmik | circadian | konstant oder episodisch |
| Art der Ausschüttung | sofort | nach Bedarf (nahrungsabhängig) |
| Akkumulation durch Zirkulation | nachgewiesen | nachgewiesen |
| Chronische Unterernährung | senkt ↓ | steigert ↑ |
| Antwort auf Nahrungsaufnahme | keine Antwort | steigert ↑ |

Bei perioperativen Konzentrationsbestimmungen von Melatonin im Blut zeigte sich ein deutlicher Konzentrationsabfall am ersten postoperativen Tag. Demzufolge haben wahrscheinlich auch die Narkose und der operative Eingriff Einfluß auf den Melatoninspiegel und unter Umständen auch auf die zirkadiane Rhythmik.

1.3.1.1 Melatoninrezeptoren

Die „International Union of Basic and Clinical Pharmacology“ unterscheidet zwei Melatoninrezeptoren, MT1 und MT2. Diese sind G-Protein gekoppelte Membranrezeptoren und regeln eine Vielzahl an physiologischen und neuroendokrinen Funktionen. Die frühere Nomenklatur Mel1a bzw. Mel1b wird nicht mehr verwandt, ebenso wird der MT3-Rezeptor in der aktuellen Klassifikation nicht mehr berücksichtigt. Er wurde mittlerweile als Quinon-Reduktase-2 identifiziert, ein Enzym, das bei der Bewältigung oxidativen Stresses eine Rolle spielt (Nosjean et al. 2000).

MT1 wird im Organismus ubiquitär exprimiert. Die Funktion des Rezeptors wird durch das an ihn gekoppelte G-Protein vermittelt. Da MT1 mit unterschiedlichen G-Proteinen auf unterschiedlichsten Geweben interagiert, sind seine Funktionen vielfältig. Unter anderem werden SCN, Cerebellum, Hippocampus, zentrale dopaminerge Regionen des Gehirns, Ovarien, Hoden, Brustdrüse, Retina, Herzkranzgefäße, Aorta, Leber, Nieren, Gallenblase, Haut und das Immunsystem über den MT1-Rezeptor beeinflusst (Dubocovich 2005, Uz 2005, Clemens 2001, Pozo 2004, Frungieri 2005, Naji 2004 und Pandi-Perumal 2008). Die höchsten Transkriptionslevel der MT1-Rezeptor-mRNA finden sich im Duodenum (Soták et al. 2006).

Der MT2-Rezeptor wird weniger häufig exprimiert, oftmals gemeinsam mit dem MT1-Rezeptor. Der funktionelle Unterschied zum MT1-Rezeptor ist subtil. Es gibt Hinweise, dass die Wirkung von Melatonin auf die Darmaktivität über den MT2-Rezeptor vermittelt wird (Witt-Enderby 2003 und Lucchelli 1997). Die Abb. 7 stellt die beschriebenen Funktionen der Melatoninrezeptoren schematisch dar.

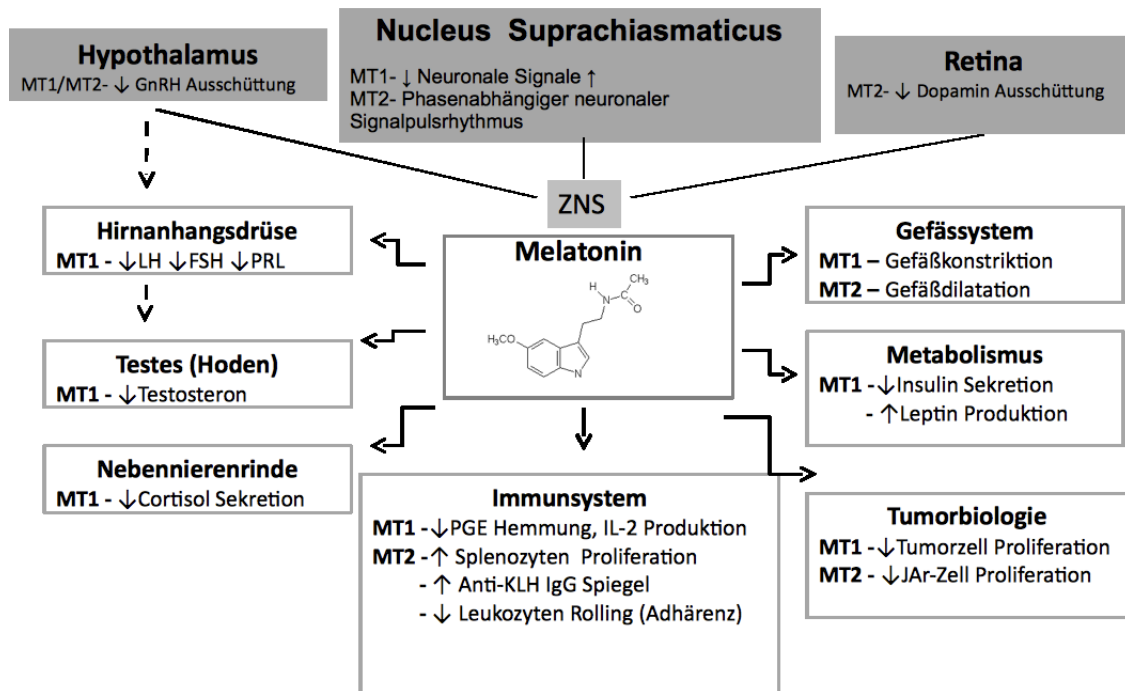


Abbildung 7: Melatoninrezeptorfunktionen (MT1 und MT2) im zentralen Nervensystem und an peripheren Oberflächen (Dubocovich L. et al 2005).

Im Gastrointestinaltrakt waren Melatoninrezeptoren durch den radioaktiv markierten Melatoninrezeptoragonisten 2-[125]-Indomelatonin darstellbar. Dabei zeigten sich über den gesamten Magen-Darm-Trakt unterschiedliche Rezeptorkonzentrationen und Bindungsaffinitäten (Lee and Pang 1993, Pontoire et al. 1993). Die höchste Dichte besteht im Colon und Jejunum. Dabei werden MT1 und MT2 Rezeptoren exprimiert, wobei der MT2 Rezeptor zu dominieren scheint (Konturek et al. 2007 a) und b)).

1.3.1.2 Einfluß von Melatonin auf den Gastrointestinaltrakt

Melatonin hat vielfältige, zum Teil gegensätzliche Effekte auf den Gastrointestinaltrakt.

Ein inhibitorischer Einfluß beruht darauf, dass Melatonin die exzitatorische Wirkung des Serotonins auf die Darmmotilität aufhebt (Briejer 1995, Quastel 1965, Fioretti 1974). Ferner konnte in Untersuchungen bei Ratten gezeigt werden, dass serotonininduzierte Darmspasmen nach Melatoningabe sistierten und in eine geordnete Peristaltik übergingen. Wurde Melatonin vor Serotonin appliziert, traten keine Darmspasmen auf. Diese Beobachtung konnte sowohl *in vitro*, wie auch *in vivo* nachgewiesen werden (Bubenik 1989).

Auch bei der Dünndarmmotilität wird ein Einfluss des endogenen Melatonins vermutet (Merle et al. 2000). So wird der Migrating motor complex (MMC), eine von oral nach aboral verlaufende Kontraktionswelle während der interdigestiven Phase durch Melatoninantagonisten inhibiert. Wurde Melatonin vor der Nahrungsaufnahme intravenös injiziert, war der stimulierende Effekt auf den MMC verstärkt. Fand die Injektion nach der Nahrungsaufnahme statt, so hatte das exogen zugeführte Melatonin keinen Einfluss auf den MMC (Merle et al. 2000).

Chen (2011) führt in seiner Arbeit weitere Ansätze der melatoninvermittelten Wirkungen am Gastrointestinaltrakt aus. Zum einen hemmt Melatonin über Aktivierung sympathischer Neurone die Magenmotilität. Zum anderen diskutiert Chen die Änderung der Stickoxidsynthaseaktivität (NOS) durch Melatonin in den enterischen Synapsen (Chen et al. 2011).

Auch bei geringen Melatoninindosen konnte Drago eine Stimulation der intestinalen Motilität zeigen (Drago 2002). Zudem hat Melatonin eine spasmolytische Wirkung auf die glatte Muskulatur des Darms, was zu einer Verbesserung der Schleimhautdurchblutung und konsekutiv besseren Heilung von Ulcera führt. Spasmolytische Effekte durch Melatonin werden nicht nur im Gastrointestinaltrakt, sondern auch in anderen Organssystemen, wie der Lunge und dem Gefäßsystem beobachtet (Rahamimoff 1965, Viswanathan 1990).

Weiterhin wirkt Melatonin antioxidativ und damit antiinflammatorisch. In Studien wurden positive Wirkungen bei der Behandlung von Kolitiden oder zur Prävention von gastrointestinalen Ulcera nachgewiesen (Terry 2009). Nach Melatoningabe wird zudem eine quantitative Zunahme der Peyerschen Plaques beobachtet, dem Ort der gastrointestinalen Immunabwehr, so dass ein Einfluß auf das enterische Immunsystem anzunehmen ist (Maestroni 1993).

1.4 Störungen der Darmmotilität

Wie eingangs erwähnt, sind bei kritisch kranken Patienten in der Intensivmedizin Störungen der Magen-Darm-Motilität, insbesondere der propulsiven Peristaltik, häufig zu beobachten. Die Ursachen hierfür sind vielfältig. Hierzu zählen sowohl präexistente internistische und neurologische

Erkrankungen, als auch motilitätshemmende Pharmaka (Herbert 2008). Zudem hat postoperativer Schmerz *per se* einen hemmenden Einfluss auf die Dünndarmperistaltik (Woods 1978). Häufig in der Intensivmedizin eingesetzte Medikamente mit hemmender Wirkung auf die Darmmotilität sind Analgetika, z.B. die Opioide (Fentanyl) und Sedativa, wie Midazolam und Propofol (Wood 2004, Taguchi 2001, Herbert 2000).

1.4.1 Wirkmechanismus von Fentanyl auf die Darmmotilität

Fentanyl ist ein zu den Opioiden gehörendes stark wirksames Analgetikum. Die Halbwertszeit beträgt 3-4 h. Es hemmt die Ausschüttung von ACh aus dem mesenterialen Plexus. Hierdurch erhöht sich der Tonus der Darmmuskulatur, bei gleichzeitiger Hemmung der propulsiven Aktivität (Frantzides 1992, Schang 1986 und Aitkenhead 1984).

1.4.2 Wirkmechanismus von Propofol auf die Darmmotilität

Propofol ist ein in der Intensivmedizin häufig benutztes Hypnotikum (Lund 1995). Trotz neuer Erkenntnisse in den letzten Jahren ist über den Wirkmechanismus von Propofol wenig bekannt. Es gibt kontroverse Meinungen über die Beteiligung des GABA_A-Rezeptors an der Propofolwirkung. Zwar wird die Propofolwirkung durch Bicucullin (GABA_A-Antagonist) nicht beeinflusst (Little 2000), jedoch wird vermutet, dass Propofol GABA_A-Rezeptoren ohne die Mitwirkung von GABA aktiviert und somit Einfluß auf die Darmmotilität nimmt (Mohammadi 2001). Des weiteren wurde eine dosisabhängige Wirkung von Propofol auf die Darmmotilität nachgewiesen (Berg et al. 2000).

1.4.3 Wirkmechanismus von Midazolam auf die Darmmotilität

Midazolam gehört zu den Benzodiazepinen. Untersuchungen von Wenderoth (Wenderoth 2002) zeigten, dass die inhibitorischen Effekte von Midazolam auf die Darmmotilität durch Stimulation opioidergere enteraler Hemmmechanismen

und kalziumabhängiger Kaliumkanälen vermittelt werden und nicht wie ursprünglich angenommen über GABA-Rezeptoren induziert werden. Die inhibitorische Wirkung von Midazolam auf die Dünndarmperistaltik ist stärker als die des Propofols (Berg 2000).

1.5 Ziel der Arbeit

In der vorliegenden Arbeit wird in einer *in vitro*-Präparation mit Meerschweinchenileum die Wirkung des Melatonins sowie von Agonisten und Antagonisten am Melatoninrezeptor auf die Dünndarmperistaltik untersucht. Da dem Melatonin in verschiedener Hinsicht eine protektive Wirkung zugeschrieben wird, folgten Untersuchungen über die Modulation der Hemmwirkung von Fentanyl, Midazolam und Propofol durch Melatonin. Ferner interessierte, ob die Beeinflussung der Peristaltik durch Hypoxie durch Melatonin verändert wird.

2 Materialien und Methoden

2.1 Versuchsaufbau und Versuchstiere

Trendelenburg zeigte bereits 1917, dass sich spontane peristaltische Aktivitäten am entnommenen Meerschweinchendünndarm durch intraluminale Drucksteigerung Persitalik auslösen lässt (Trendelenburg 1917). Das von uns verwendete Perfusionssystem entspricht dem von Holzer und Maggi weiterentwickelten Versuchsaufbau (Holzer und Maggi 1994). In diesem kann unter kontrollierten Bedingungen sowohl die Peristaltik durch intraluminale Drucksteigerung ausgelöst werden, als auch eine quantitative Registrierung des intraluminalen Drucks und der Kontraktionsfrequenz erfolgen.

Für die Untersuchung wurden Meerschweinchen der Firmen Charles River und Harlan Winkelmann verwendet. Im Lauf der Versuchsreihen musste wegen Lieferschwierigkeiten der Stamm BFA auf den Stamm DH (Dunkin-Hartley)

umgestellt werden. Hinsichtlich der Untersuchungsergebnisse zeigten sich keine Unterschiede zwischen den beiden Tierstämmen. Die Untersuchungen waren der Genehmigungsbehörde bei der Regierung von Unterfranken in Würzburg angezeigt. Die männlichen (n=69) und weiblichen (n=11) Tiere mit einem durchschnittlichen Gewicht von $405\text{g} \pm 11,6\text{g}$ wurden in dem Tierstall der Universitätsklinik Würzburg über mehrere Tage nach Lieferung unter konstanten Bedingungen ($20\text{-}22^\circ\text{C}$, 12:12 Tag-Nacht-Rhythmus) gehalten und hatten freien Zugang zu Trockenfutter und Wasser ad libitum bis zwei Stunden vor Versuchsbeginn.

2.1.1 Präparation am Meerschweinchendünndarm

Die Tiere wurden durch Genickschlag betäubt und durch Eröffnung der Karotiden und Ausbluten getötet. Dies erfolgte immer zwischen 8-12 Uhr. Nach Öffnung des Abdomens durch einen Längsschnitt wurde der Dünndarm präpariert. Begonnen wurde ca. 10 cm ab der Ileocoecalklappe bis zum oralen Ende des Jejunums. Das Präparat wurde am aboralen Teil mit einem Bindfaden markiert und in 37°C warme Tyrodelösung gegeben. Es wurde sorgfältig darauf geachtet, dass der Darm bei der Präparation nicht direkt mit der Schere und Pinzette berührt wurde, um Schäden durch Zug oder Druck zu vermeiden.

2.1.2 Versuchsanordnung

Jedes etwa 10cm lange Darmsegment wurde am oralen Ende an einem Zuflussröhrchen und am aboralen Ende an einem gläsernen Abflussröhrchen mit je zwei Bindfäden fixiert (Abb.8 und 9). Diese Röhrchen befanden sich an einer Halterung, durch welche das Segment horizontal in das Organbad eingebracht wurde.

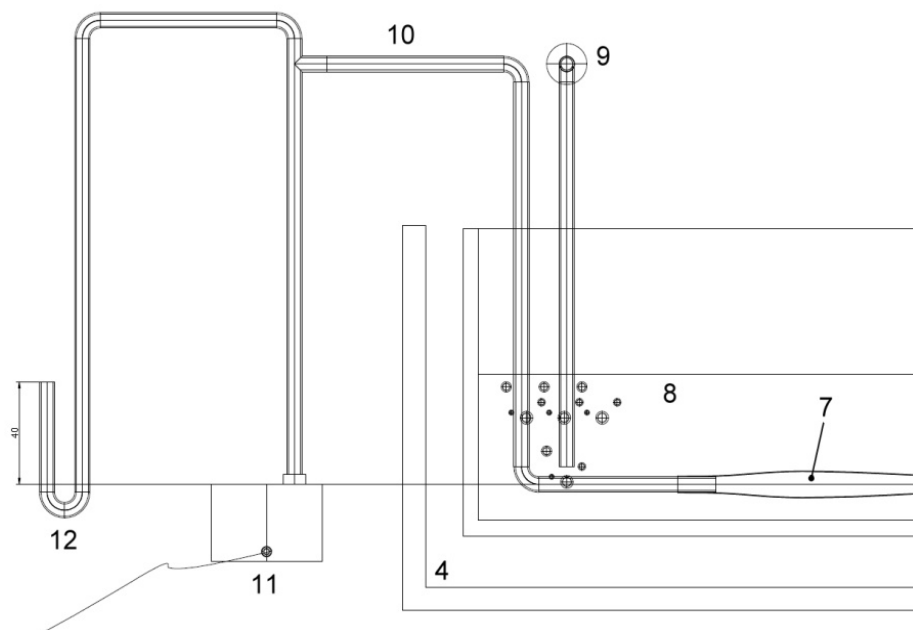


Abbildung 8 (Teilansicht): Wärmebecken der Versuchsanordnung (4), Dünndarmsegment (7), Organbad mit Tyrodelösung (8) und Oxygenierungszufuhr (9) für das Organbad (4), Abflussschenkel vom Dünndarmsegment (10), Drucktransducer (Druckmesser) (11), Ablaufröhrchen (12).

Das silanisierete Glasorganbad wurde mit 30 ml Tyrodelösung befüllt und durch das umgebende Wärmebecken auf konstant 37 °C Temperatur gehalten. Die kontinuierliche Oxygenierung erfolgte mit Carbogen, einem Gasgemisch aus 95% O₂ und 5% CO₂ (Holzer 1998). Bei den Hypoxieversuchen wurde ein anoxisches Gasgemisch aus 95% N₂ und 5% CO₂ verwendet.

Die Versuchsanlage mit einer Rollerpumpe (IDEX Cop., ISAMTEC Typ ISM 931) ermöglicht eine konstante Perfusion mit einem Fluss von 0,5 ml/min Tyrodelösung. Die allmähliche Füllung des Dünndarmes führt zum Anstieg des

intraluminalen Druckes, bis bei einem Schwellendruck ein peristaltischer Reflex ausgelöst wird (Abb. 10). Der hierfür nötige Druck im Darmlumen wird über ein vertikal angebrachtes Ablaufröhrchen am Ende der Apparatur erreicht, dessen Öffnung 4 cm über dem Dünndarmniveau liegt und einem Druck von 400 Pa entspricht (Bartho1995, Costall1993). Das Ablaufröhrchen ist zur Registrierung des intraluminalen Druckes über einen Y-Schenkel mit einem Drucktransducer (Combitrans, Braun) verbunden.

Die Signale wurden in einen Verstärker (PeriCo, Fa. BiomedTech RS) geleitet und auf einem 6-Kanal X-Y-Schreiber (Multi-Pen Recorder, Fa. Rikadenki) und über eine RS-232 Schnittstelle in einem Computer aufgezeichnet. Die durch ein Computerprogramm ausgegebene Originalregistrierung ist in Abb. 10 dargestellt.

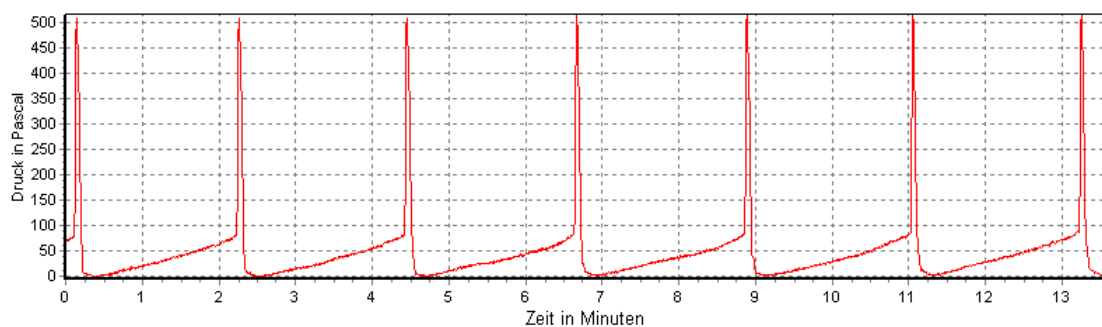


Abbildung 10: Originalregistrierung peristaltischer Kontraktionen.

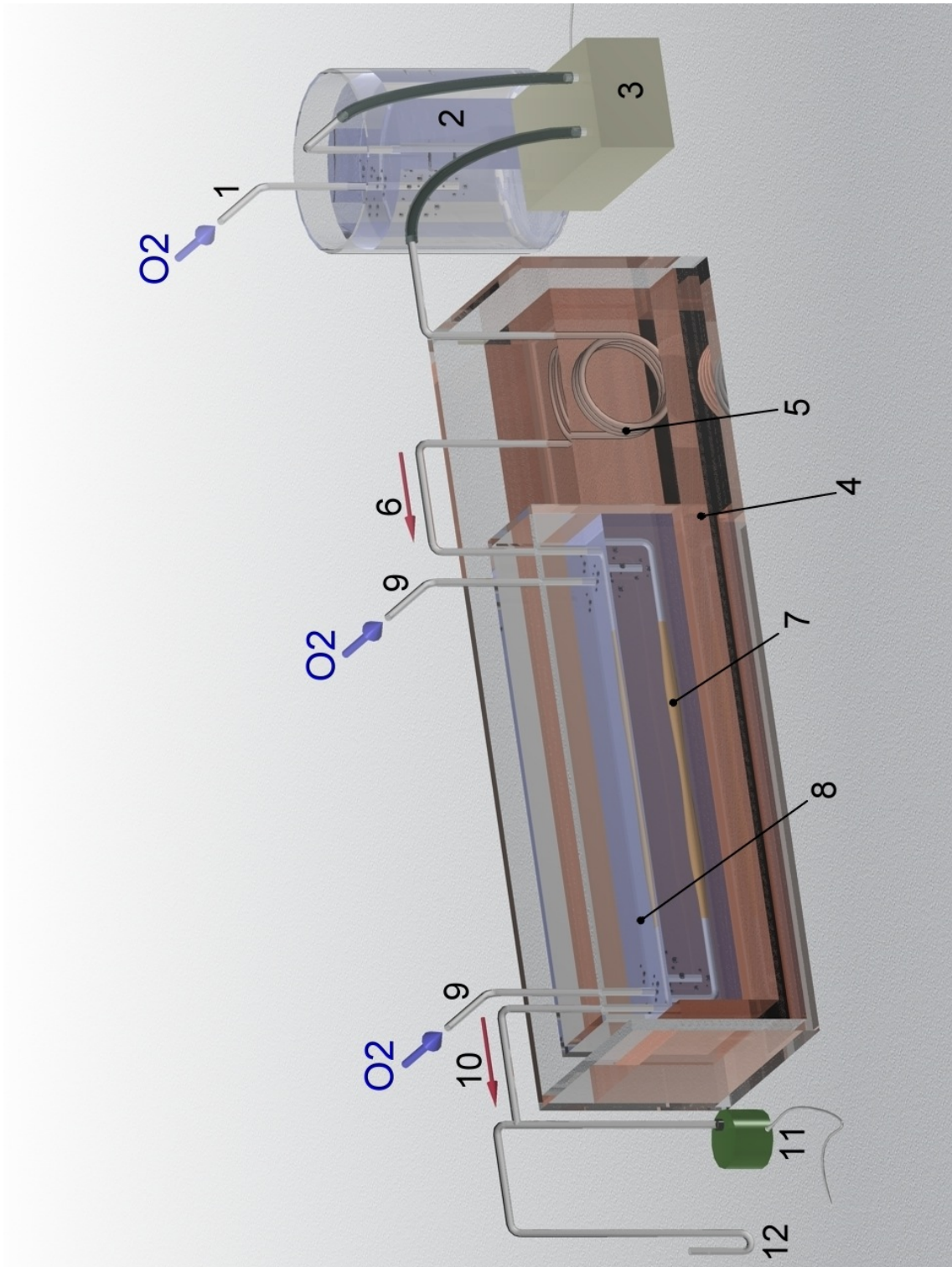


Abbildung 9: Versuchsaufbau: Carbogenzufuhr (1) des Thyrodevorratsbehälters (2). Rollerpumpe (3), Wärmebecken der Versuchsanordnung (4), Heizspirale zum Vorwärmen der Thyrodelösung (5), Thyrodelösungszufluss (6), zum Dünndarmsegment (7), Organbad mit Thyrodelösung (8), Carbogenzufuhr (9) für das Organbad, Abflussschenkel vom Dünndarmsegment (10), Drucktransducer (Druckmesser) (11), Ablaufröhrchen (12).

In der sogenannten präparatorischen Phase (Phase 1) am Anfang der Befüllung steigt der intraluminale Druck bis zum Erreichen des Schwellendrucks (PPT, peristaltic pressure threshold) linear an. Wird der Schwellenwert zur Auslösung einer Kontraktion erreicht und eine peristaltische Welle ausgelöst, stellt sich die daran folgende Austreibungsphase (Phase 2) in der Registrierung als Spike dar (siehe Abb.11).

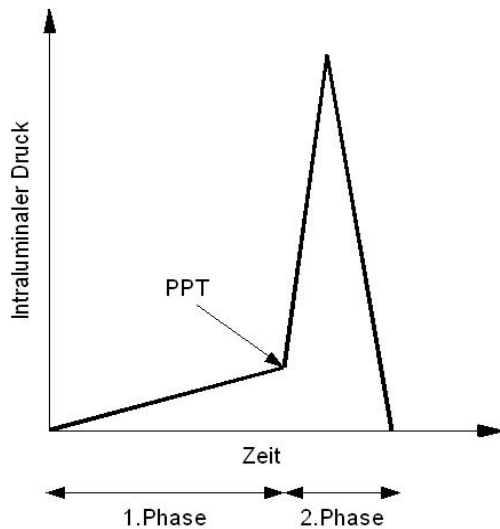


Abbildung 11: Schema Schwellendruck PPT (nach Holzer 1994).

Im Organbad können diese Phasen beobachtet werden, wie in den Abb. 12 und 13 zu sehen ist.

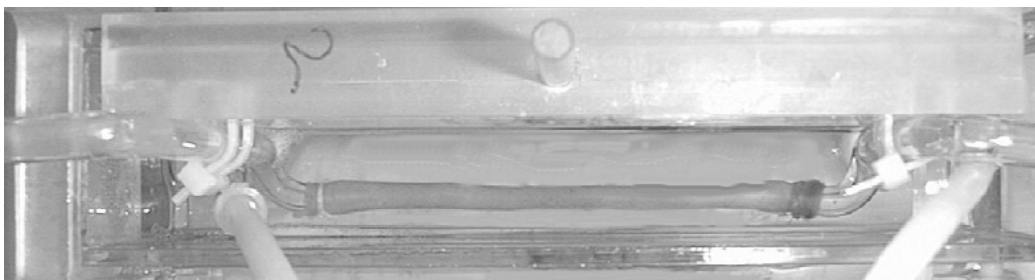


Abbildung 12: Füllphase (Darmlumen dilatiert)

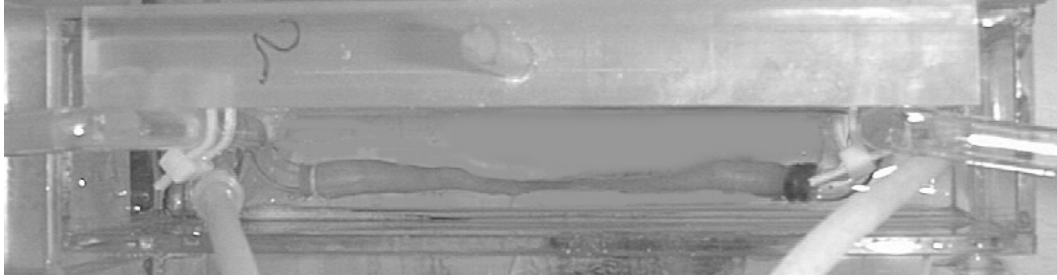


Abbildung13: Austreibungsphase (Darmlumen kontrahiert)

2.2 Versuchsdurchführung

In der Versuchsanordnung war eine gleichzeitige Registrierung von fünf Darmsegmenten möglich. Nach der Befestigung des Darmes in der Halterung wurde dieser im Organbad für 30 min äquilibriert. Der Darm war keinem hydrostatischen Druck ausgesetzt. Die Segmente wurden zur Reinigung vorsichtig mit Tyrodelösung durchgespült und danach für 10 min zur Vermeidung von Artefakten in Ruhe belassen. Der Organbadinhalt (30 ml Tyrodelösung) wurde nach der Äquilibrationsphase ausgetauscht. In der dann folgenden Anpassungsphase wurde die intraluminale Perfusion des Darms mit Tyrodelösung gestartet und die Öffnung des Ablaufröhrchens auf 4 cm Wassersäule über dem Darmsegmentniveau eingestellt (siehe Abb. 8). Hierdurch wurde der hydrostatische Druck auf 400 Pa angehoben und im Meerschweinchendarm die Ausbildung peristaltischer Kontraktionen induziert. Die Registrierung dieser Peristaltik erfolgte analog auf dem X-Y-Schreiber und digital im PC. Zur Anpassung an das neue Druckniveau und die Perfusion erfolgte nun eine Ruhepause von ca. 20-30 min. Sobald die Kontraktionen regelmäßig waren und ein konstanter Schwellendruck gemessen wurde, konnte der Versuch an diesem Darmsegment beginnen. Waren auch nach längerer Beobachtungsphase keine gleichmäßigen Kontraktionen registrierbar, wurde das entsprechende Darmsegment verworfen. Zu Beginn der Versuchsreihe wurde eine Vorlaufphase von 5 regelmäßigen Kontraktionen abgewartet. Erst dann erfolgte die Zugabe der ersten Testsubstanz in das Organbad. Eine

zweite Substanz wurde je nach Versuchsprotokoll 20 bzw. 60 min nach der ersten Substanz hinzugegeben (siehe Tab. 2).

Tabelle 2: Versuchsprotokoll

| | Aquilibration | Anpassung/ Vorlauf | 1.Applikation | 2.Applikation |
|---------------------|--------------------------------------|-----------------------|---------------|--|
| Zeit [min] | 10 | 20-30 | | |
| Registrierung [min] | | | 20-60 | 60-120 |
| Perfusion: | aus | an | an | an |
| Oxygenierung: | 95%O ₂ +5%CO ₂ | | | 95%O ₂ +5%CO ₂ 95%N ₂ +5%CO ₂ |
| Druckniveau [Pa] | 0 | 400 | 400 | 400 |

Die standardisierte Applikationsmenge der Substanzen entsprach maximal 1% des Organbadvolumens und hatte damit einen vernachlässigbaren Einfluss auf das Organbadvolumen. In den hier durchgeführten Protokollen wurden die Substanzen stets extraluminal in das Organbad appliziert. Jede Versuchsreihe wurde an mindestens sechs Darmsegmenten unterschiedlicher Versuchstiere und unterschiedlicher Lokalisation im Dünndarm durchgeführt (Holzer 1994).

Am Ende der Untersuchungen erfolgte die Bestimmung des Kalibrierungsfaktors für die Registrierung der Druckänderung von 0 auf 400 Pa.

2.3 Substanzen, Konzentrationen und Versuchsreihen

Im Folgenden sind die in den Versuchsreihen verwendeten Substanzen und ihre Hersteller sowie die getesteten Konzentrationen aufgeführt. Alle Medikamente wurden initial in Aqua dest. gelöst (siehe Tab. 3). Weitere Verdünnungsreihen der Substanzen wurden mit Tyrodelösung hergestellt. Die Tyrodelösung setzten sich zusammen aus: NaCl 136.9, KCl 2.7, CaCl₂ 1.8, NaHCO₃ 11.9, MgCl₂ 1.0, NaH₂PO₄ 0.4, Glukose 5.6, alle in [mM].

Tabelle 3: Substanzen, Konzentrationen und Hersteller

| Name | Lieferant | Funktion der Substanz | Getestete Konzentration |
|--|------------------------------------|--|---------------------------------------|
| Oxygenierungsgemisch (Carbogen) | Messner/Griesheim Spezialgase GmbH | Oxygenierung der Organbäder | 95%O ₂ + 5%CO ₂ |
| Hypoxie Gasgemisch | Messner/Griesheim Spezialgase GmbH | Hypoxie der Organbäder | 95%N ₂ + 5%CO ₂ |
| Fentanyl | Janssen-Cilag GmbH | Potenter Opioid-rezeptoragonist HWZ: 3-12h | 3 nM |
| Midazolam | Fa. Roche | Fördert durch Bindung an Benzodiazepinbindungsstelle die hemmende Wirkung von GABA HWZ: 2-3 h | 1 µM, 3 µM, 10 µM, 30 µM |
| Propofol (Lipuro) | Fa. B. Braun | Injektionsnarkotikum HWZ: ca. 1h | 50 µM |
| Melatonin: N-acetyl-5-methoxytryptamin | Sigma Chemical Co., Natick, U.S.A. | Melatoninrezeptoragonist HWZ: 20-94 min | 10 pM, 1 nM, 0,1 mM, 10 µM |
| LM-Melatonin | | Lösungsmittel für Melatonin (Tyrodelösung) | |
| Luzindol: N-Acetyl-2-benzyltryptamine | Sigma-Aldrich Inc. | Melatonin Antagonist der MT1 und MT2 Rezeptoren | 1 µM und 10 µM |
| DMSO (Dimethylsulfoxid) | | Lösungsmittel | |
| 2-Phenylmelatonin | Tocris | partieller Agonist am Melatoninrezeptor | 100 nM und 10 µM |
| 8-M-PDOT: 8-Methoxy-2-propionamidotetralin | Tocris | voller Agonist aller Melatoninrezeptoren | 100 nM und 10 µM |
| LM-2-Phenylmelatonin/ LM-8-M-PDOT: | | Lösungsmittel der beiden Substanzen (Ethanol im | |

| | | | |
|-------------|-----------|---|---------|
| | | Verdünnungsverhältnis 1:10 mit Tyrodelösung) | |
| LM Luzindol | | Lösungsmittel für Luzindol (DMSO) | |
| Ethanol | JT. Baker | Lösungsmittel | > 99,9% |

2.3.1 Wirkung von Melatonin

Zur Bestimmung der Konzentrations-Wirkungs-Beziehung von Melatonin wurden nach 10 min Vorlaufzeit bei je 6 Darmsegmenten Melatonin in den Konzentrationen 10 pM, 1 nM, 0,1 µM und 10 µM zugeführt. Die peristaltische Darmaktivität wurde anschließend über einen Zeitraum von 60 min aufgezeichnet. Die effektivste Konzentration wurde für die weiteren Versuche verwendet.

2.3.2 Wirkung von Melatoninrezeptoragonisten und -antagonisten

Nach 10-minütiger Vorlaufzeit wurde bei je 6 Darmsegmenten entweder der partielle Agonist 2-Phenylmelatonin und der Agonist 8-M-PDOT in den Konzentrationen 100 nM und 10 µM getestet. Der Antagonist Luzindol wurde in den Konzentrationen 1 µM und 10 µM getestet. Als Kontrollexperiment wurden die jeweiligen Lösungsmittel (=LM) in das Organbad gegeben. Die Peristaltik wurde anschließend über einen Zeitraum von 60 min aufgezeichnet.

2.3.3 Wechselwirkung von Melatonin mit Analgetika und Sedativa

2.3.3.1 Melatonin / Luzindol mit Midazolam

Nach 10-minütiger Vorlaufphase wurden je 8 Darmsegmente für 20 min entweder mit Tyrodelösung (Kontrolle), 10 µM Melatonin oder 10 µM Luzindol vorbehandelt und dann jeweils Midazolam in einer Konzentration von 10 µM zugegeben. Die Peristaltik wurde nach der zweiten Zugabe über einen Zeitraum von 60 min aufgezeichnet.

2.3.3.2 Melatonin / Luzindol mit Fentanyl

Nach 10-minütiger Vorlaufphase wurden je 8 Darmsegmente für 20 min entweder mit Tyrodelösung (Kontrolle), 10 μM Melatonin oder 10 μM Luzindol vorbehandelt und dann jeweils Fentanyl in einer Konzentration von 3 nM zugegeben. Die Peristaltik wurde nach der zweiten Zugabe über einen Zeitraum von 60 min aufgezeichnet.

2.3.3.3 Luzindol Konzentrations-Wirkungsbeziehung mit Midazolam

In dieser Versuchsreihe wurde Midazolam in unterschiedlichen Konzentrationen nach Vorbehandlung mit Luzindol gegen eine Kontrollreihe untersucht.

In jeder Midazolamgruppe wurde entweder eine Vorbehandlung mit Tyrodelösung (Kontrolle) oder Luzindol in der Konzentration von 10 μM über 20 min durchgeführt. Anschließend wurde Midazolam in den Konzentrationen von 1 μM , 3 μM , 10 μM und 30 μM hinzugegeben und die Peristaltik über 60 min aufgezeichnet.

2.3.3.4 Propofol

2.3.3.4.1 Melatonin Konzentrations-Wirkungsbeziehung mit Propofol

Nach 10-minütiger Vorlaufzeit wurde bei je 6 oder 7 Darmsegmenten entweder Melatonin in den Konzentrationen 10 pM, 1 nM, 0,1 μM oder 10 μM in das Organbad gegeben. Als Kontrolle wurde ein Versuch mit Tyrodelösungsvorbehandlung durchgeführt. 20 min nach Substanz- oder Tyrodelösungzugabe erfolgte die Applikation von 50 μM Propofol in das Organbad. Der anschließende Beobachtungs- und Registrierzeitraum betrug 60 min.

Zusätzlich wurde eine Kontrollreihe (6 Segmente) nach 10-minütigem Vorlauf und anschließender Gabe von 10 μM Melatonin durchgeführt. Nach 20 min Registrierung der Peristaltik wurde Tyrodelösung (Kontrolle) zugegeben und weitere 60 min aufgezeichnet.

2.3.3.4.2 Vorbehandlung mit Luzindol und nachfolgender Propofolapplikation

Bei je 8 Segmenten wurden nach 10-minütiger Vorlaufzeit 10 μM Luzindol oder Tyrodelösung (Kontrolle) zugegeben. Danach wurde über 20 min die Darmperistaltik gemessen. Anschließend wurden 50 μM Propofol in das Organbad appliziert und erneut die Darmperistaltik registriert.

Die Peristaltik wurde bei den Versuchsreihen wieder über 60 min nach Zugabe von Propofol oder Tyrodelösung registriert.

In einem Kontrollexperiment wurde die peristaltische Darmaktivität nach 10 μM Luzindol über 20 min und der zweiten Zugabe von Tyrodelösung über 60 min aufgezeichnet.

2.3.3.4.3 Vorbehandlung mit dem partiellen Agonisten 2-Phenylmelatonin oder dem Agonisten 8-M-PDOT und nachfolgender Propofolapplikation

Nach 10-minütiger Vorlaufphase wurden je 6 Darmsegmente für 20 min entweder mit Tyrodelösung (Kontrolle), 10 μM 2-Phenylmelatonin, 100 nM 2-Phenylmelatonin, 100 nM 8-M-PDOT oder 10 μM 8-M-PDOT vorbehandelt. Anschließend wurde jeweils Propofol in einer Konzentration von 50 μM zugegeben. Die peristaltische Darmaktivität wurde nach der zweiten Zugabe über einen Zeitraum von 60 min aufgezeichnet.

2.3.3.5 Wirkung von Melatonin und Luzindol unter Hypoxiebedingungen

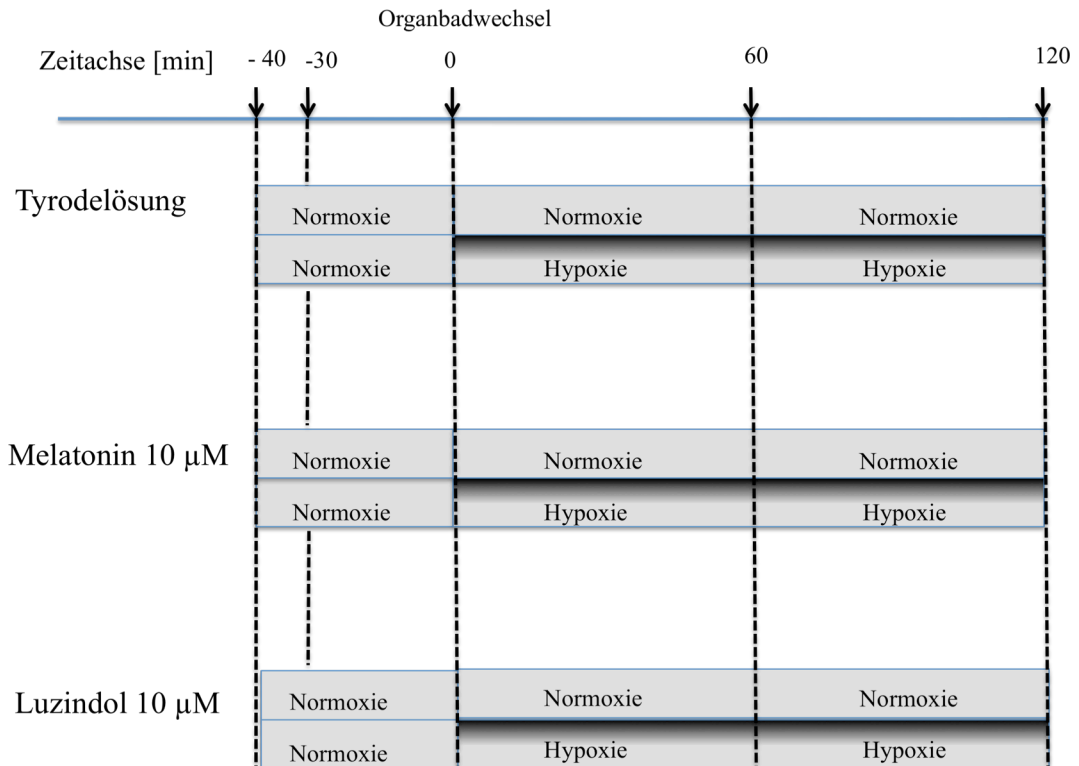


Abbildung 14: Versuchsprotokoll Hypoxie- / Normoxie-Versuch

Nach 10-minütiger Vorlaufphase (Abb. 14., Zeitachse - 40 min) wurden in drei Versuchsreihen je 2x9 Darmsegmente für 30 min mit Tyrodelösung (Kontrolle), 10 µM Melatonin oder 10 µM Luzindol vorbehandelt (siehe Abb. 14). Nach diesen 30 min (Abb. 14, Zeitachse 0) erfolgte ein Organbadwechsel bei allen Experimenten und die erneute Applikation von Tyrodelösung, Melatonin oder Luzindol.

Dann wurde bei je einem Versuchsarm die Organbadoxygenierung von der Normoxiebegasung mit 95% O₂ und 5% CO₂ auf eine anoxische Stickstoffbegasung mit 95% N₂ und 5% CO₂ umgestellt.

In jedem Organbad wurden 30 min nach der 1. Substanzapplikation und am Ende der Versuchsreihe nach 120 min der pH-Wert, pO₂ und pCO₂ mittels Blutgas-Analysegerät bestimmt.

Die Peristaltik wurde nach Umstellung oder Fortsetzung der Begasung über einen Zeitraum von 120 min aufgezeichnet.

2.4 Auswertung

Der Schwellendruck (PPT) war in unserer Versuchsanordnung der Parameter zur Beurteilung des Einflusses einer Substanz auf die Darmperistaltik. Kommt es nach Zugabe einer Testsubstanz zur Verringerung des Schwellendrucks, so entspricht dies einer Peristaltikstimulation. Kommt es zu einer Erhöhung des Schwellendrucks, so entspricht dies einer Hemmung.

Die Auswertung erfolgte über eine manuelle Ausmessung der Druckkurven während der peristaltischen Kontraktion auf dem Schreiberpapier und digital über ein PC-Programm. Erfasst wurden der Schwellendruck und die Frequenz der Dünndarmkontraktion.

Die Frequenz erwies sich als wenig aussagekräftig, so dass auf eine weitere Auswertung und statistische Aufbereitung dieses Parameters verzichtet wurde.

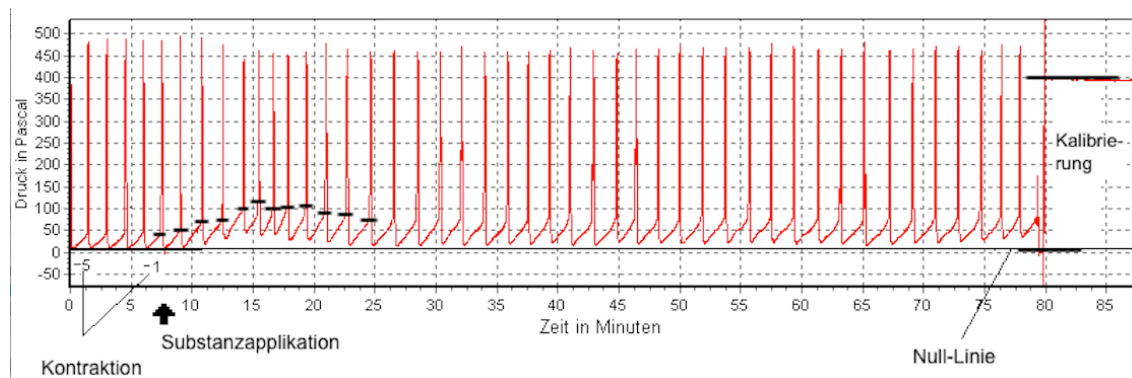


Abbildung 15: Originalregistrierung und Datenermittlung.

Jede Kontraktion wurde aufgezeichnet. Für die Auswertung wurde pro 5-Minuten-Intervall die letzte vollständige Kontraktion herangezogen. Damit wurde eine Datenreduktion erreicht. Zum besseren Verständnis der Datenermittlung siehe auch Abb. 15 einer Originalregistrierung. Vor dem Ausmessen der Kontraktionen wurde eine Null-Linie als Meßreferenz bestimmt.

Von der Null-Linie wurde in der Kontraktion -1 und -5 (Vor Substanzapplikation) der Schwellendruck ausgemessen (siehe Abb. 15). Der hier ermittelte

Schwellendruck diente für die im 5-Minuten-Intervall festgelegten Kontraktionen als Referenzwert. Die Differenz zwischen den gemessenen Drücken und dem Referenzwert ergab die Schwellendruckänderung (ΔPPT) nach Testsubstanzzugabe.

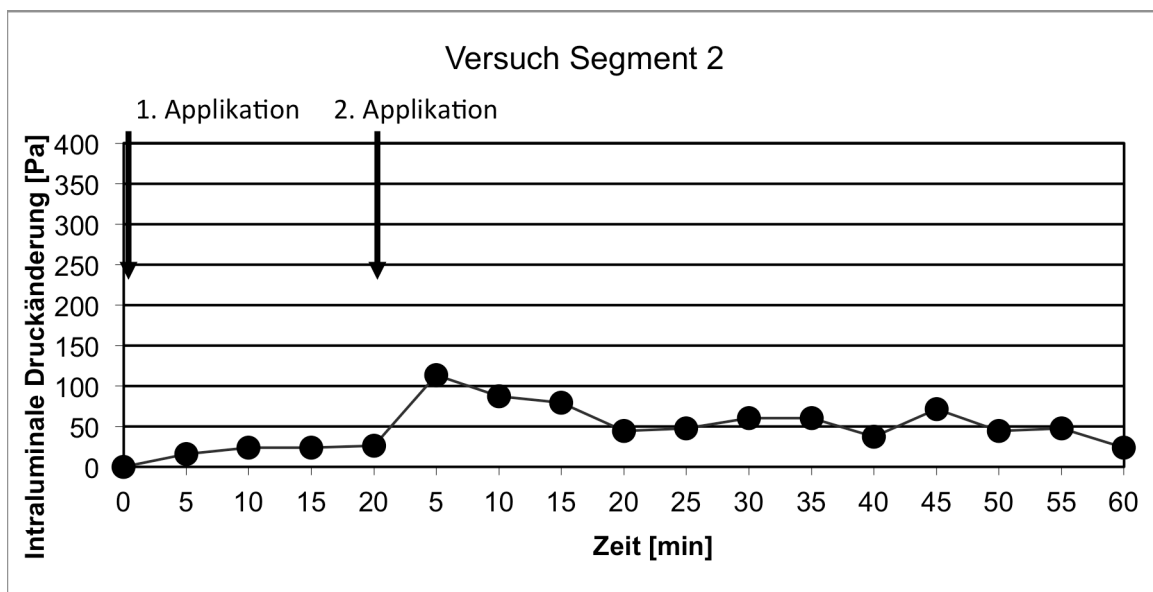
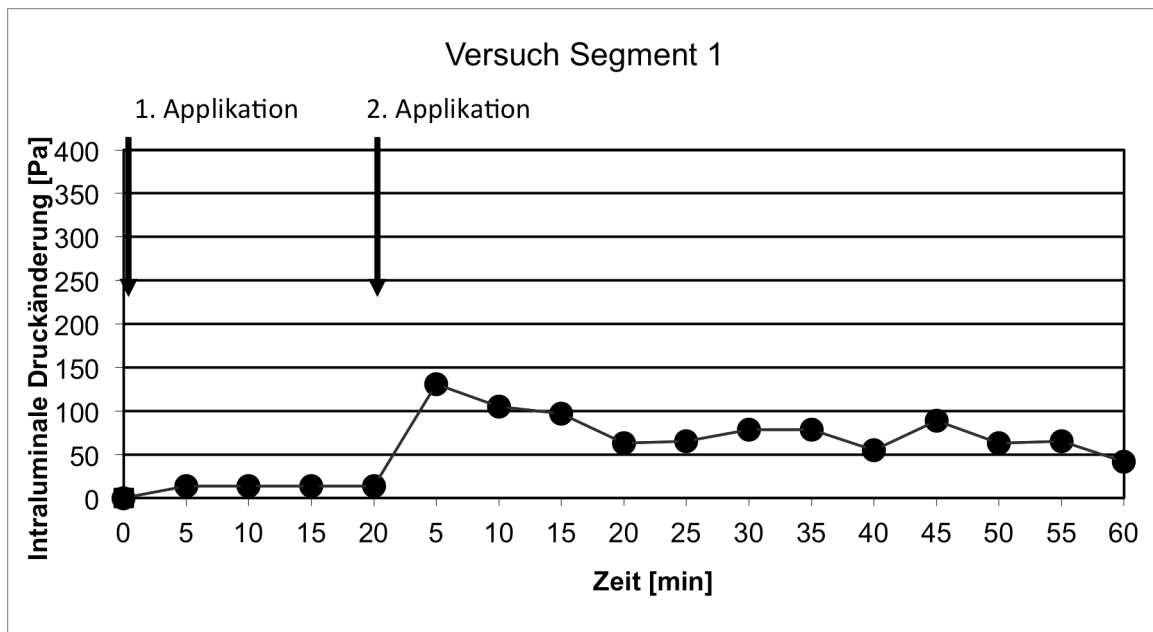


Abbildung 16: Schwellendruckänderungen von zwei Originalregistrierungen (je ein untersuchtes Darmsegment) über einen Vorlauf von 20 min nach 1. Applikation und 60 min nach der 2. Applikation

Zu jeder Testsubstanz wurden mehrere Versuchsreihen durchgeführt (Abb. 16). Die Auswirkung jeder Substanz auf die Darmperistaltik wurde an mindestens 6 unterschiedlichen Darmsegmenten von 6 Meerschweinchen getestet.

Eine komplette Hemmung der Peristaltik stellt sich im Graphen durch einen maximalen Anstieg des intraluminalen Drucks (400 Pa) dar, im Organbad sind dabei keine Darmkontraktionen beobachtbar (siehe Abb.17).

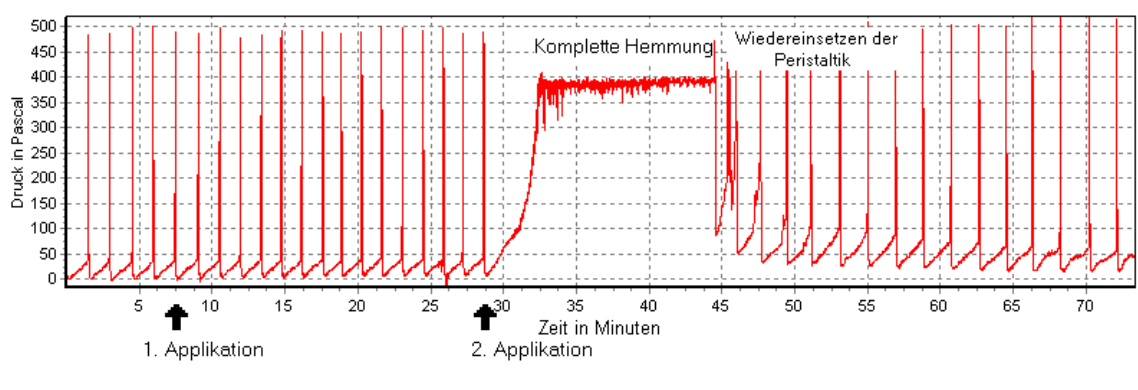


Abbildung 17: Originalregistrierung einer kompletten Hemmung der Darmperistaltik

Als Sonderform der kompletten Hemmung können Faszikulationen auftreten, die nichtpropulsiven und unkoordinierten Darmwandbewegungen entsprechen (siehe Abb. 18).

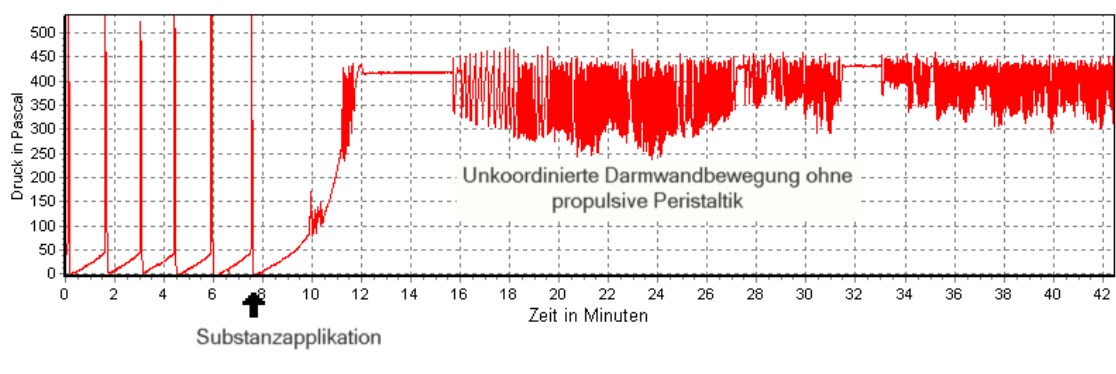


Abbildung 18: Originalregistrierung unkoordinierter Darmwandbewegungen ohne Peristaltik

Im Rahmen dieser Arbeit entwickelten wir erstmals eine automatisierte Auswertung. Die Software "Auswertungsassistent Version 3.0" wurde mit der Programmiersprache Pascal geschrieben (siehe Abb. 19).

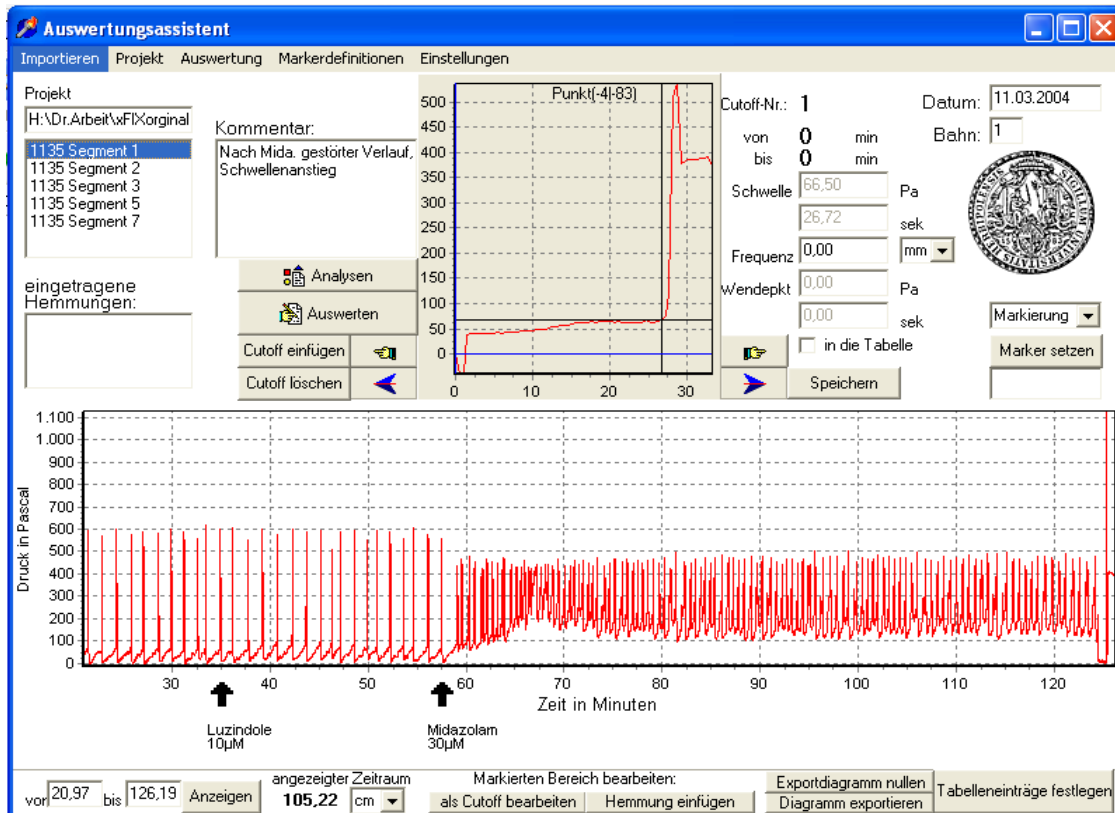


Abbildung 19: Screenshot des Auswertungsassistenten Version 3.0 nach Hinske und Fahr.

Bei 20 vergleichenden Auswertungen (manuell versus softwarebasiert) ergaben sich keine signifikanten Unterschiede in der Genauigkeit der Messparameter, so dass im weiteren Verlauf die Auswertung ausschließlich softwaregestützt erfolgte.

2.5 Statistische Auswertung

Die statistische Auswertung erfolgte mit dem Statistikprogramm 'R' Version 2.8.1 unter Mac OS. Alle Messwerte für den Schwellendruck, PPT bzw. Δ PPT, wurden als Mittelwert \pm Standardfehler des Mittelwertes (SEM, standard error of the mean) angegeben. Mit dem Kolmogorov-Smirnov-Test wurden die PTT-Werte auf Normalverteilung geprüft.

Multiple Vergleiche erfolgten zur Prüfung auf signifikante Unterschiede mittels ANOVA (analysis of variance). Der Vergleich zweier Gruppen wurde mit dem Student-t-Test durchgeführt. Für die Testung galt ein Signifikanzniveau von $p < 0,05$. Bei Nichtnormalverteilung erfolgte der Vergleich mit dem Wilcoxon-Test.

Die Datenanalyse ermöglichte aufgrund des geringen Stichprobenumfanges und fehlender konsistenter Normalverteilung nur eine nicht parametrische Signifikanzprüfung der Messwerte.

2.6 Graphische Darstellung

Die graphischen Darstellungen in Tabellen, Kurven- oder Balkendiagrammen wurden mit Excel 2000 und Excel 2011 für Mac erstellt (Fa. Microsoft Corp.).

2.7 Übersicht der Experimente

Konzentrations-Wirkungsbeziehung von Melatonin:

| | |
|-------------------------|-----|
| Melatonin 10 µM 60 min | N=6 |
| Melatonin 1 nM 60 min | N=6 |
| Melatonin 100 nM 60 min | N=6 |
| Melatonin 10 pM 60 min | N=6 |

Eigenwirkung von Melatonin Antagonisten/Agonisten:

| | |
|---------------------------------|-----|
| Luzindol 10 µM 60 min | N=6 |
| Luzindol 1 µM 60 min | N=6 |
| 2-Phenylmelatonin 10 µM 60 min | N=6 |
| 2-Phenylmelatonin 100 nM 60 min | N=6 |
| 8-M-PDOT 10 µM 60 min | N=6 |
| 8-M-PDOT 100 nM 60 min | N=6 |

Interaktion von Melatonin/Luzindol mit Midazolam:

| | |
|---|-----|
| Tyrodellösung 20 min - Midazolam 10 µM 60 min | N=8 |
| Melatonin 10 µM 20 min-Midazolam 10 µM 60 min | N=8 |
| Luzindol 10 µM 20 min-Midazolam 10 µM 60 min | N=8 |

Dosiswirkungsbeziehung der Interaktion von Luzindol mit Midazolam:

| | |
|--|------|
| Tyrodellösung 20 min – Midazolam 1 µM 60 min | N=10 |
| Luzindol 10 µM 20 min – Midazolam 1 µM 60 min | N=10 |
| Tyrodellösung 20 min – Midazolam 3 µM 60 min | N=10 |
| Luzindol 10 µM 20 min – Midazolam 3 µM 60 min | N=10 |
| Tyrodellösung 20 min – Midazolam 10 µM 60 min | N=10 |
| Luzindol 10 µM 20 min – Midazolam 10 µM 60 min | N=10 |
| Tyrodellösung 20 min – Midazolam 30 µM 60 min | N=10 |
| Luzindol 10 µM 20 min – Midazolam 30 µM 60 min | N=10 |

Interaktion von Melatonin/Luzindol mit Fentanyl:

| | |
|---|-----|
| Tyrodellösung 20 min - Fentanyl 3 nM 60 min | N=8 |
| Melatonin 10 µM 20 min - Fentanyl 3 nM 60 min | N=8 |
| Luzindol 10 µM 20 min - Fentanyl 3 nM 60 min | N=8 |

Interaktion von Melatonin, Antagonisten und Agonisten mit Propofol:

| | |
|--|-----|
| Tyrodellösung 20 min- Propofol 50 µM 60 min | N=8 |
| Melatonin 10 µM 20 min - Propofol 50 µM 60 min | N=7 |
| Melatonin 0,1 µM 20 min - Propofol 50 µM 60 min | N=7 |
| Melatonin 1 nM 20 min - Propofol 50 µM 60 min | N=7 |
| Melatonin 10 pM 20 min - Propofol 50 µM 60 min | N=6 |
| Luzindol 10 µM 20 min - Propofol 50 µM 60 min | N=8 |
| Luzindol 10 µM 20 min - Tyrodellösung 60 min | N=8 |
| 8-M-PDOT 10 µM 20 - Propofol 50 µM 60 min | N=6 |
| 8-M-PDOT 0,1 µM 20 min - Propofol 50 µM 60 min | N=6 |
| 2-Phenylmelatonin 10 µM 20 min - Propofol 50 µM 60 min | N=6 |
| 2-Phenylmelatonin 0,1 µM 20 min - Propofol 50 µM 60 min | N=6 |
| Tyrodellösung 20 min - Propofol 50 µM 60 min (8-M-PDOT) | N=6 |
| Tyrodellösung 20 min - Propofol 50 µM 60 min (2-Phenylmelatonin) | N=6 |

Experimente unter Normoxie (O₂)- vs. Hypoxiebegasung (N₂):

| | |
|--|-----|
| O ₂ Tyrodellösung 30 min– O ₂ Tyrodellösung 120 min | N=9 |
| O ₂ Tyrodellösung 30 min – N ₂ Tyrodellösung 120 min | N=9 |
| O ₂ Melatonin 10 µM 30 min – O ₂ Melatonin 10 µM 120 min | N=9 |
| O ₂ Melatonin 10 µM 30 min – N ₂ Melatonin 10 µM 120 min | N=9 |
| O ₂ Luzindol 10 µM 30 min – O ₂ Luzindol 10 µM 120 min | N=9 |
| O ₂ Luzindol 10 µM 30 min – N ₂ Luzindol 10 µM120 min | N=9 |

Erläuterung zu den Hypoxieversuchen:

30 min nach Beginn der Messung wurde die Tyrodellösung im Organbad gewechselt.
Für das genaue Versuchsprotokoll siehe auch Abb. 14.

Kontrollexperimente:

| | |
|---|-----|
| LM Melatonin 60 min | N=6 |
| LM Luzindol 60 min | N=6 |
| Melatonin 10 µM 20 min - Tyrodellösung 60 min(für Propofol) | N=6 |
| Melatonin 10 µM 20 min - LM Propofol 60 min | N=6 |
| Tyrodellösung 20 min - Tyrodellösung 60 min | N=8 |
| LM 2-Phenylmelatonin 1:10 Tyrodellösungsverdünnung,60 min | N=6 |
| LM 8-M-PDOT / 1:10 Tyrodellösungsverdünnung,60 min | N=6 |

3 Ergebnisse der Versuche

3.1 Wirkung von Melatonin auf die Dünndarmperistaltik

Exogen zugeführtes Melatonin führte in unserer Versuchsanordnung zu einer Zunahme des Schwellendrucks um bis zu 16,2 Pa, der Anstieg war statistisch nicht signifikant. Sowohl die Kontrolle mit dem Lösungsmittel Tyrodelösung als auch Melatonin in den Konzentrationen von 10 μ M und 0,1 μ M hatten keinen signifikanten Einfluss auf die Peristaltik, bei einer Versuchszahl von je N=6 (Tab.4). Die Signifikanzprüfung ergab $p=0,24$ bei 10 μ M und $p=0,18$ bei 0,1 μ M. Auch niedrigere Dosierungen von Melatonin bewirken im Vergleich zur Kontrolle keine signifikante Erhöhung des Schwellendrucks. Die Konzentration 10 pM ergab $p=0,13$ und 1 nM $p=0,08$.

Tabelle 4: Durchschnittliche Schwellendruckänderung (Δ PPT) über ein 60-Minuten-Intervall \pm SEM abhängig von der jeweiligen Substanz.

| Substanz | Substanzkonzentration im Bad | Schwellendruckänderung (Δ PPT) [Pa] | SEM [Pa] |
|-----------------------------|------------------------------|---|-----------|
| LM-Melatonin (Tyrodelösung) | 30 μ l | +6,2 | $\pm 0,9$ |
| Melatonin | 10 pM | + 16,2 | $\pm 4,7$ |
| Melatonin | 1 nM | + 11,4 | $\pm 2,4$ |
| Melatonin | 0,1 μ M | + 10,4 | $\pm 2,3$ |
| Melatonin | 10 μ M | + 7,8 | $\pm 1,1$ |

3.2 Wirkung von Melatoninrezeptoragonisten und -antagonisten auf die Dünndarmperistaltik

3.2.1 Eigenwirkung des partiellen Agonisten 2-Phenylmelatonin

Die Applikation von 2-Phenylmelatonin in zwei verschiedenen Konzentrationen führte zu einem Anstieg des Schwellendrucks im Vergleich zur Kontrolle mit dessen Lösungsmittel (Ethanol) um bis zu 41,4 Pa. Dieser Druckanstieg wurde in der Konzentration von 10 μ M erreicht und war mit einem $p=0,002$ signifikant. In der Konzentration von 0,1 μ M war kein signifikanter Druckanstieg bei $p=0,18$ nachweisbar (siehe Tab.5 und Abb. 20).

Tabelle 5: Durchschnittliche Schwellendruckänderung (Δ PPT) über ein 60-Minuten-Intervall \pm SEM abhängig von der jeweiligen Substanz.

| Substanz | Substanzkonzentration im Bad | Schwellendruckänderung (Δ PPT) [Pa] | SEM [Pa] |
|----------------------|------------------------------|---|------------|
| LM-2-Phenylmelatonin | 30 μ l | +0,4 | \pm 3,7 |
| 2-Phenylmelatonin | 0,1 μ M | + 20,8 | \pm 10,4 |
| 2-Phenylmelatonin | 10 μ M | + 41,4 | \pm 19,5 |

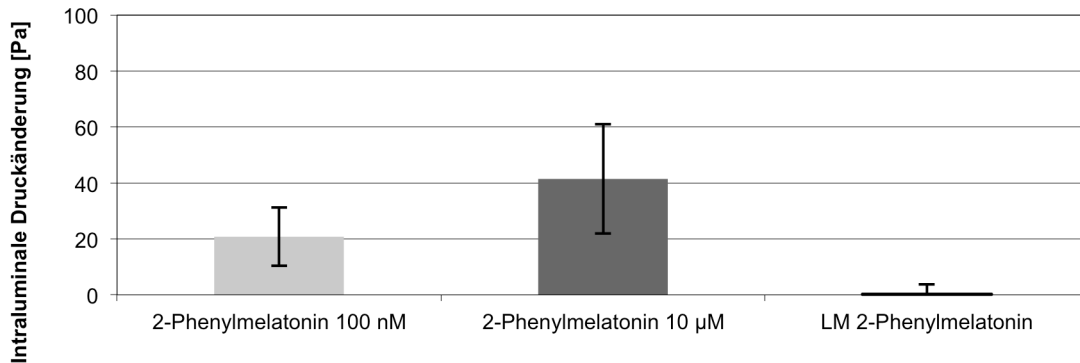


Abbildung 20: Änderung des intraluminalen Drucks [Pa] nach Applikation von 2-Phenylmelatonin, in den Konzentrationen 100 nM und 10 μ M verglichen mit dem Lösungsmittel (LM). Dargestellt sind Mittelwerte \pm SEM über den Meßzeitraum von 60 min.

3.2.2 Eigenwirkung des Agonisten 8-M-PDOT

Bei der Applikation von 8-M-PDOT in den Konzentrationen von 0,1 μ M und 10 μ M zeigte sich ein Anstieg des Schwellendrucks im Vergleich zu der Kontrolle mit dem Lösungsmittel (siehe Tab.6). Das Signifikanzniveau ergab $p=0,18$ bei 0,1 μ M 8-M-PDOT und $p=0,09$ bei 10 μ M 8-M-PDOT.

Tabelle 6: Durchschnittliche Schwellendruckänderung (Δ PPT) über ein 60-Minuten-Intervall \pm SEM, abhängig von der jeweiligen Substanz, verglichen zum Vorlauf.

| Substanz | Substanzkonzentration im Bad | Schwellendruckänderung (Δ PPT) [Pa] | SEM [Pa] |
|-------------|------------------------------|---|-----------|
| LM-8-M-PDOT | 30 μ l | + 2,5 | \pm 5,3 |
| 8-M-PDOT | 0,1 μ M | + 11,1 | \pm 3,1 |
| 8-M-PDOT | 10 μ M | + 18,3 | \pm 5,9 |

3.2.3 Eigenwirkung des Antagonisten Luzindol

Luzindol wurde in den Konzentrationen von 1 μM und 10 μM gegen sein Lösungsmittel DMSO getestet. Das in zwei Konzentrationen zugegebene Luzindol führte zu einem statistisch nicht signifikanten Anstieg des Schwellendrucks (siehe Tab.7 und Abb.21). Die Signifikanzprüfung ergab $p=0,07$ für 1 μM und $p=0,24$ für 10 μM . Der Rezeptorantagonist hatte somit *per se* keinen Einfluss auf die peristaltische Aktivität am Meerschweinchendarm im *in vitro* Experiment.

Tabelle 7: Durchschnittliche Schwellendruckänderung (ΔPPT) über ein 60-Minuten-Intervall mit \pm SEM abhängig von der jeweiligen Substanz, verglichen zum Vorlauf.

| Substanz | Substanzkonzentration im Bad | Schwellendruckänderung (ΔPPT)[Pa] | SEM [Pa] |
|-------------|------------------------------|---|-----------|
| LM-Luzindol | 30 μl | + 21,6 | \pm 3,7 |
| Luzindol | 1 μM | + 8,5 | \pm 3,7 |
| Luzindol | 10 μM | + 29,4 | \pm 4,2 |

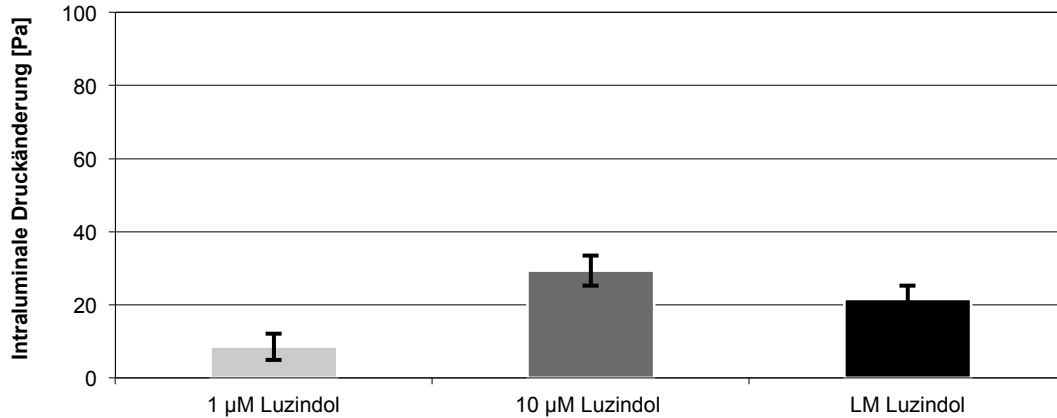


Abbildung 21: Änderung des intraluminalen Drucks [Pa] nach Applikation von 1 μM , 10 μM Luzindol und LM (Lösungsmittel) Luzindol. Dargestellt sind Mittelwerte \pm SEM über den Meßzeitraum von 60 min.

3.3 Wechselwirkung von Melatonin mit verschiedenen Medikamenten

3.3.1 Midazolamzugabe nach Vorbehandlung mit Melatonin oder Luzindol

Midazolam führt nach Vorbehandlung mit Tyrodelösung zu einem PPT Anstieg von etwa 39,6 Pa. Diese Wirkung von Midazolam ist bereits bekannt. Ob dieser Effekt durch Melatonin oder Luzindol beeinflusst werden kann sollte diese Versuchsreihe zeigen (siehe Tab.8).

Zum Ausschluss unspezifischer Effekte wurde nach Vorbehandlung mit Tyrodelösung erneut Tyrodelösung zugegeben. Dies hatte keinen Effekt auf den Schwellendruck.

Die peristaltikhemmende Wirkung von Midazolam nach Melatonin-Vorbehandlung unterschied sich mit 44,6 Pa hiervon nicht signifikant ($p=0,13$). Doch wurde der PPT durch Midazolam nach Vorbehandlung mit Luzindol signifikant verstärkt, sodass der Schwellendruck auf 118,1 Pa anstieg ($p=0,003$).

Tabelle 8: Durchschnittliche Schwellendruckänderung (Δ PPT) \pm SEM nach 1. und 2. Substanzapplikation.

| 1. Applikation 20 min | Substanz- konzentration im Bad | Δ PPT [Pa] | SEM [Pa] | 2. Applikation 60 min | Substanz- konzentration im Bad | Δ PPT [Pa] | SEM [Pa] |
|--------------------------|--------------------------------------|----------------------|-------------|-----------------------------|--------------------------------------|----------------------|-------------|
| Tyrodelösung | 30 μ l | + 3,0 | \pm 2,5 | Midazolam | 10 μ M | + 39,6 | \pm 6,9 |
| Melatonin | 10 μ M | + 5,9 | \pm 2,3 | Midazolam | 10 μ M | + 44,6 | \pm 2,9 |
| Luzindol | 10 μ M | + 30,4 | \pm 7,3 | Midazolam | 10 μ M | + 118,1 | \pm 14,6 |

3.3.2 Untersuchungen zur Dosis-Wirkungsbeziehung zwischen Luzindol und Midazolam

In dieser Versuchsreihe erfolgte eine Vorbehandlung mit Luzindol oder Tyrodelösung. Nach Zugabe der Konzentrationen von 1 μ M und 3 μ M Midazolam konnte kein signifikanter Anstieg der PPT bei der Lösungsmittelgruppe registriert werden. Auch die Luzindol-Vorbehandlung konnte die hemmende Wirkung des Midazolams bei diesen niedrigen Konzentrationen nicht signifikant verstärken. Das Signifikanzniveau lag bei $p=0,8$ bei einer Konzentration von 1 μ M und bei $p=0,91$ bei 3 μ M Midazolam.

Erst bei einer Konzentration von 10 µM Midazolam kam es zu einem PPT-Anstieg auf 74,8 Pa. Nach Vorbehandlung mit Luzindol kam es zu einer weiteren Hemmung der Darmmotilität, welche sich in einer PPT von 123,7 Pa widerspiegelt. Dieser Einfluss war nach statistischem Test nicht signifikant bei einem $p=0,25$. Im Vergleich zu den Untersuchungen mit Melatonin, Luzindol und Midazolam findet sich kein signifikanter Effekt.

Eine Konzentration von 30 µM Midazolam führte bereits zur kompletten Hemmung der Dünndarmperistaltik, so dass die Vorbehandlung mit Luzindol keinen weiteren Effekt hatte. Ergebnissdarstellung in Tab.9.

Tabelle 9: Durchschnittliche Schwellendruckänderung (Δ PPT) \pm SEM, nach 1. Luzindol/Tyrodelösung und der 2. Applikation von Midazolam.

| 1. Applikation 20 min | Substanz- konzentration im Bad | Δ PPT [Pa] | SEM [Pa] | 2. Applikation 60 min | Substanz- konzentration im Bad | Δ PPT [Pa] | SEM [Pa] |
|--------------------------|--------------------------------------|----------------------|-------------|-----------------------------|--------------------------------------|----------------------|-------------|
| Luzindol | 10 µM | + 47,0 | \pm 5,9 | Midazolam | 1 µM | + 15,9 | \pm 8,9 |
| Luzindol | 10 µM | + 42,8 | \pm 8,5 | Midazolam | 3 µM | + 26,5 | \pm 5,6 |
| Luzindol | 10 µM | + 39,2 | \pm 6,8 | Midazolam | 10 µM | + 123,7 | \pm 27,0 |
| Luzindol | 10 µM | + 35,5 | \pm 8,5 | Midazolam | 30 µM | + 264,5 | \pm 25,2 |
| Tyrodelösung | 30 µl | + 3,6 | \pm 0,9 | Midazolam | 1 µM | + 15,0 | \pm 3,7 |
| Tyrodelösung | 30 µl | + 1,9 | \pm 1,6 | Midazolam | 3 µM | + 26,4 | \pm 3,9 |
| Tyrodelösung | 30 µl | + 6,2 | \pm 1,6 | Midazolam | 10 µM | + 74,8 | \pm 12,7 |
| Tyrodelösung | 30 µl | + 6,1 | \pm 2,2 | Midazolam | 30 µM | + 279,2 | \pm 27,0 |

3.3.3 Wirkung von Fentanyl nach Vorbehandlung mit Luzindol und Melatonin

Die Vorbehandlung mit 10 µM Melatonin zeigte keinen signifikanten Einfluss auf den Schwellendruck nach 3 nM Fentanyl ($75,5 \pm 10,5$ Pa), verglichen mit der Kontrolle ($59,5 \pm 11,2$ Pa) (siehe Tab. 10 und Abb.22). Das Signifikanzniveau lag bei $p=0,31$. Die Vorbehandlung mit 10 µM Luzindol ergab eine gesteigerte Hemmung nach 3 nM Fentanyl ($106,6 \pm 10,6$ Pa), welche mit $p= 0,01$ signifikant unterschiedlich zur Kontrolle war.

Tabelle 10: Durchschnittliche Schwellendruckänderung (Δ PPT) \pm SEM, nach 1. Applikation und 2. Applikation von Fentanyl.

| 1. Applikation 20 min | Substanz- konzentration im Bad | Δ PPT [Pa] | SEM [Pa] | 2. Applikation 60 min | Substanz Konzentration im Bad | Δ PPT [Pa] | SEM [Pa] |
|--------------------------|--------------------------------------|----------------------|-------------|--------------------------|-------------------------------------|----------------------|-------------|
| Tyrodelösung | 30 μ l | 2,5 | \pm 0,9 | Fentanyl | 3 nM | 59,5 | \pm 11,2 |
| Melatonin | 10 μ M | 9,9 | \pm 2,9 | Fentanyl | 3 nM | 75,5 | \pm 10,5 |
| Luzindol | 10 μ M | 32,1 | \pm 6,9 | Fentanyl | 3 nM | 106,6 | \pm 10,4 |

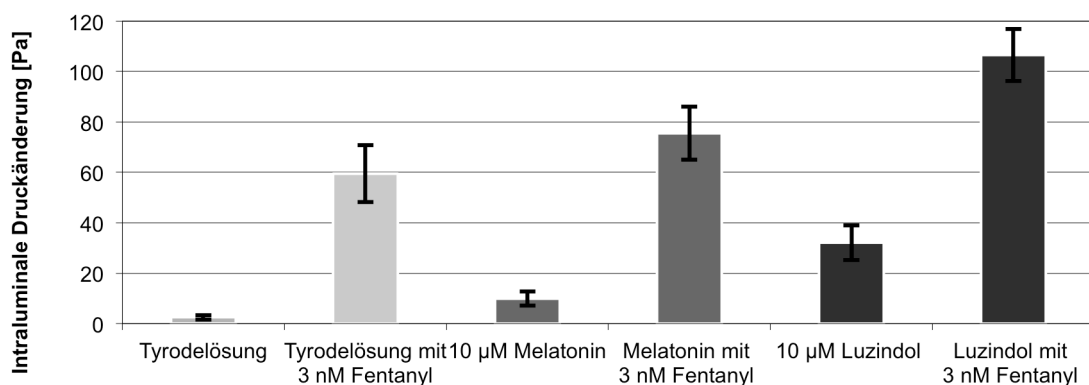


Abbildung 22: Änderung des intraluminalen Drucks [Pa] nach Applikation von 3 nM Fentanyl bei Vorbehandlung mit Tyrodelösung (Tyrode), 10 μ M Melatonin oder 10 μ M Luzindol. Dargestellt sind Mittelwerte \pm SEM über den Meßzeitraum von 20 min und 60 min nach Zugabe von Fentanyl.

3.3.4 Untersuchungen mit Propofol

3.3.4.1 Propofol nach Vorbehandlung mit Melatonin

Die Vorbehandlung mit Tyrodelösung ergab nach Zugabe von 50 μ M Propofol einen über 60 min gemittelten PPT-Anstieg auf 92,4 Pa. Die Vorbehandlung mit Melatoninkonzentrationen von 10 pM bis 10 μ M führte zu einer konstant steigenden Schwellendruckänderung von 87,6 Pa bis 138,9 Pa, jeweils gemittelt über 60 min (siehe Tab.11). Die Schwellendruckänderung bis 0,1 μ M war gegenüber der Tyrodekontrolle nicht signifikant ($p=0,46$). Bei der Vorbehandlung mit 10 μ M Melatonin fand sich eine statistisch signifikante Schwellendruckänderung bis 138,9 Pa mit $p=0,02$.

Tabelle 11: Durchschnittliche Schwellendruckänderung (Δ PPT) \pm SEM nach 1. und 2. Applikation.

| 1. Applikation 20 min | Substanz- konzentration im Bad | Δ PPT [Pa] | SEM [Pa] | 2. Applikation 60 min | Substanz- konzentration im Bad | Δ PPT [Pa] | SEM [Pa] |
|--------------------------|--------------------------------------|----------------------|-------------|--------------------------|--------------------------------------|----------------------|-------------|
| Tyrodellösung | 30 μ l | 2,7 | \pm 0,7 | Propofol | 50 μ M | +95,5 | \pm 12,9 |
| Melatonin | 10 pM | +4,8 | \pm 4,7 | Propofol | 50 μ M | +87,6 | \pm 20,4 |
| Melatonin | 1 nM | -0,4 | \pm 1,2 | Propofol | 50 μ M | +98,0 | \pm 12,8 |
| Melatonin | 0,1 μ M | +7,9 | \pm 3,3 | Propofol | 50 μ M | +105,3 | \pm 18,9 |
| Melatonin | 10 μ M | +19,5 | \pm 2,0 | Propofol | 50 μ M | +138,9 | \pm 14,1 |

3.3.4.2 Propofol nach Vorbehandlung mit Luzindol

Propofol (50 μ M) bewirkt nach Vorbehandlung mit Luzindol keinen signifikanten PPT-Anstieg ($p=0,17$) gegenüber der Vorbehandlung mit Tyrode (gemittelt über 60 min, siehe Tab.12 und Abb.23).

Tabelle 12: Durchschnittliche Schwellendruckänderung (Δ PPT) \pm SEM, Vorbehandlung mit Luzindol und 50 μ M Propofol (2. Applikation).

| 1. Applikation 20 min | Substanz- konzentration im Bad | Δ PPT [Pa] | SEM [Pa] | 2. Applikation 60 min | Substanz- konzentration im Bad | Δ PPT [Pa] | SEM [Pa] |
|--------------------------|--------------------------------------|----------------------|-------------|--------------------------|--------------------------------------|----------------------|-------------|
| Tyrodellösung | 30 μ l | +1,9 | \pm 1,0 | Propofol | 50 μ M | +92,4 | \pm 11,6 |
| Luzindol | 10 μ M | +20,2 | \pm 3,6 | Propofol | 50 μ M | +129,3 | \pm 22,2 |

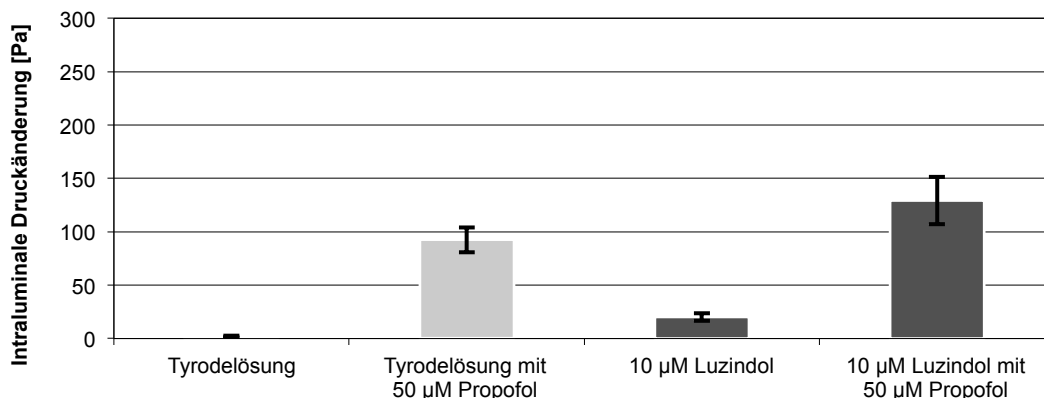


Abbildung 23: Änderung des intraluminalen Drucks [Pa] nach Applikation von 50 μ M Propofol bei Vorbehandlung mit Tyrodellösung oder 10 μ M Luzindol. Dargestellt sind Mittelwerte \pm SEM über den Meßzeitraum von 60 min nach Zugabe von Propofol.

3.3.4.3 Propofol nach Vorbehandlung mit dem partiellen Agonisten 2-Phenylmelatonin

Die Vorbehandlung mit dem Melatoninagonisten 2-Phenylmelatonin bewirkte in den Konzentrationen von 10 μM und 0,1 μM einen starken Anstieg der PPT auf die Gabe von 50 μM Propofol von 208,1 bzw. 183,9 Pa (gemittelt über 60 min), im Vergleich zur Wirkung von 50 μM Propofol nach Vorbehandlung mit Tyrodelösung (Kontrollexperiment), (siehe Tab. 13 und Abb. 24). Der Schwellendruckanstieg unterschied sich bereits in der Dosierung von 0,1 μM 2-Phenylmelatonin signifikant ($p=0,03$) von der Kontrolle mit Tyrodelösung.

Tabelle 13: Durchschnittliche Schwellendruckänderung (ΔPPT) \pm SEM, nach 1. und 2. Applikation.

| 1. Applikation 20 min | Substanz- konzentration im Bad | ΔPPT [Pa] | SEM [Pa] | 2. Applikation 60 min | Substanz- konzentration im Bad | ΔPPT [Pa] | SEM [Pa] |
|--------------------------|--------------------------------------|----------------------------|-------------|--------------------------|--------------------------------------|----------------------------|-------------|
| Tyrodelösung | 30 μl | +2,8 | $\pm 0,9$ | Propofol | 50 μM | +93,1 | $\pm 15,0$ |
| 2-Phenylmelatonin | 0,1 μM | +3,0 | $\pm 1,4$ | Propofol | 50 μM | +183,9 | $\pm 30,6$ |
| 2-Phenylmelatonin | 10 μM | +20,2 | $\pm 10,9$ | Propofol | 50 μM | +208,1 | $\pm 38,5$ |

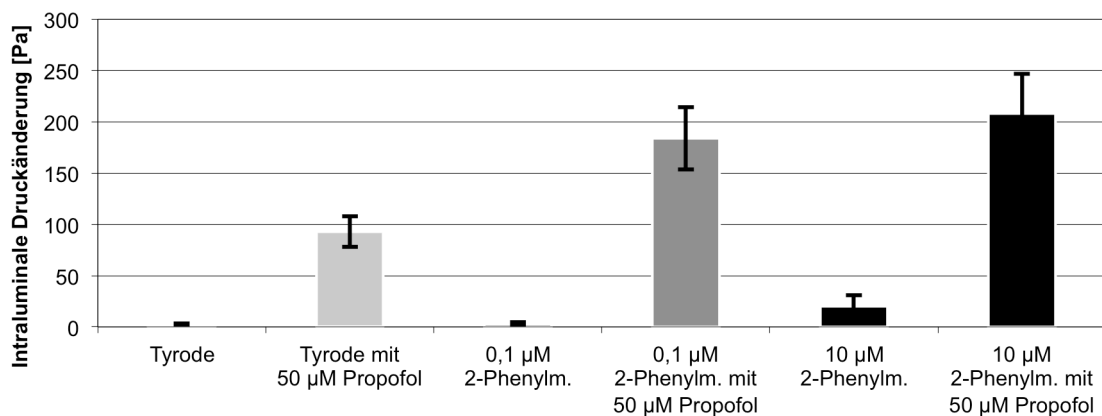


Abbildung 24: Änderung des intraluminalen Drucks [Pa] nach Applikation von 50 μM Propofol bei Vorbehandlung mit Tyrodelösung (Tyrode), 0,1 μM und 10 μM 2-Phenylmelatonin. Dargestellt sind Mittelwerte \pm SEM über den Meßzeitraum von 60 min nach Zugabe von Propofol.

3.3.4.4 Propofol nach Vorbehandlung mit dem Agonisten 8-M-PDOT

Nach Vorbehandlung mit 8-M-PDOT in den Konzentrationen von 10 μM bzw. 0,1 μM führte 50 μM Propofol (im Vergleich zum Kontrollversuch mit Tyrodelösung, PPT 91,3 Pa) zu einem Anstieg der PPT auf 212,1 bzw. 228,3

(Abb. 25). Dieser war mit $p=0,01$ signifikant vom Kontrollversuch verschieden (Tab. 14)..

Tabelle 14 : Durchschnittliche Schwellendruckänderung (Δ PPT) \pm SEM nach 1. und 2. Applikation.

| 1. Applikation 20 min | Substanz- konzentration im Bad | Δ PPT [Pa] | SEM [Pa] | 2. Applikation 60 min | Substanz- konzentration im Bad | Δ PPT [Pa] | SEM [Pa] |
|--------------------------|--------------------------------------|----------------------|-------------|--------------------------|--------------------------------------|----------------------|-------------|
| Tyrodellösung | 30 μ l | 1,2 | \pm 1,0 | Propofol | 50 μ M | 91,3 | \pm 14,9 |
| 8-M-PDOT | 0,1 μ M | 3,8 | \pm 2,1 | Propofol | 50 μ M | 228,3 | \pm 16,4 |
| 8-M-PDOT | 10 μ M | 6,9 | \pm 2,9 | Propofol | 50 μ M | 212,1 | \pm 30,2 |

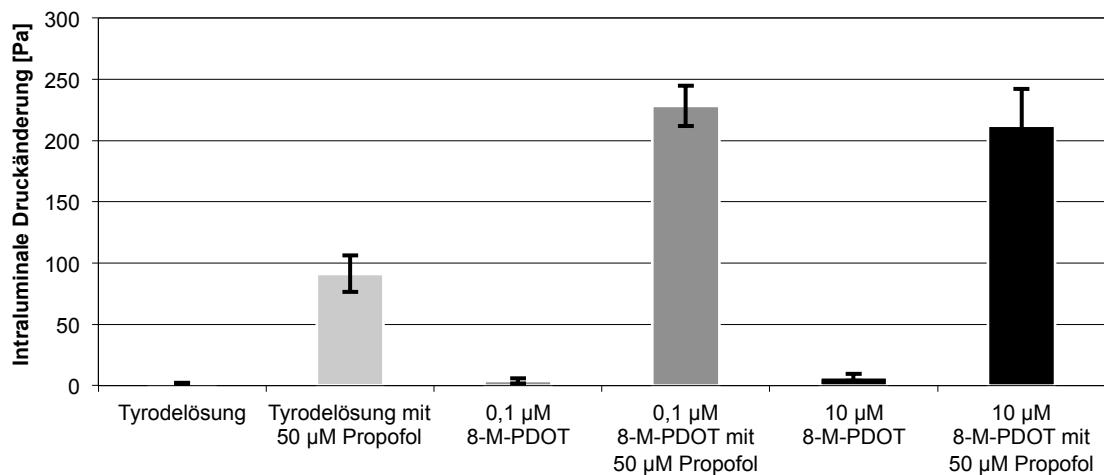


Abbildung 25: Änderung des intraluminalen Drucks [Pa] nach Applikation von 50 μ M Propofol bei Vorbehandlung mit Tyrodellösung, 0,1 μ M und 10 μ M 8-M-PDOT. Dargestellt sind Mittelwerte \pm SEM über den Meßzeitraum von 60 min nach Zugabe von Propofol.

3.3.4.5. Kontrolle Propofol-Lösungsmittel nach Vorbehandlung mit Melatonin

Propofol ist in einer Trägerlösung gelöst. Um einen Einfluss des Lösungsmittels von Propofol auf die Darmmotilität auszuschließen, wurde eine Kontrolluntersuchung durchgeführt. Zwanzig Minuten nach Applikation von 10 μ M Melatonin wurde das Lösungsmittel für Propofol zugegeben. Es kam zu keiner Beeinträchtigung der Peristaltik, und der PPT zeigte keine signifikante Änderung, verglichen mit der Tyrodellösungskontrolle (Tab.15).

Tabelle 15: Durchschnittliche Schwellendruckänderung(Δ PPT) \pm SEM, nach 1. und 2. Applikation.

| 1. Applikation 20 min | Substanz- konzentration im Bad | Δ PPT [Pa] | SEM [Pa] | 2. Applikation 60 min | Substanz- konzentration im Bad | Δ PPT [Pa] | SEM [Pa] |
|--------------------------|--------------------------------------|----------------------|-------------|--------------------------|--------------------------------------|----------------------|-------------|
| Melatonin | 10 μ M | 19,6 | \pm 4,4 | LM-Propofol | 30 μ l | 7,0 | \pm 4,6 |
| Melatonin | 10 μ M | 4,3 | \pm 2,2 | Tyrodelösung | 30 μ l | 8,7 | \pm 5,3 |

3.4 Wirkung von Melatonin und Luzindol unter Hypoxiebedingungen

Die Begasung des Organbads mit einem hypoxischen Gasgemisch (in Tab. 16 mit N₂ abgekürzt) führte nach Vorbehandlung mit Tyrodelösung zu einem Anstieg der PPT. Dieser Schwellendruckanstieg wurde durch die Vorbehandlung mit Melatonin nicht beeinflusst. Nach Vorbehandlung mit Luzindol hingegen war der hypoxiebedingte Anstieg der PPT nur in den ersten 30 min signifikant erhöht (p=0,05). Dieser signifikante Unterschied war nach 60 min nicht mehr vorhanden. Alle Ergebnisse sind in Tab.16 dargestellt.

Tabelle 16: Durchschnittliche Schwellendruckänderung (Δ PPT) \pm SEM nach 1. und 2. Applikation (nach der 1. Applikationen wurde jeweils der Organbadinhalt gewechselt). Im Unterschied zu den vorangehenden Versuchen wurde der Messzeitraum auf 120 min verlängert. Zwischenergebnisse wurden 30 und 60min nach Zugabe der 2. Substanz erfasst. O₂ beschreibt die Verwendung eines normoxischen, N₂ die eines hypoxischen Gasgemisches.

| 1. Applikation 30 min | Substanz- konzentration im Bad | Δ PPT [Pa] | SEM [Pa] | 2. Applikation 120 min | Substanz- konzentration im Bad | Δ PPT [Pa] nach 30 min | SEM [Pa] | Δ PPT [Pa] nach 60 min | SEM [Pa] | Δ PPT [Pa] nach 120 min | SEM [Pa] |
|-----------------------------|--------------------------------------|----------------------|-------------|-----------------------------|--------------------------------------|--|-------------|---|-------------|---|-------------|
| Tyrodelösung O ₂ | 30 μ l | -2,5 | \pm 2,1 | Tyrodelösung O ₂ | 30 μ l | +7,8 | \pm 1,8 | +2,1 | \pm 3,3 | +0,9 | \pm 4,6 |
| Tyrodelösung O ₂ | 30 μ l | +2,2 | \pm 1,6 | Tyrodelösung N ₂ | 30 μ l | +53,0 | \pm 15,2 | +41,0 | \pm 8,6 | +32,4 | \pm 6,1 |
| Melatonin O ₂ | 10 μ M | -0,9 | \pm 0,9 | Melatonin O ₂ | 10 μ M | +15,5 | \pm 3,8 | +12,8 | \pm 7,3 | +14,1 | \pm 2,8 |
| Melatonin O ₂ | 10 μ M | +4,0 | \pm 2,4 | Melatonin N ₂ | 10 μ M | +60,4 | \pm 21,4 | +49,3 | \pm 15,5 | +41,3 | \pm 10,5 |
| Luzindol O ₂ | 10 μ M | +50,7 | \pm 17,2 | Luzindol O ₂ | 10 μ M | +28,1 | \pm 7,9 | +16,6 | \pm 4,5 | +6,2 | \pm 3,1 |
| Luzindol N ₂ | 10 μ M | +50,7 | \pm 16,2 | Luzindol N ₂ | 10 μ M | +111,2 | \pm 22,6 | +74,6 | \pm 17,1 | +51,2 | \pm 15,2 |

3.5 Validierung der Umgebungsbedingungen

3.5.1 Organbadbedingungen unter Hypoxie und Normoxie

Bei den Versuchen zur Dünndarmperistaltik unter normoxischen bzw. hypoxischen Bedingungen wurden die Parameter pH-Wert, pCO₂ [Pa] und pO₂ [Pa] mit dem Blutgasanalysegerät gemessen. 30 min nach Applikation der ersten Substanz (Tyrodelösung, Melatonin oder Luzindol) unter Normoxiebedingungen (95% O₂, 5%CO₂) fand sich im Mittel ein pH-Wert von jeweils 7,10 ± 0, ein pCO₂ Wert von 35,5 ± 0,2Pa und ein pO₂ Wert von 506,1±8,4 Pa. Die Versuchsreihen mit Tyrode, Melatonin oder Luzindol wurden nach 30 min Vorlauf für 120 min jeweils unter Normoxie (95% O₂, 5%CO₂) und Hypoxiebedingungen (95% N₂, 5% CO₂) weitergeführt. Die Applikation der jeweiligen Substanzen führte zu keiner signifikanten Veränderung der Messparameter im Organbad. Unter Hypoxiebedingungen lagen die pH-Werte aus allen Versuchen gemittelt über 120 min bei 7,20 ± 0,01, unter Normoxie bei pH 7,08 ± 0,01. Die pCO₂-Werte betragen (gemittelt über 120 min) unter Hypoxiebedingungen 30,6 ± 0,9 Pa, unter Normoxie 36,1 ± 0,5 Pa. Die pO₂-Werte (gemittelt über 120 min) lagen unter Hypoxiebedingungen bei 65 ± 0,9 Pa, unter Normoxie bei 488,5 ± 6,0 Pa.

Dabei wird deutlich, dass der pH Wert unter Hypoxiebedingungen ansteigt. Der CO₂Partialdruck ändert sich nur gering, die O₂ Partialdrücke sinken deutlich.

Tabelle 17: Organbadbedingungen in den einzelnen Versuchsreihen. Dabei entspricht die Messung bei 120 min dem Ende der Versuche.

| Substanz | Gasgemisch | pH | | pCO ₂ [Pa] | | pO ₂ [Pa] | |
|-----------|----------------|----------------|--------------|-----------------------|--------------|----------------------|--------------|
| | | 30 min Vorlauf | Nach 120 min | 30min Vorlauf | Nach 120 min | 30min Vorlauf | Nach 120 min |
| Tyrode | O ₂ | 7,070 | 7,069 | 37 | 36 | 551 | 507 |
| Luzindol | O ₂ | 7,125 | 7,114 | 34 | 34 | 457 | 466 |
| Melatonin | O ₂ | 7,107 | 7,046 | 35 | 37 | 472 | 493 |
| Tyrode | N ₂ | 7,115 | 7,180 | 36 | 30 | 552 | 65 |
| Luzindol | N ₂ | 7,084 | 7,243 | 36 | 25 | 521 | 69 |
| Melatonin | N ₂ | 7,088 | 7,169 | 35 | 31 | 483 | 63 |

3.5.2 Überprüfung der Vitalität des peripheren enterischen Nervensystems in langdauernden Versuchen

Orientierende Versuche mit Tetrodotoxin (TTX, Gift des Kugelfisches Tetraodontidae) wurden zur qualitativen Visualisierung der Vitalität der Darmsegmente bzw. des enterischen Nervensystems am Ende der Begasungsversuche durchgeführt. Die Applikation von TTX hemmt die Natriumkanäle der enterischen Neurone. Insgesamt wurde dies bei 27 Darmsegmenten getestet. Bei 12 Versuchen kam es zu einer zeitlich begrenzten (15-20 min) Hemmung, die insbesondere in den Versuchen unter Melatoninvorbehandlung und anschließenden Hypoxiebedingungen im Organbad eintrat.

Bei den anderen 15 Versuchen wurde unmittelbar nach Substanzapplikation eine vollständige Darmlähmung beobachtet, die auch nach längerer Wartezeit keine normale Peristaltik mehr ermöglichte.

Diese Versuche wurden qualitativ beurteilt und aufgrund des geringen Stichprobenumfangs nicht weiter statistisch evaluiert.

| | Melatonin | 8-M-PDOT | 2-Phenyl-Melatonin | Luzindol |
|---------------|-----------|------------------|--------------------|----------|
| Eigen-wirkung | - | - | ↑ | - |
| Midazolam | - | nicht untersucht | nicht untersucht | ? |
| Fentanyl | - | nicht untersucht | nicht untersucht | ↑ |
| Propofol | ↑ | ↑ | ↑ | - |
| Hypoxie | - | nicht untersucht | nicht untersucht | ↑ |

Abbildung 29: Übersicht über die Ergebnisse der einzelnen Versuchsreihen. (-) kein signifikanter Unterschied, (↑) signifikanter Schwellendruckanstieg, (?) widersprüchliche Ergebnisse.

4 Diskussion

Die Hemmung der Motilität des Magen-Darm-Trakts kann für kritisch kranke Patienten auf der Intensivstation zu einer bedrohlichen Situation werden, da viele Faktoren zu dieser Magen-Darm-Atonie beitragen und andererseits nur wenige pharmakologische Optionen zu deren Behandlung zur Verfügung stehen. Ein weiteres Problem ist, dass zur Klärung der Pathomechanismen der Darmatonie aus methodischen und ethischen Gründen Untersuchungen am

Intensivpatienten nicht durchgeführt werden können. Daher besteht derzeit die einzige Möglichkeit darin, Fragen zum Pathomechanismus durch *in vitro*-Untersuchungen zu klären. Die Regelmechanismen der Darmmotilität sind zwischen Säugetieren unterschiedlicher Species ähnlich (Olsson and Holmgren 2001). Daher wurden die Untersuchungen der vorliegenden Arbeit an einer etablierten Versuchsanordnung für *in vitro*-Peristaltikexperimente durchgeführt, die bereits bei zahlreichen anderen Fragestellungen der eigenen und anderer Arbeitsgruppen Verwendung fand (Herbert et al. 2000, 2008; Maggi et al. 1994; Holzer et al. 1997; Wenderoth 2002). Grundlage dieser Versuchsvorrichtung ist die Beobachtung von Trendelenburg (1917), dass die Peristaltik an isolierten Dünndarmsegmenten des Meerschweinchens durch Perfusion des Darmlumens mit Flüssigkeit induziert werden kann. Bei kontinuierlicher Füllung des Darmlumens gegen einen geringen Widerstand steigt der intraluminale Druck solange an, bis ein Schwellenwert erreicht ist, ab dem eine von oral nach aboral gerichtete peristaltische Welle ausgelöst wird. Dieser Schwellendruck (PPT) ist ein gut definierter und quantifizierbarer Parameter und wird zur Beurteilung der Auslösbarkeit von Peristaltik herangezogen. Unter dem Einfluss inhibitorisch wirkender Faktoren (z.B. Pharmaka) auf die Dünndarmmotilität steigt dieser Schwellendruck an, bis ggf. keine Peristaltik mehr auslösbar ist. Umgekehrt bewirken prokinetisch wirksame Faktoren (z.B. Prokinetika) ein Absinken der Schwelle und die Peristaltik wird bereits bei geringeren intraluminalen Drücken ausgelöst. Die im Organbad registrierte Peristaltik wird einerseits von Neuronen des enterischen Nervensystems und andererseits von intrazellulären Signalkaskaden geregelt. Aus methodischen Gründen können auf Grund der hier beschriebenen Versuche zu den intrazellulären Abläufen lediglich hypothetische Aussagen getroffen werden (Costall et al. 1993, Costa et al. 1992, Maggi et al. 1994; Holzer et al. 1997).

Weitere Einflussfaktoren auf die Peristaltik wie das zentrale Nervensystem und die Blutversorgung sind in dieser *in vitro*-Versuchsanordnung ausgeschlossen. Um eine Restwirkung von vorher *in vivo* applizierten Substanzen zu vermeiden, wurde auf den Einsatz von Anästhetika bei der Tötung der Tiere verzichtet.

Für die Hemmung der Darmmotilität bei Intensivpatienten sind unter anderem Medikamente zur Analgesie und Sedierung verantwortlich (Herbert 2008). Beispielhaft haben wir, orientiert an der aktuellen S3 Leitlinie, für die hier vorliegenden Untersuchungen Fentanyl, Propofol und Midazolam als motilitätshemmende Pharmaka ausgewählt (AWMF online - S3-Leitlinie: Analgesie, Sedierung und Delirmanagement in der Intensivmedizin 2010).

Neben dem Einfluss der Medikamente spielt eine Sauerstoffunterversorgung infolge einer Minderperfusion des Darms eine wichtige Rolle für die intestinale Motilität. Bereits kurze Phasen einer Hypoxie führen zur Gewebeschädigung am Darm (Aitkenhead 1984, Herbert 2008). Für Untersuchungen zu dieser Fragestellung wurde in unserer Versuchsanordnung das sonst verwendete Oxygenierungsgemisch (Carbogengas) durch ein anoxisches Stickstoffgasgemisch ersetzt.

In den von uns durchgeführten Untersuchungen kamen Konzentrationen von 0,1 μM bis 10 μM Melatonin zum Einsatz. Dabei zeigte sich, dass Melatonin keinen Eigeneffekt - weder stimulierend noch hemmend - auf die *in vitro*-Dünndarmperistaltik beim Meerschweinchen hat. Im Gegensatz zu Melatonin bewirkte der partielle Agonist 2-Phenylmelatonin einen signifikanten Anstieg der PPT. Der Anstieg der Druckschwelle nach Gabe von 8-M-PDOT, dem Agonisten an beiden Melatoninrezeptoren M1 und M2 war nicht signifikant. Obgleich der Agonist 2-Phenylmelatonin eine stärkere Affinität zum Melatoninrezeptor besitzt als Melatonin, ist die absolute Schwellendruckänderung durch 2-Phenylmelatonin mit 41,4 Pa vergleichsweise gering (Nonno et al. 1999), denn die Schwellendruckänderungen bei hemmenden Substanzen wie Fentanyl oder Propofol beträgt 100 Pa. Daher kann keine nennenswerte Hemmwirkung von 2-Phenylmelatonin auf die Dünndarmperistaltik attribuiert werden. In ähnlicher Weise hat auch der Melatoninrezeptorantagonist Luzindol *per se* keine Wirkung auf die Peristaltik bzw. auf die PPT. Demzufolge lässt sich aus den hier durchgeführten Untersuchungen schlussfolgern, dass weder exogen zugeführtes, noch die Blockade der Wirkung von endogen vorhandenem Melatonin eine Wirkung auf

die Dünndarmperistaltik hat. Diese Befunde stehen in Widerspruch zu anderen Ergebnissen in der Literatur (s.u.).

Die hier verwendeten Konzentrationen von Melatonin, der Agonisten und des Antagonisten Luzindol entsprechen den Konzentrationen dieser Substanzen in bereits publizierten Untersuchungen (Lucchelli et al. 1997, Poon et al. 2002, Drago et al. 2002, Dubocovich 1988, Browning et al. 2000; Nonno et al. 1999), so dass daraus kein Grund für die diskrepanten Ergebnisse abgeleitet werden kann. Offensichtlich sind die Modelle und die Parameter, an denen die Wirkung von Melatonin auf die Darmfunktion gemessen wurden, so unterschiedlich, dass die Ergebnisse untereinander nicht vergleichbar sind. Drago et al. (2002) untersuchten die dosisabhängige Melatoninwirkung auf die Darmpassagedauer sowie die myoelektrische Aktivität des Dünndarms (Duodenum, Jejunum und Ileum) am Rattenmodell. In dieser Untersuchung konnte nachgewiesen werden, dass die Darmpassagedauer unter geringen Dosen von Melatonin signifikant kürzer war als in der Kontrollgruppe, während vergleichsweise hohe Dosen von Melatonin zu einer verlangsamten Darmpassage führten. Die Arbeitsgruppe konnte weiterhin eine Zunahme der myoelektrischen Aktivität unter Melatoningabe nachweisen, die durch die Vorbehandlung mit Luzindol zu verhindern war (Drago et al. 2002). Insgesamt konnte in den vorliegenden *in vitro*-Untersuchungen am Meerschweinchenileum kein protektiver oder stimulierender Effekt von Melatonin *per se* auf die Dünndarmperistaltik nachgewiesen werden.

Wird die Dünndarmmotilität durch Midazolam inhibiert, so hat exogen zugeführtes Melatonin keinen Effekt auf die Hemmwirkung von Midazolam. Aber die endogene Blockade am Melatoninrezeptor durch Luzindol verstärkt die hemmende Wirkung von Midazolam. Ähnlich verhält es sich mit der hemmenden Wirkung des Opioids Fentanyl auf die Dünndarmperistaltik. Die Zugabe exogenen Melatonins hat keinen Effekt auf die Hemmwirkung von Fentanyl. Wird hingegen die Wirkung endogenen Melatonins inhibiert, so ist die Hemmwirkung von Fentanyl auf die PPT stärker.

Anders verhält es sich mit der modulierenden Wirkung von Melatonin auf die inhibitorische Wirkung von Propofol auf die PPT. Während in diesen Experimenten die Inhibition endogenen Melatonins keine Modulation der Hemmwirkung von Propofol bewirkt, verstärkt sowohl exogen zugeführtes Melatonin, als auch der partielle Melatoninagonist 2-Phenylmelatonin die Hemmwirkung von Propofol. Übereinstimmungen zu unseren Ergebnissen sind bei Santagostino-Barbone et al 2000 zu finden. In Ihren Untersuchungen führte die Gabe von 2-Phenylmelatonin zu einer Hemmung der Darmkontraktion, welche zuvor durch Melatonin induziert wurde.

Bei der Gabe von Midazolam nach Vorbehandlung mit Melatonin konnte kein signifikanter Einfluss auf die Peristaltik im Vergleich zu der Tyrodekontrolle festgestellt werden. Unter Vorbehandlung mit Luzindol war eine signifikante Hemmung der Peristaltik nachzuweisen. Die darauf folgenden Untersuchungen zur Dosis-Wirkungsbeziehung von Luzindol und Midazolam bestätigten den schon bekannten dosisabhängigen Schwellendruckanstieg bei höheren Midazolamdosierungen (Wenderoth 2002). In der Kontrolle zwischen Tyrodelösung und Luzindolvorbehandlung konnten allerdings keine statistisch signifikanten Unterschiede in Bezug auf die entsprechende Midazolamdosierung nachgewiesen werden. Dieses diskrepante Ergebnis beruht möglicherweise auf einer größeren Streubreite der SEM. Hier wären weitere Untersuchungen mit größeren Testreihen notwendig um aussagekräftige Ergebnisse zu erhalten.

Bei Überlegungen über die Wirkmechanismen von Melatonin auf die Darmperistaltik kann eine Interaktion von Melatonin am GABA_A-Rezeptor diskutiert werden. Wie bereits in der Einleitung zu Propofol und Midazolam dargestellt, haben GABA_A-Rezeptoren eine nicht ganz geklärte Bedeutung auf die Dünndarmperistaltik. Naguib et al. 2006 untersuchten in einer randomisierten Doppelblindstudie die zur Narkoseinduktion notwendigen Propofol- und Thiopental-Dosen nach Prämedikation mit Melatonin. Die Patientengruppe, die mit Melatonin prämediziert wurde, benötigte signifikant weniger Hypnotikum zur Einleitung. Basierend auf diesen Ergebnissen

vermuten die Autoren eine Wirkung von Melatonin am GABA_A-Rezeptor. In ihrem Modell verstärkt Melatonin die Bindung von GABA am GABA_A-Rezeptor, erhöht die GABA Konzentration und stimuliert die GABA_A-Rezeptor vermittelte Wirkung (Naguib et al. 2006). Aus Untersuchungen von Wang et al. 2003 ist bekannt, dass Melatonin die vom GABA_A-Rezeptor vermittelte inhibitorische Wirkung auf die Neurone potenzieren kann (Wang et al. 2003). Es ist bislang ungeklärt, ob es sich dabei um eine Interaktion der durch die Melatoninrezeptoren vermittelten intrazellulären Signalkaskaden handelt (Wan et al. 1999; Naguib et al. 2006). Aufgrund von Ergebnissen mehrerer Arbeitsgruppen lässt sich auch eine direkte Interaktion von Melatonin mit dem Benzodiazepinrezeptor vermuten (Wu et al. 1999; Wang et al. 2003). Den Vorarbeiten unserer Arbeitsgruppe (Herbert et al. 2000) bezüglich der Signaltransduktion von Propofol, in denen keine eindeutige Wirkvermittlung über GABA-Rezeptoren gezeigt werden konnte, stehen Untersuchungen von Koutsoviti-Papadopoulou et al. 1999 gegenüber. Die Ergebnisse dieser Arbeit legen eine über den GABA_A-Rezeptor vermittelte inhibierende Wirkung von Propofol auf die Dünndarmperistaltik am Meerschwein-Modell nahe (Koutsoviti-Papadopoulou et al. 1999). Im Einklang mit diesen Erkenntnissen verstärkten Melatonin und alle getesteten Melatoninagonisten unserer Versuchsreihe signifikant die Hemmung der Dünndarmperistaltik durch Propofol. Hingegen führte eine Vorbehandlung mit Luzindol zu keiner signifikanten Änderung am Schwellendruck. Dies wäre dadurch erklärbar, dass Luzindol als spezifischer Melatoninrezeptorantagonist möglicherweise keine Wirkung am GABA-Rezeptor hat. Weiterführende Untersuchungen könnten die Validität der hier beobachteten Ergebnisse und der darauf basierend aufgestellten Hypothese bezüglich einer Interaktion zwischen GABA_A-Rezeptor und Melatonin klären. Es wäre beispielsweise interessant zu untersuchen, inwiefern der beobachtete Effekt von Melatonin auf die Wirkung von Propofol durch einen kompetitiven Benzodiazepinantagonisten wie Flumazenil aufgehoben werden kann.

Im Rahmen unserer Versuche mit Fentanyl war unter Melatoninvorbehandlung kein Einfluss auf den Schwellendruck messbar. Interessanterweise zeigte sich nach Blockade des endogenen Melatoninrezeptors durch Luzindol eine

Zunahme des Schwellendrucks nach Zugabe von Fentanyl. Dabei ist grundsätzlich die inhibierende Wirkung von Opioiden auf die Darmmotilität ein bekanntes Phänomen (Holzer 2004). Bereits im Jahr 1990 konnten Kromer und seine Arbeitsgruppe eine Hemmung der Darmmotilität durch endogene Opiode über Kappa-Opioidrezeptoren nachweisen (Kromer 1990). Auch in unseren Versuchen konnten wir einen signifikanten Schwellendruckanstieg und damit eine Hemmung der Darmmotilität durch Fentanyl bestätigen. Aufgrund der bekannten antinozizeptiven Wirkung von Melatonin liegt die Annahme nahe, dass eine möglicherweise direkte Interaktion von Melatonin mit den Opioidrezeptoren einen Einfluss auf die Darmperistaltik haben könnte. Untersuchungen von Shavali et al. (2005) und Yu et al. (2000a) schwächen allerdings die Hypothese einer direkten Opioidrezeptorinteraktion. Nach Shavali und Yu ist zu vermuten, dass Melatonin zu einer vermehrten Ausschüttung von β -Endorphinen und endogenem Opioid führt (Yu et al. 2000a; Shavali et al. 2005). Dieser Effekt ist dosisabhängig und kann durch Luzindol antagonisiert werden (Yu et al. 2000b). Weitere Untersuchungen zum Einfluss von Melatonin auf die Schmerzwahrnehmung ergaben, dass der Effekt durch den Opioidrezeptorblocker Naloxon aufgehoben werden konnte (Yu et al. 2000c), was wiederum für eine Interaktion von Melatonin am Opioidrezeptor spricht. Für eine gezielte Beurteilung von Melatonin an Opioidrezeptoren wären ergänzende Versuche notwendig. Beispielsweise könnte die Blockade des Opioidrezeptors mittels Naloxon weiteren Aufschluss über die beobachtete mögliche Wirkung einer Luzindolvorbehandlung auf den Schwellendruck geben.

Untersuchungen der Darmperistaltik unter Hypoxiebedingungen sind insbesondere aus chirurgischer und intensivmedizinischer Sicht von hoher Praxisrelevanz. Versuche am Modell des hypoxischen Hirnschadens konnten eine protektive Wirkung des Melatonins nachweisen (Cetinkaya et al. 2011). Ähnliche Ergebnisse wurden von Reiter an verschiedenen Organsystemen dargestellt (Reiter 1998 und 2003). Die Autoren konnten zeigen, dass der molekulare Wirkmechanismus vornehmlich auf einer antioxidativen Wirkung basiert. Um den Einfluss endogenen Melatonins auf den Dünndarm unter Sauerstoffmangel zu simulieren, wurde die Begasung des Organbads auf ein

anoxisches Stickstoffgasgemisch umgestellt. Dass dadurch eine Änderung der Organbadbedingungen, insbesondere der O₂ Konzentration erreicht wurde, ist durch Organbadmessungen während der Versuche nachgewiesen (aufgeführt in Tab. 17). In diesen Versuchen wurde neben der Schwellendruckänderung als funktioneller Parameter der Darmaktivität auch pH, Sauerstoff- und Kohlendioxidpartialdruck als Indikatoren oxidativer und antioxidativer Prozesse bestimmt. Dabei blieben die Organbadparameter durch die Zugabe von Luzindol oder Melatonin unbeeinflusst.

Eine Minderperfusion des Darms mit konsekutiver Hypoxämie hat eine schädigende Wirkung auf die Darmfunktion (Arslan et al. 2005). Auch in den vorliegenden *in vitro*-Untersuchungen am Meerschweinchendünndarm führte die Begasung mit einem anoxischen Gasgemisch zu einem Anstieg der PPT in den ersten 30 Minuten. Interessanterweise schwächt sich dieser PPT-Anstieg in der nachfolgenden Zeit über 60 bzw. 120 Minuten wieder ab, liegt aber auch dann immer noch deutlich über den entsprechenden PPT-Werten bei Normoxie. Exogen zugefügtes Melatonin verhindert nicht den hypoxiebedingten PPT-Anstieg, wohingegen die Blockade der Wirkung endogenen Melatonins durch den Melatoninrezeptor Antagonisten Luzindol zu einem weiteren Anstieg der PPT führt. Aus diesem Befund lässt sich der Rückschluss ziehen, dass endogen im Darm vorhandenes Melatonin eine protektive Wirkung auf eine hypoxiebedingte Beeinträchtigung der Dünndarmmotilität hat. Wenn dieser Effekt durch die Blockade des Melatoninrezeptors beeinflusst wird, kann nicht die Eigenschaft des Melatonins als Radikalfänger oder Antioxidans als Wirkmechanismus postuliert werden. Das Ausbleiben eines Effektes exogenen Melatonins auf die Schwellendruckänderung in unserem Versuch steht im scheinbaren Widerspruch zu der beobachteten Schwellendruckänderung durch den Melatoninantagonisten Luzindol sowie zu den Ergebnissen der Arbeiten von Reiter (Reiter 1998 und 2003). Diese Diskrepanz könnte möglicherweise durch eine fast vollständige Besetzung der Rezeptoren durch endogenes Melatonin erklärt werden. Während bei vollständiger Rezeptorsättigung die Zugabe von Luzindol zu einem antagonistischen Effekt führt, würde die Zugabe von weiterem Melatonin ohne Effekt bleiben. Dabei führt vermutlich eine

fallende Luzindolkonzentration zur erneuten Rezeptorsättigung mit Melatonin, was mit einem Wiedereinsetzen der protektiven Wirkung des endogenen Melatonins (Schwellendruck sinkt) verbunden ist. Dies könnte erklären, warum die Wirkung von Luzindol nur über ein Zeitintervall von 30 min messbar ist. Um diese Vermutungen zu stützen, fehlen aber in der aktuellen Literatur entsprechende Untersuchungen. In zukünftigen Messversuchen muss eine konstante Luzindolkonzentration im Organbad sichergestellt werden, was gegebenenfalls auch eine erneute Applikation von Luzindol in das Organbad bedeuten könnte.

Eine Arbeit von Tomás-Zapico und Coto-Montes 2005 präsentiert ein Modell der melatoninbasierten antioxidativen Wirkung, in dem die Interaktion von Melatonin mit Calmodulin zu einer Inhibierung des RORalpha-Enzymnetzwerkes führt (Tomás-Zapico and Coto-Montes 2005). Ein solches Modell impliziert, dass messbare Effekte verzögert auftreten und damit nicht einer unmittelbar Rezeptor vermittelten Melatoninwirkung entsprechen würden. In unserem methodischen Ansatz ist damit ein zeitverzögerter Effekt nicht nachweisbar.

Neben der Wirkung von Melatonin an den Melatoninrezeptoren, kann auch eine mögliche Wechselwirkung anderer Substanzen am Melatoninrezeptor diskutiert werden. Reber et al. untersuchten, ob Anästhetika einen Einfluss auf die Melatoninkonzentrationen haben und dadurch eine Wirkungsverstärkung von z.B. Sedativa zu erklären ist (Reber et al. 1998). Dazu verwendeten sie zur Aufrechterhaltung der Narkose Isofloran oder Propofol jeweils mit Fentanyl. Der unter Narkose gemessene Melatoninanstieg bildete sich in der Regenerationsphase bei der Isoflurangruppe langsamer zurück und klinisch wurde eine längere Sedierung beschrieben. Frisk et al. untersuchten die Exkretion von 6-SMT (6-Sulfatoxymelatonin, ein Metabolit von Melatonin) bei Intensivpatienten, die eine Medikation mit Propofol, Benzodiazepinen oder Opioiden erhielten (Frisk et al. 2004). Für Patienten die Benzodiazepine erhielten war die Exkretion von 6-SMT erhöht, bei Patienten die Opiode oder Propofol erhielten aber nicht. Festzuhalten bleibt, dass ein Einfluss von Medikamenten auf den Melatoninspiegel möglich ist, der bei unseren

Untersuchungen aber aufgrund der geringen Effekte am isolierten Dünndarmsegment nicht relevant erschien und daher nicht gemessen wurde. Weiter ist aus den erwähnten Arbeiten kein Einfluss von Medikamenten über den Melatoninrezeptor auf die Darmperistaltik abzuleiten.

5 Zusammenfassung

Motilitätsstörungen des Magen-Darm-Traktes können bei kritisch kranken Patienten auf der Intensivstation zu einem lebensbedrohlichen Krankheitsbild führen. Dabei spielen eine Vielzahl von Pathomechanismen eine Rolle, wobei das Interesse dieser Arbeit den Wirkungen des Tag-Nacht-Hormons Melatonin gilt. Da aus anderen Untersuchungen eine protektive Funktion des Melatonins postuliert werden kann, ist sein Einfluss auf die Peristaltik am Meerschweinchendünndarm untersucht worden. Dabei wurde durch kontinuierliche Perfusion eines Dünndarmsegments im Organbad eine gerichtete Peristaltik induziert und ein Schwellendruck, bei dem eine Kontraktionswelle ausgelöst wurde, als Messparameter herangezogen.

Durch Zugabe von Melatonin in das Organbad konnte kein Einfluss auf dem Schwellendruck nachgewiesen werden. Auch der Melatoninrezeptorantagonist Luzindol führte zu keiner Änderung des Schwellendruckes. Ein signifikanter Anstieg des Schwellendruckes und damit ein inhibitorischer Einfluss auf die Dünndarmperistaltik konnte lediglich durch den partiellen Agonisten 2-Phenylmelatonin nachgewiesen werden.

Wesentliche Ergebnisse dieser Arbeit zeigen den Einfluss von Melatonin unter Hypoxiebedingungen des Dünndarmes, bei dem Luzindol den inhibitorischen Effekt auf die Darmperistaltik verstärkt. Die Melatoningabe führt zu keiner protektiven Wirkung auf die Darmperistaltik unter Hypoxiebedingungen. Damit ist zu vermuten, dass der protektive Effekt des Melatonins auf die Darmperistaltik nicht durch seine Eigenschaften als Radikalfänger, sondern über Melatoninrezeptoren vermittelt wird.

In den Versuchen mit dem Opioid Fentanyl ist eine signifikante Hemmung der Dünndarmperistaltik ebenso unter Blockade des Melatoninrezeptorantagonisten Luzindol festzustellen. Bei Versuchen mit Propofol wurde durch Zugabe von Melatonin oder Melatoninrezeptoragonisten eine Verstärkung der Hemmung der Dünndarmmotilität durch Propofol nachgewiesen.

In unseren Versuchen bestätigten wir, dass Midazolam eine hemmende Wirkung auf die Dünndarmperistaltik hat. Eine vorherige Zugabe von Melatonin hatte dabei keinen Einfluss auf die hemmende Wirkung von Midazolam, wohingegen Luzindol die Hemmwirkung von Midazolam verstärkte. Somit hat das endogene Melatonin möglicherweise einen protektiven Einfluss, der jedoch durch exogene Zugabe von Melatonin nicht verstärkt wird und nicht nachgeahmt werden kann.

Insgesamt zeigen die Untersuchungen, dass Melatonin per se keinen gesicherten Einfluss auf die Peristaltik hat, möglicherweise aber in Wechselwirkung mit Anästhetika.

6 Literaturverzeichnis

Aitkenhead, A. R. (1984). Anaesthesia and bowel surgery. *British Journal of Anaesthesia*. 56: 95-101.

Arslan, O. S., Gelir, E., et al. (2005) L-Arginine and melatonin interaction in rat intestinal ischemia--reperfusion. *Fundam Clin Pharmacol* Vol. 19 (5) pp. 533-5

Baydas, G., H. Canatan, et al. (2002). Comparative analysis of the protective effects of melatonin and vitamin E on streptozocin-induced diabetes mellitus. *J Pineal Res*. 32: 225-230.

Berg, B., W., Herbert, M.K., Ritter, M., Holzer, P. & Roewer, N. (2000). Propofol has a less severe inhibitory effect on intestinal peristaltic reflex than midazolam. Annual Meeting of the American Society of Anesthesiologists, San Francisco. A-476

Blair, P.J, Rhee, P.-L., et al. (2014) The significance of interstitial cells in neurogastroenterology. *J Neurogastroenterol Motil* (2014) vol. 20 (3) pp. 294-317

Bourne, R. S. and G. H. Mills (2006). Melatonin: possible implications for the postoperative and critically ill patient. *Intensive care medicine*. 32: 371-379.

Bourne, R. S., G. H. Mills, et al. (2008). Melatonin therapy to improve nocturnal sleep in critically ill patients: encouraging results from a small randomised controlled trial. *Critical care (London, England)*. 12: R52.

Briejer, M. R., L. M. Akkermans, et al. (1995). Interactions of serotonin with multiple receptors and neurotransmitters in the guinea-pig isolated colon. *Arch Int Pharmacodyn Ther* 329(1): 121-133.

Browning, C., I. Beresford, et al. (2000). Pharmacological characterization of human recombinant melatonin mt(1) and MT(2) receptors. *Br J Pharmacol*. 129: 877-886.

Bubenik, G. A. (2002). Gastrointestinal melatonin: localization, function, and clinical relevance. *Dig Dis Sci*. 47: 2336-2348.

Bubenik, G. A., S. F. Pang, et al. (2000). Circadian variation of portal, arterial and venous blood levels of melatonin in pigs and its relationship to food intake and sleep. *J Pineal Res* 28(1): 9-15.

Bubenik, G. A., H. L. Ayles, et al. (1998). Relationship between melatonin levels in plasma and gastrointestinal tissues and the incidence and severity of gastric ulcers in pigs. *J Pineal Res* 24(1): 62-66.

Bubenik, G. A. and S. Dhanvantari (1989). Influence of serotonin and melatonin on some parameters of gastrointestinal activity. *J Pineal Res.* 7: 333-344.

Bubenik, G. A. (1980). Localization of melatonin in the digestive tract of the rat. Effect of maturation, diurnal variation, melatonin treatment and pinealectomy. *Horm Res* 12(6): 313-323.

Cetinkaya, M., T. Alkan, et al. (2011). Possible neuroprotective effects of magnesium sulfate and melatonin as both pre- and post-treatment in a neonatal hypoxic-ischemic rat model. *Neonatology.* 99: 302-310.

Chen, C.Q. and J. Fichna, et al (2011). Distribution, function and physiological role of melatonin in the lower gut. *World J Gastroenterol.* 17(34): 3888-98

Claustrat, B., J. Brun, et al. (2005). The basic physiology and pathophysiology of melatonin. *Sleep Medicine Reviews.* 9: 11-24.

Costa, M., J. B. Furness, et al. (1992). Projections and chemical coding of neurons with immunoreactivity for nitric oxide synthase in the guinea-pig small intestine. *Neurosci Lett.* 148: 121-125.

Costall, B., R. J. Naylor, et al. (1993). 5-HT₄ receptor mediated facilitation of the emptying phase of the peristaltic reflex in the guinea-pig isolated ileum. *Br J Pharmacol* 110(4): 1572-1578.

Drago, F., S. Macaudo, et al. (2002). Small doses of melatonin increase intestinal motility in rats. *Dig Dis Sci.* 47: 1969-1974.

Dubbels, R., R. J. Reiter, et al. (1995). Melatonin in edible plants identified by radioimmunoassay and by high performance liquid chromatography-mass spectrometry. *J Pineal Res.* 18: 28-31.

Dubocovich, M. L. and M. Markowska (2005). Functional MT₁ and MT₂ melatonin receptors in mammals. *Endocrine* 27(2): 101-110.

Dubocovich, M. L. (1988). Luzindole (N-0774) a novel melatonin receptor antagonist. *J Pharmacol Exp Ther.* 246: 902-910.

Fioretti, M. C., F. Barzi, et al. (1974). Effects induced with melatonin on body temperature in hypothermic rats or rats maintained in various conditions of illumination. *Folia Endocrinol* 27(4): 390-400.

Flemstrom, G. and M. Sjoblom (2005). Epithelial cells and their neighbors. II. New perspectives on efferent signaling between brain, neuroendocrine cells, and gut epithelial cells. *American Journal of Physiology Gastrointestinal and Liver Physiology* 289(3): G377-380.

Frantzides, C. T., V. Cowles, et al. (1992). Morphine effects on human colonic myoelectric activity in the postoperative period. *Am J Surg.* 163: 144-148; discussion 148-149.

Frisk, U., J. Olsson, et al. (2004). Low melatonin excretion during mechanical ventilation in the intensive care unit. *Clin Sci.* 107: 47-53.

Frungieri, M. B., A. Mayerhofer, et al. (2005). Direct effect of melatonin on Syrian hamster testes: melatonin subtype 1a receptors, inhibition of androgen production, and interaction with the local corticotropin-releasing hormone system. *Endocrinology* 146(3): 1541-1552.

Gabella, G. (1972). Fine structure of the myenteric plexus in the guinea-pig ileum. *J Anat* 111(Pt 1): 69-97.

Gabella, G. (1987). The number of neurons in the small intestine of mice, guinea-pigs and sheep. *Neuroscience* 22(2): 737-752.

Gibbs, F. P. and J. Vriend (1981). The half-life of melatonin elimination from rat plasma. *Endocrinology.* 109: 1796-1798.

Hardeland, R. (2005). Antioxidative protection by melatonin: multiplicity of mechanisms from radical detoxification to radical avoidance. *Endocrine* 27(2): 119-130.

Herbert, M., W. Berg, et al. (2000). Propofol-induced inhibition of intestinal peristalsis involves enteric opioidergic pathways. *Critical Care.* Vol 4., Suppl 1, P163. 20th International Symposium on Intensive Care and Emergency Medicine

Herbert, M. and P. Holzer (2008). Standardized concept for the treatment of gastrointestinal dysmotility in critically ill patients—Current status and future options. *Clinical Nutrition.* 27: 25-41.

Holte, K. and H. Kehlet (2000). Postoperative ileus: a preventable event. *The British journal of surgery.* 87: 1480-1493.

Holzer, P (2004). Opioids and opioid receptors in the enteric nervous system: from a problem in opioid analgesia to a possible new prokinetik therapy in humans. *Neuroscience Letters* 361: 192–195

Holzer P, Lippe IT, Heinemann A, Bartho L (1998) Tachykinin NK1 and NK2 receptor-mediated control of peristaltic propulsion in the guinea-pig small intestine in vitro. *Neuropharmacology* 37:131-138

Holzer, P., I. Lippe, et al. (1997). Dual excitatory and inhibitory effect of nitric oxide on peristalsis in the guinea pig Intestine. *Journal of Pharmacology and*

Experimental Therapeutics. 280: 154-161

Holzer, P. and C. A. Maggi (1994). Synergistic role of muscarinic acetylcholine and tachykinin NK-2 receptors in intestinal peristalsis. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* 349(2): 194-201.

Huether, G. (1994). Melatonin synthesis in the gastrointestinal tract and the impact of nutritional factors on circulating melatonin. *Ann N Y Acad Sci.* 719: 146-158.

Huether, G., B. Poeggeler, et al. (1992). Effect of tryptophan administration on circulating melatonin levels in chicks and rats: evidence for stimulation of melatonin synthesis and release in the gastrointestinal tract. *Life Sci* 51(12): 945-953.

Jaworek, J., T. Brzozowski, et al. (2005). Melatonin as an organoprotector in the stomach and the pancreas. *J Pineal Res.* 38: 73-83.

Kennaway, D. J., R. G. Frith, et al. (1977). A specific radioimmunoassay for melatonin in biological tissue and fluids and its validation by gas chromatography-mass spectrometry. *Endocrinology* 101(1): 119-127.

Konturek, S. J., P. C. Konturek, et al. (2007) a). Localization and biological activities of melatonin in intact and diseased gastrointestinal tract (GIT). *J Physiol Pharmacol.* 58: 381-405.

Konturek, S J, P C Konturek, et al. (2007) b). Role of melatonin in upper gastrointestinal tract. *J Physiol Pharmacol* vol. 58 Suppl 6 pp. 23-52

Kopin, I. J., C. M. Pare, et al. (1961). The fate of melatonin in animals. *J Biol Chem* 236: 3072-3075. Koutsoviti-Papadopoulou, M., F. Akahori, et al. (1999). Propofol's biphasic effect on GABA(A)-receptor-mediated response of the isolated guinea pig ileum. *Pharmacol Res.* 40: 313-317.

Kromer, W. (1990). Reflex peristalsis in the guinea pig isolated ileum is endogenously controlled by kappa opioid receptors. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol.* 341: 450-454.

Lee, P. P. and S. F. Pang (1993). Melatonin and its receptors in the gastrointestinal tract. *Biol Signals.* 2: 181-193.

Lerner A.B., et al. (1960). Isolation of melatonin and 5-methoxyindole-3-acetic acid from bovine pineal glands. *J Biol Chem.* 235: 1992-1997.

Little, H. J., A. Clark, et al. (2000). Investigations into pharmacological antagonism of general anaesthesia. *Brit J Pharmacol* 129(8): 1755-1763.

Lucchelli, A., M. G. Santagostino-Barbone, et al. (1997). Investigation into the contractile response of melatonin in the guinea-pig isolated proximal colon: the role of 5-HT₄ and melatonin receptors. *Brit J Pharmacol.* 121: 1775-1781.

Lüdemann, P., S. Zwernemann, et al. (2001). Clearance of melatonin and 6-sulfatoxymelatonin by hemodialysis in patients with end-stage renal disease. *J Pineal Res.* 31: 222-227.

Lund, N. and P. J. Papadakos (1995). Barbiturates, neuroleptics, and propofol for sedation. *Crit Care Clin* 11(4): 875-886.

Maestroni, G. J. (1993). The immunoneuroendocrine role of melatonin. *J Pineal Res.* 14(1): 1-10.

Maggi, C. A., R. Patacchini, et al. (1994). Tachykinin NK₁ and NK₂ receptor antagonists and atropine-resistant ascending excitatory reflex to the circular muscle of the guinea-pig ileum. *Brit J Pharmacol.* 112: 161-168.

Mohammadi, B., G. Haeseler, et al. (2001). Structural requirements of phenol derivatives for direct activation of chloride currents via GABA(A) receptors. *Eur J Pharmacol* 421(2): 85-91.

Naguib, M., A. H. Samarkandi, et al. (2006). The effects of melatonin premedication on propofol and thiopental induction dose-response curves: a prospective, randomized, double-blind study. *Anesth Analg.* 103: 1448-1452.

Naji, L., A. Carrillo-Vico, et al. (2004). Expression of membrane and nuclear melatonin receptors in mouse peripheral organs. *Life Sci* 74(18): 2227-2236.

Nonno, R., M. Pannacci, et al. (1999). Ligand efficacy and potency at recombinant human MT₂ melatonin receptors: evidence for agonist activity of some mt₁-antagonists. *Brit J Pharmacol.* 127: 1288-1294.

Nosjean, O., M. Ferro, et al. (2000). Identification of the melatonin-binding site MT₃ as the quinone reductase 2. *J Biol Chem.* 275: 31311-31317.

Olsson, C. and S. Holmgren (2001). The control of gut motility. *Comp Biochem Physiol, Part A, Mol Integr Physiol.* 128: 481-503.

Ostrom, R. S. and F. J. Ehlert (1997). M₂ muscarinic receptor inhibition of agonist-induced cyclic adenosine monophosphate accumulation and relaxation in the guinea pig ileum. *J Pharmacol Exp Ther.* 280: 189-199.

Pandiperumal, S., I. Trakht, et al. (2008). Physiological effects of melatonin: Role of melatonin receptors and signal transduction pathways. *Progress in Neurobiology.* 85: 335-353.

- Prins, N. H., M. R. Briejer, et al. (1999). Evidence for 5-HT₇ receptors mediating relaxation of human colonic circular smooth muscle. *Brit J Pharmacol* 128(4): 849-852.
- Pontoire, C., M. Bernard, et al. (1993). Characterization of melatonin binding sites in chicken and human intestines. *Eur J Pharmacol*. 247: 111-118.
- Poon, A. M. S., G. M. Kravtsov, et al. (2002). Receptor-mediated modulation of avian caecal muscle contraction by melatonin: role of tyrosine protein kinase. *J Pineal Res*. 32: 199-208.
- Quastel, M. R. and R. Rahamimoff (1965). Effect of melatonin on spontaneous contractions and response to 5-Hydroxytryptamine of rat isolated duodenum. *Brit J Pharmacol Chemother* 24: 455-461.
- Rahamimoff, R., I. Bruderman, et al. (1965). Effect of melatonin on 5-hydroxytryptamine induced contraction of isolated cat trachea. *Life Sci* 4(23): 2281-2287.
- Raikhlin, N. T. and I. M. Kvetnoi (1974). Biological identification of melatonin in enterochromaffin cells. *Dokl Akad Nauk SSSR* 215(3): 731-732.
- Reber, A., P. R. Huber, et al. (1998). General anaesthesia for surgery can influence circulating melatonin during daylight hours. *Acta anaesthesiologica Scandinavica*. 42: 1050-1056.
- Reiter, R. J. (2003). Melatonin: clinical relevance. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab*. 17: 273-285.
- Reiter, R. J., D. X. Tan, et al. (2001). Melatonin in plants. *Nutr Rev*. 59: 286-290.
- Reiter, R. J., D. X. Tan, et al. (2000). Pharmacology and physiology of melatonin in the reduction of oxidative stress in vivo. *Biological signals and receptors*. 9: 160-171.
- Reiter, R. J. (1998). Oxidative damage in the central nervous system: protection by melatonin. *Prog Neurobiol*. 56: 359-384.
- Reiter, R.J. (1991). Pineal melatonin: Cell biology of its synthesis and of its physiological interactions. *Endocrine Reviews* 12, 151-180.
- Santagostino-Barbone, M. G., E. Masoero, et al. (2000). 2-Phenylmelatonin: a partial agonist at enteric melatonin receptors. *Pharmacol Toxicol*. 87: 156-160.

Schang, J. C., M. Hémond, et al. (1986). How does morphine work on colonic motility? An electromyographic study in the human left and sigmoid colon. *Life Sci.* 38: 671-676.

Shavali, S., B. Ho, et al. (2005). Melatonin exerts its analgesic actions not by binding to opioid receptor subtypes but by increasing the release of beta-endorphin an endogenous opioid. *Brain Research Bulletin.* 64: 471-479.

Simonneaux, V. and C. Ribelayga (2003). Generation of the melatonin endocrine message in mammals: a review of the complex regulation of melatonin synthesis by norepinephrine, peptides and other pineal transmitters. *Pharmacological Reviews.* 55: 325-395.

Skene, D. J., E. Papagiannidou, et al. (2001). Contribution of CYP1A2 in the hepatic metabolism of melatonin: studies with isolated microsomal preparations and liver slices. *J Pineal Res.* 31: 333-342.

Taguchi, A., N. Sharma, et al. (2001). Selective Postoperative Inhibition of Gastrointestinal Opioid Receptors. *N Engl J Med.* 345: 935-940.

Tan, D. X., L. C. Manchester, et al. (2000). Significance of melatonin in antioxidative defense system: reactions and products. *Biological signals and receptors.* 9: 137-159.

Terry, P. D., F. Villinger, et al. (2009). Melatonin and ulcerative colitis: evidence, biological mechanisms, and future research. *Inflamm Bowel Dis.* 15: 134-140.

Tomás-Zapico, C. and A. Coto-Montes (2005). A proposed mechanism to explain the stimulatory effect of melatonin on antioxidative enzymes. *J Pineal Res.* 39: 99-104.

Trendelenburg P (1917). Physiologische und pharmakologische Versuche über die Dünndarmperistaltik. *Archiv für Experimentelle Pathologie und Pharmakologie* (80): pp. 55-129.

Uz, T., A. D. Arslan, et al. (2005). The regional and cellular expression profile of the melatonin receptor MT1 in the central dopaminergic system. *Brain Res Mol Brain Res* 136(1-2): 45-53.

Vakkuri, O., H. Rintamaki, et al. (1985). Plasma and tissue concentrations of melatonin after midnight light exposure and pinealectomy in the pigeon. *J Endocrinol* 105(2): 263-268.

Vaughan, G. M. and R. J. Reiter (1986). Pineal dependence of the Syrian hamster's nocturnal serum melatonin surge. *J Pineal Res* 3(1): 9-14.

Viswanathan, M., J. T. Laitinen, et al. (1990). Expression of melatonin receptors in arteries involved in thermoregulation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 87(16): 6200-6203.

Wan, Q., H. Y. Man, et al. (1999). Differential modulation of GABA_A receptor function by Mel1a and Mel1b receptors. *Nat Neurosci.* 2: 401-403.

Wang, F., J. Li, et al. (2003). The GABA(A) receptor mediates the hypnotic activity of melatonin in rats. *Pharmacol Biochem Behav.* 74: 573-578.

Wenderoth, H. (2002). Effects of the benzodiazepine midazolam on peristalsis in the guinea pig small intestine in vitro. Inaugural-Dissertation, Medizinische Fakultät, Klinik für Anästhesiologie, Universität Würzburg.

Witt-Enderby, P. A., J. Bennett, et al. (2003). Melatonin receptors and their regulation: biochemical and structural mechanisms. *Life Sci.* 72: 2183-2198.

Wood, J. D. and J. J. Galligan (2004). Function of opioids in the enteric nervous system. *Neurogastroenterol Motil* 16 Suppl 2: 17-28

Woods, J. H., L. W. Erickson, et al. (1978). Postoperative ileus: a colonic problem? *Surgery* 84(4): 527-533.

Woollard, D. J., J. C. Bornstein, et al. (1994). Characterization of 5-HT receptors mediating contraction and relaxation of the longitudinal muscle of guinea-pig distal colon in vitro. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol.* 349: 455-462.

Wu, F. S., Y. C. Yang, et al. (1999). Melatonin potentiates the GABA(A) receptor-mediated current in cultured chick spinal cord neurons. *Neurosci Lett.* 260: 177-180.

Yu, C. X., G. C. Wu, et al. (2000a). Melatonin influences the release of endogenous opioid peptides in rat periaqueductal gray. *Sheng Li Xue Bao.* 52: 207-210.

Yu, C. X., B. Zhu, et al. (2000c). The analgesic effects of peripheral and central administration of melatonin in rats. *Eur J Pharmacol.* 403: 49-53.

Yu, C. X., C. B. Zhu, et al. (2000b). Selective MT(2) melatonin receptor antagonist blocks melatonin-induced antinociception in rats. *Neurosci Lett.* 282: 161-164.

7 Danksagung

Ich danke meinem Betreuer Herrn Professor Herbert, der mich die lange Zeit durch die Arbeit geduldig begleitet hat, sowie Herrn Professor Wischmeyer als Korreferent.

Weiter möchte ich insbesondere Fr. Dr. Rebecca Weis für die Einarbeitung und der gesamten Arbeitsgruppe danken. Mein besonderer Dank gilt aber meiner Familie die mir immer eine große Stütze waren und außerdem meinen Freunden und Kollegen die mich bis zum Schluss unterstützt haben.

9 Lebenslauf

Persönliche Daten

| | |
|-----------------------|---------------------------|
| Name | Christian Andreas Fahr |
| Geburtsdatum und -ort | 24.12.1979, Wilhelmshaven |
| Familienstand | ledig |
| Staatsangehörigkeit | deutsch |

Ausbildung

| | |
|----------------------------|--|
| 1985 - 1989 | Grundschule St. Pankratius in Gescher |
| 1989 - 1999 | St. Pius Gymnasium in Coesfeld, Abitur |
| 1999 - 2000 | Zivildienst: Altenheim St. Vincenz Coesfeld |
| 05/2000 - 09/2006 | Studium der Medizin an der Julius-Maximilian Universität Würzburg |
| 04/2005 - 07/2005 | Praktisches Jahr , Anästhesie an der Universitätsklinik Würzburg |
| 08/2005 – 11/2005 | Praktisches Jahr, Innere Medizin, Kantonsspital St. Gallen |
| 12/2005 – 03/2006 | Praktisches Jahr , Chirurgie an der Universitätsklinik Würzburg |
| Juni 2006 | Approbation als Arzt |
| 01/2007 – 11/2010 | Assistenzarzt Urologische Abteilung, Klinikum am Steinenberg in Reutlingen, Dr. med. Schwaibold |
| 12/2010 - 2015 | Assistenzarzt Urologische Abteilung Universitätsklinik Freiburg, Professor Dr. med. Wetterauer |
| Februar 2015 | Facharztprüfung für Urologie |
| 2015 - heute | Facharzt Urologische Abteilung Universitätsklinik Freiburg, Professor Dr. med. Wetterauer |
| Freiburg, im November 2016 | |